

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA

SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**Efecto de factores nutricionales y físicos
sobre el crecimiento y esporulación
de *Moniliophthora roreri*
in vitro.**

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

Franklin A. Herrera Murillo

CENTRO AGRONOMICO TROPICAL DE INVESTIGACION Y ENSEÑANZA

Departamento de Producción Vegetal

Turrialba, Costa Rica

1988

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 al grado de

Magister Scientiae

JURADO:



José J. Galindo, Ph.D.

Profesor Consejero



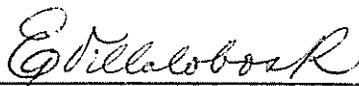
Gustavo Enriquez, Ph.D

Miembro del Comité



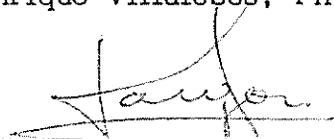
Carlos Ramirez, Ph.D

Miembro del Comité



Enrique Villalobos, Ph.D

Miembro del Comité



Ronald Vargas, Ph.D.

Director del Programa de Estudios de Posgrado en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales UCR-CATIE



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



Franklin Herrera
Candidato

DEDICATORIA

A mi esposa Rita y
a mis hijos Frank y
Karolina, motivo espe-
pecial de superación
en mi vida.

AGRADECIMIENTOS

El autor desea expresar su sincero agradecimiento a las siguientes personas e instituciones que colaboraron en la realización de esta investigación.

- Al Dr. José J. Galindo por su profesionalismo en la dirección de esta tesis y por sus valiosos consejos y sugerencias durante la realización de mis estudios de posgrado.
- Al Dr. Gustavo Enríquez, Dr. Carlos Ramírez, Dr. Enrique Villalobos y Dr. Ronald Vargas, por sus valiosas sugerencias y revisión de este manuscrito.
- A los señores Luis G. Salazar y Fernando López por su gran colaboración en los trabajos de laboratorio.
- A la Srta. Alba Buitrago y Sra. Teresa Washington por su labor en la grabación de datos.
- Al Dr. José Fargas, Sr. Joaquín Salazar y MSc. Wilberth Phillips por sus sugerencias y materiales suministrados.
- Al Sr. Gustavo López, M.Sc. Adolfo Soto, Ing. Walter González y Dr. Pedro Ferreiro por su importante colaboración en el procesamiento y análisis de datos.
- A mis compañeros y amigos de posgrado, en forma especial al M.Sc. Francisco Jiménez con quien compartí muchas horas de estudio.
- Mi reconocimiento y gratitud especial a mi esposa Rita Abarca Berrocal por su permanente ayuda y apoyo durante mis estudios y su excelente labor mecanográfica. Igualmente a la señora Carmen Mata Jiménez, por su gran amistad, valiosa y desinteresada ayuda en la elaboración de este documento.
- A la Universidad de Costa Rica y al CATIE por la oportunidad brindada para realizar mis estudios de posgrado.

BIOGRAFIA

El autor nació en Guanacaste, Costa Rica el 1 de Noviembre de 1955. Realizó sus estudios secundarios en el Liceo de Tilarán; sus estudios universitarios en la Facultad de Agronomía de la Universidad de Costa Rica, donde obtuvo el grado de Bachiller en Ingeniería Agronómica en 1980 y Licenciado en Ingeniería Agronómica con énfasis en Fitotecnia en 1981.

De 1980 a 1982 laboró en programas de investigación agrícola en la Estación Experimental Los Diamantes del Ministerio de Agricultura y Ganadería, siendo también contraparte del MAG en el Convenio MAG/CATIE del Proyecto Sistemas de Producción para Pequeños Agricultores.

De 1982 a 1986 laboró con el Departamento de Producción Vegetal del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE) en el Componente Manejo de Genotipos del Proyecto CATIE/FIDA.

En 1984 ingresó al Programa de Estudios de Posgrado de la Universidad de Costa Rica/CATIE, donde obtuvo el título de Magister Scientiae en enero de 1988.

A partir de mayo de 1986 labora como investigador del Programa de Malezas de la Estación Experimental Agrícola Fabio Baudrit Moreno y Profesor de la Escuela de Fitotecnia de la Universidad de Costa Rica.

CONTENIDO

	Página
RESUMEN GENERAL	x
GENERAL SUMMARY	xii
LISTA DE CUADROS	xiv
LISTA DE FIGURAS	xvi
INTRODUCCION GENERAL	1
I. EFECTO DE LAS FUENTES Y DE LAS CONCENTRACIONES DE NITRO- GENO, CARBONO, Y DE ALGUNOS MEDIOS COMPUESTOS EN EL CRECI- MIENTO Y LA ESPORULACION DE <u>Moniliophthora roreri</u> <u>in</u> <u>vitro</u>	4
I.1 Resumen	4
I.2 Introducción	6
I.3 Revisión de Literatura	7
I.4 Materiales y Métodos	13
a. Efecto de fuentes y, concentraciones de N.....	13
i. Preparación del medio de cultivo	13
ii. Calibración del pH inicial	13
iii. Transferencia del inóculo e incubación	15
iv. Variables evaluadas.....	15
v. Análisis estadístico	16
b. Efecto de fuentes y concentración de C	16
c. Efecto de medios de cultivo compuestos	16
i. Papa	18
ii. Avena	18
iii. Extracto de malta	18
iv. Banano	18
v. Polvo de corteza de mazorcas de cacao	18
vi. Mycophil	19
vii. V-8	19
viii. Variables evaluadas	19
ix. Análisis estadístico	20

d.	Efecto de algunas combinaciones de medios compues- tos con fuentes de carbono y nitrógeno	20
1.5	Resultados	21
a.	Efecto de fuentes y dosis de N	21
i.	Diámetro de las colonias	21
ii.	Diámetro de la zona esporulada	25
iii.	Conidios por cm^2 de área esporulada	25
iv.	Conidios por colonia	28
v.	Descripción morfológica de las colonias	31
b.	Efecto de fuentes y dosis de C,	31
i.	Diámetro de las colonias	31
ii.	Diámetro de la zona esporulada	33
iii.	Conidios por cm^2 de área esporulada y por co- lonia	35
iv.	Aspecto morfológico de las colonias	35
c.	Efecto de medios de cultivo compuestos	37
i.	Diámetro de las colonias	37
ii.	Diámetro de la zona esporulada	39
iii.	Conidios por cm^2 de área esporulada y por co- lonia	39
iv.	Aspecto morfológico de las colonias según me- dio de cultivo	41
d.	Efecto de medios de cultivo compuestos en combina- ción con fuentes de C y N	45
i.	Diámetro de las colonias y su zona esporulada	45
ii.	Conidios por cm^2 de área esporulada y por co- lonia	45
iii.	Efecto de la adición de maltosa y asparagina a los medios nutritivos	45
1.6	Discusión	50
a.	Efecto de fuentes y dosis de N	50
b.	Efecto de fuentes y dosis de C	52
c.	Efecto de medios de cultivo compuestos	54
d.	Efecto de medios de cultivo compuestos en combina- ción con fuentes de C y N	57

	Página
1.7 Conclusiones	58
II. EFECTO DE TEMPERATURA, PERIODOS DE LUMINOSIDAD Y pH INICIAL EN EL CRECIMIENTO Y ESPORULACION DE <u>Moniliophthora roreri</u> <u>in vitro</u>	59
II.1 Resumen	59
II.2 Introducción.....	60
II.3 Revisión de Literatura.....	60
II.4 Materiales y Métodos.....	67
a. Efecto de la temperatura.....	67
i. Rango de 20 a 32 C.....	67
ii. Rango de 22 a 28 C.....	68
b. Efecto de periodos de luminosidad.....	68
i. Incubación.....	69
ii. Tratamientos.....	69
iii. Variables evaluadas.....	69
iv. Análisis estadístico.....	70
c. Efecto del pH en el crecimiento y esporulación.....	70
i. pH inicial sin solución tampón.....	70
ii. pH inicial con solución tampón.....	71
II.5 Resultados.....	72
a. Efecto de la temperatura.....	72
i. Rango de 20 a 32 C.....	72
i.1 Diámetro de las colonias.....	72
i.2 Diámetro de la zona esporulada.....	74
i.3 Conidios por cm ² de área esporulada y colonia	74
ii. Rango de 22 a 28 C.....	77
ii.1 Diámetro de colonias y zona esporulada.....	77
ii.2 Conidios por cm ² de área esporulada y colonia.	81
ii.3 Descripción morfológica de las colonias.....	81
b. Efectos de periodos de luminosidad.....	81
i. Diámetro de colonias y zona esporulada.....	81

	Página
ii. Conidios por cm ² de área esporulada y colonia.....	83
iii. Descripción morfológica de las colonias.....	86
c. Efecto de pH.....	89
i. pH sin solución tampón.....	89
i.1 Diámetro de colonias y zona esporulada.....	89
i.2 Conidios por cm ² de área esporulada y colonia..	89
i.3 Variación del pH con el tiempo de incubación...	93
i.4 Aspecto morfológico de las colonias.....	93
ii. pH inicial con solución tampón.....	93
ii.1 Diámetro de colonias y zona esporulada.....	93
ii.2 Conidios por cm ² de área esporulada y colonia..	97
ii.3 Variación del pH causado por <u>M. royeri</u>	97
ii.4 Descripción morfológica de las colonias.....	97
II.6 Discusión.....	99
a. Efecto de temperaturas.....	99
b. Efecto de periodos de luminosidad.....	101
c. Efecto de pH inicial.....	103
II.7 Conclusiones.....	106
III. COMPARACIÓN MORFOLOGICA IN VITRO DE AISLAMIENTOS DE <u>M royeri</u> PROCEDENTES DE VARIAS ZONAS CACAOTERAS DE COSTA RICA.....	107
III.1 Resumen.....	107
III.2 Introducción.....	108
III.3 Revisión de Literatura.....	108
III.4 Materiales y Métodos.....	110
a. Mantenimiento y transferencia de aislamientos.....	112
b. Variables evaluadas.....	112
c. Análisis estadístico	113
III.5 Resultados.....	113
III.6 Discusión	119
III.7 conclusiones y Sugerencias.....	121
III.9L Literatura citada.....	123
III.10 Apendice.....	135

RESUMEN GENERAL

In vitro se estudió el efecto en el crecimiento y esporulación de Moniliophthora roreri de factores nutricionales (fuentes y concentraciones de N, C y medios compuestos); de factores físicos (temperatura, periodos de luminosidad y pH) y el comportamiento de 18 aislamientos procedentes de varias zonas cacaoteras de Costa Rica.

Con respecto al N, se encontró el mayor crecimiento vegetativo y área esporulada con úrea (75 y 150 mg de N/l), mientras la mayor producción de conidios por cm² de área esporulada y por colonia, ocurrió con asparagina a 150 y 75 mg de N/l respectivamente.

Con respecto al C, el mayor diámetro de las colonias y la zona esporulada ocurrió con maltosa a 2 g de C/l.

M. roreri creció y esporuló en todos los medios compuestos evaluados, pero el mayor crecimiento vegetativo lo mostró en polvo de corteza de mazorcas de cacao 0,6%; mientras la mayor zona de esporulación ocurrió en extracto de malta 5% y la mayor producción de conidios con V-8 20% y extracto de malta 10%. La adición de maltosa y asparagina, 2 y 0,1% respectivamente al V-8 y maltosa 2% al extracto de malta aumentaron significativamente la producción de conidios en estos medios.

Con respecto a la temperatura, el mayor crecimiento y esporulación ocurrió de 24 a 26°C cuando M. roreri creció en VMAA; y de 24 a 28°C cuando creció en EMA. La producción de conidios fue alta y similar de 22 a 28°C, pero a 32°C el hongo no esporuló.

Periodos de 4 y 8 horas de luz alternando con 20 y 16 horas de oscuridad respectivamente, aumentaron el diámetro de las colonias y la zona esporulada en VMAA. En EMA el crecimiento vegetativo fue similar en todos los periodos de luz, no así la zona esporulada que fue mayor en periodos de 4 a 16 horas de luz alternando con 20 a 8 horas de oscuridad, y a 5 minutos de luz cada 72 horas.

La mayor producción de conidios ocurrió con VMAA con 4 a 16 horas de luz.

Con respecto al pH, cuando no se usó solución tampón el crecimiento y esporulación del hongo fue similar de pH 5,3 hasta 7,3. En estas condiciones M. roreri después de 15 días de incubación, indujo un incremento de aproximadamente una unidad en el pH del medio.

Cuando el pH inicial fue estabilizado con solución tampón, el mayor diámetro de las colonias y la zona esporulada ocurrió a pH 5,7 y la mayor producción de conidios a pH 6,5. En este caso el hongo no modificó el pH del medio en el cual creció.

Con respecto a los aislamientos, se encontraron diferencias significativas en el diámetro de las colonias, la zona esporulada y la producción de conidios. A los 14 días de incubación el aislamiento A-911 alcanzó el mayor diámetro de las colonias y la zona esporulada con 71 y 62 mm respectivamente; mientras la mayor producción de conidios la obtuvo el aislamiento Thp-1 (La Lola), 8640 millones/colonia. Según morfología de las colonias los aislamientos se clasificaron en tres grupos: a) aislamientos con anillos alternos bien definidos; b) aislamientos con zonas irregulares alternas de ancho variable; c) aislamientos con micelio algodonoso poco denso y más aéreo que los grupos anteriores, con anillos crema alternando con otros amarillo verdoso.

Summary

The effect on growth and sporulation of Moniliophthora roreri, causal agent of monilliasis of cacao, was studied in vitro for nutritional factors (sources and concentrations of N, C, and complex media); physical factors (temperature, periods of luminosity and pH). Growth characteristics of 18 isolates from various cocoa-producing zones of Costa Rica was also determined.

Urea (75 and 150 mg N l⁻¹) was the N source that induced the greatest colony diameter and sporulated area, while the greatest production of conidia per cm² of sporulated area occurred with asparagine (150 and 75 mg N l⁻¹).

In regard to C sources, the greatest colony diameter and size of sporulated area was obtained with maltose at 20 g of C l⁻¹.

M. roreri grew and sporulated in all of the complex media evaluated, but the greatest vegetative growth was observed on cocoa pod skin powder (0.6%), while the greatest sporulation area was observed in 5% malt extract (ME) and the greatest conidia production on 20% V-8 juice (V-8) and 10% ME. The addition of 2% maltose and 0.1% asparagine to the V-8 medium and 2% maltose to 10% ME significantly increased the production of conidia.

The greatest growth and sporulation of the fungus occurred between 24 to 26°C in V-8 -maltose-asparagine- agar (VMAA) - (20-2-0.1-2%) and between 24 to 28°C in malt extract -maltose- agar (EMA) (10-2-2%). The conidia production was more or less evenly high, between 22 to 28° C; at 32°C no sporulation occurred.

Periods of light/darkness of 4/20 and 8/16 hr increased the diameter of the colonies and the sporulated area in VMAA. In EMA the vegetative growth was similar in all light treatments; however it was not the case with the sporulated area. This was the highest in periods of 4 to 16 hr of light, alternating with 20 to 8 hr of darkness or five minutes of light every 72 hr.

The greatest production of conidia occurred in VMAA with 4 to 16 hr of light.

In regards to pH, when a buffer solution was not used, growth and sporulation of the fungus was similar from initial pH 5.3 to 7.3. However, under these conditions, after 15 days of incubation, M. royeri induced a decrease in the acidity of the media by one pH unit. When a buffer was used, the greatest diameter of the colonies and sporulated area occurred at pH 5.7 and the greatest conidia production at pH 6.5.

Significant differences were found between growth characteristics of isolates, diameter of the colonies, sporulated area and conidia production. According to colony morphology, the isolates were classified in three groups: a) isolates with well defined alternating rings; b) isolates with irregular alternating zones of variable width; c) isolates with not very dense cottony hyphae and more sporulated area than the former groups, with cream-colored rings alternating with yellowish green ones.

LISTA DE CUADROS

CAPITULO I.

Cuadro N°		Página
1	Fórmula, peso molecular y porcentaje de N para las fuentes evaluadas sobre su efecto en el crecimiento y esporulación de <u>Moniliophthora roreri</u>	14
2	Fórmula, peso molecular y porcentaje de C de las fuentes evaluadas en el crecimiento y esporulación de <u>Moniliophthora roreri</u>	17
3	Efecto de N y períodos de incubación sobre el crecimiento de <u>Moniliophthora roreri</u>	22
4	Efecto de fuentes y dosis de N sobre el crecimiento de <u>Moniliophthora roreri</u>	23
5	Efecto de N y períodos de incubación sobre el crecimiento de <u>Moniliophthora roreri</u>	26
6	Efecto de fuentes y dosis de N sobre la esporulación de <u>Moniliophthora roreri</u>	27
7	Efecto de las fuentes y dosis de N sobre la esporulación de <u>Moniliophthora roreri</u>	29
8	Efecto de la fuente y la dosis de N sobre la producción total de conidios por colonia de <u>Moniliophthora roreri</u>	30
9	Efecto de fuentes, dosis de C y períodos de incubación sobre el crecimiento de <u>Moniliophthora roreri</u>	32
10	Efecto de fuentes y dosis de C sobre el crecimiento de <u>Moniliophthora roreri</u>	34
11	Efecto de fuentes y dosis de C sobre el crecimiento de <u>Moniliophthora roreri</u>	36
12	Efecto de 17 medios nutritivos sobre el crecimiento de <u>Moniliophthora roreri</u>	38
13	Efecto de 17 medios nutritivos sobre la esporulación de <u>Moniliophthora roreri</u>	40
14	Efecto de 14 medios de cultivo con fuentes adicionales de C y N en el crecimiento de <u>Moniliophthora roreri</u>	46

Cuadro N°		Página
15	Efecto de 14 medios nutritivos con fuentes adicionales de C y N en la esporulación de <u>Moniliophthora roreri</u>	47
16	Efecto de 14 medios nutritivos con fuentes adicionales de C y N sobre la producción de conidios por cm ² de área esporulada y por colonia de <u>Moniliophthora roreri</u>	48

CAPITULO II

1	Efecto de cuatro temperaturas y dos medios de cultivo sobre el crecimiento de <u>Moniliophthora roreri</u>	73
2	Efecto de cuatro temperaturas y dos medios de cultivo sobre el diámetro de la zona esporulada en colonias de <u>Moniliophthora roreri</u>	75
3	Efecto de dos medios de cultivo y cuatro temperaturas en la producción de conidios por cm ² de área esporulada de <u>Moniliophthora roreri</u>	76
4	Efecto de dos medios de cultivo y cuatro temperaturas sobre la producción de conidios de <u>Moniliophthora roreri</u>	78
5	Efecto de cuatro temperaturas sobre el diámetro de colonias de <u>Moniliophthora roreri</u>	79
6	Efecto de cuatro temperaturas sobre la zona esporulada de <u>Moniliophthora roreri</u> en VMAA.....	80
7	Efecto de cuatro temperaturas sobre la producción de conidios de <u>Moniliophthora roreri</u> en VMAA.....	82
8	Efecto de nueve períodos de luminosidad y dos medios de cultivo sobre el crecimiento de <u>Moniliophthora roreri</u>	84
9	Efecto de nueve períodos de luminosidad y dos medios de cultivo sobre la esporulación de <u>Moniliophthora roreri</u>	85
10	Efecto de dos medios de cultivo sobre la producción de conidios por cm ² y por colonia de <u>Moniliophthora roreri</u>	87
11	Efecto de períodos alternos de luz y oscuridad sobre la producción de conidios por cm ² de área esporulada y por colonia de <u>Moniliophthora roreri</u>	88

Cuadro N°		Página
12	Efecto de seis niveles de pH iniciales sin solución tampón sobre el crecimiento de <u>Moniliophthora roreri</u>	90
13	Efecto de seis niveles de pH iniciales sin solución tampón sobre la esporulación de <u>Moniliophthora roreri</u> ...	91
14	Efecto de seis niveles de pH iniciales sin solución tampón sobre la producción de conidios por cm ² de área esporulada y por colonia de <u>Moniliophthora roreri</u> ..	92
15	Modificación del pH inicial del medio VMAA debido al crecimiento de <u>Moniliophthora roreri</u> durante 15 días de incubación.....	94
16	Efecto de siete niveles de pH iniciales con solución tampón sobre el crecimiento de <u>Moniliophthora roreri</u>	95
17	Efecto de siete niveles de pH iniciales con solución tampón sobre la esporulación de <u>Moniliophthora roreri</u> ...	96
18	Efecto de siete niveles de pH iniciales con solución tampón sobre la producción de conidios por cm ² de área esporulada y por colonia de <u>Moniliophthora roreri</u> ..	98

CAPITULO III

1	Lugar de procedencia de los aislamientos de <u>Moniliophthora roreri</u>	111
2	Crecimiento diario de 18 aislamientos de <u>Moniliophthora roreri</u>	115
3	Crecimiento diario de la zona esporulada de 18 aislamientos de <u>Moniliophthora roreri</u>	116
5	Conidios por cm ² de área esporulada y por colonia en 18 aislamientos de <u>Moniliophthora roreri</u>	118

LISTA DE FIGURAS

1	Efecto de medios nutritivos y dosis sobre la producción de conidios por cm ² de área esporulada de <u>Moniliophthora roreri</u>	42
2	Efecto de medios nutritivos y dosis (%) sobre la producción de conidios/colonia de <u>Moniliophthora roreri</u>	43

INTRODUCCION GENERAL

La moniliasis del cacao (Theobroma cacao L.), causada por el hongo Moniliophthora roreri (Cif. & Par.) Evans et al., ha sido uno de los principales factores limitantes para la producción de cacao en países como Ecuador, Colombia (1,6) y Costa Rica donde apareció a finales de 1978 (31, 60, 85). Desde este país el hongo invadió el norte de Panamá (32) y el sur de Nicaragua (60).

Las pérdidas ocasionadas en estos países han sido cuantiosas (6,26 44, 65). Ampuero (1) menciona que en Ecuador y Colombia las pérdidas han alcanzado de 15 a 80% de las mazorcas, mientras en Costa Rica se registraron pérdidas hasta de un 76% de la producción nacional (23,40) y un 92% del volumen de exportación (41). Muchas plantaciones han sido abandonadas por su causa en estos países (34).

La mazorca es la única parte de la planta atacada por el hongo (1, 27,32), aunque Evans (34) menciona haber logrado lesiones en tallos de plantas jóvenes y cogines florales, pero no logró reaislar el hongo de las lesiones. Recientemente Ram (73) logró infección en plántulas de cacao y reaisló el hongo a partir de las lesiones en condiciones de laboratorio.

En las mazorcas los primeros síntomas aparecen como puntos verdes oscuros, translúcidos que luego se transforman en pequeñas manchas necróticas de apariencia acuosa. Cuando la infección ocurre en mazorcas tiernas, frecuentemente se observa la aparición de un abultamiento o tumefacción de los tejidos del exocarpo, con una coloración más clara que el resto de la mazorca (27,71).

Las manchas se tornan color pardo oscuro, generalmente rodeadas de un halo amarillento y crecen rápidamente hasta cubrir la totalidad de la mazorca. Posteriormente aparece una capa de micelio blanquecino, el estro

ma, sobre el cual ocurre una esporulación intensa, cuyos conidios son color crema o pardo claro (6,27,32). El contenido interno del fruto generalmente se vuelve de consistencia acuosa y es destruido completamente. Cuando la infección ocurre en frutas ya desarrolladas, aparece una madurez parcial y prematura (26).

La capacidad de infectar las mazorcas en cualquier estado de desarrollo, así como el largo tiempo transcurrido desde la infección hasta cuando aparecen los primeros síntomas (3,43,71,74), hace ver el riesgo de introducir material contaminado a otras zonas o países especialmente a través de mazorcas enfermas sin síntomas externos (40).

Hasta el momento la única fuente de inóculo que se conoce para iniciar la infección es el conidio, el cual se produce sobre el estroma, en cadenas de maduración basípeta (26,34). Los conidios son diseminados principalmente por el viento, pero también pueden ser diseminados por agua (27), animales, insectos y el hombre (10,14,65,72).

Bajo condiciones in vitro el hongo ha sido descrito por varios autores (21,34,81), haciéndose referencia a ellos en el capítulo 3 de este trabajo.

Actualmente el combate de esta enfermedad se basa en reducir la cantidad de inóculo primario y la tasa de producción de nuevo inóculo o ambas (41). La reducción de la cantidad de inóculo inicial se hace mediante la poda sanitaria o eliminación de mazorcas enfermas (4,43). Mientras la velocidad de producción, de nuevo inóculo se reduce mediante la siembra de cultivares resistentes, la aplicación de fungicidas para proteger los frutos (43,44) y el uso de prácticas culturales que reducen las condiciones favorables para el desarrollo del patógeno (8,14).

Aún cuando se han hecho notables avances en el campo de la epidemiología y el combate de la enfermedad, es relativamente poco lo que se ha avanzado en el conocimiento de su biología y en la búsqueda de cultivares resistentes (12,71,80). Esto en parte se ha generado por falta de uniformidad en la metodología empleada especialmente en el manejo del hongo in vitro, por lo que la comparación y utilización de los resultados obtenidos

en estudios de este tipo se hace difícil entre investigadores de diversos países.

En lo referente a la biología del hongo, no se ha estudiado sistemáticamente el efecto de diferentes factores nutricionales y físicos sobre su crecimiento y esporulación, por lo que no se ha determinado un medio óptimo de composición definida que permita un manejo uniforme y eficiente del hongo in vitro.

También faltan estudios sobre la variabilidad del hongo, información necesaria para tener idea de su variabilidad morfológica, en patogenicidad y en virulencia; pues de existir habrá que tomar en cuenta este factor en las pruebas de selección de genotipos de cacao con resistencia a este patógeno.

Considerando la importancia de generar este tipo de información se planteó la siguiente investigación, que se dividió en tres partes.

En la primera se estudió el efecto de fuentes y dosis de carbono, nitrógeno y medios compuestos sobre el crecimiento y esporulación de M. rozeri. En la segunda parte se evaluó el efecto de la temperatura, período de luminosidad y pH inicial sobre las mismas características. En la tercera parte se determinó el comportamiento in vitro de 18 aislamientos del hongo de diferentes áreas cacaoteras de Costa Rica.