



**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA AGROPECUARIA DE MANABÍ
MANUEL FÉLIX LÓPEZ**

DIRECCION DE CARRERA DE AGRÍCOLA

**INFORME DE TRABAJO DE TITULACIÓN
PREVIA LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE INGENIERO
AGRÍCOLA**

**MODALIDAD:
PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN**

**TEMA:
PATOGENICIDAD, CARACTERIZACIÓN CULTURAL Y
SENSIBILIDAD *in vitro* DE *Phytophthora* spp. ASOCIADO A
MAZORCA DE CACAO**

**AUTOR:
PAÚL FRANCISCO LECTÓNG SOLÓRZANO**

**TUTOR:
ING. FEDERICO DÍAZ TRELLES, MG.**

CALCETA, JULIO 2020

DERECHOS DE AUTORÍA

Paul Francisco Lectong Solorzano, declara bajo juramento que el trabajo aquí propuesto es de mi autoría, que no ha sido presentado previamente para ningún grado o calificación profesional y que se han consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en el documento.

A través de la presente declaración cedo los derechos de propiedad intelectual a la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual y su reglamento.



.....
PAÚL F. LECTÓNG SOLÓRZANO

CERTIFICACIÓN DE TUTOR

ING. FEDERICO FERNANDO DÍAZ TRELLEZ certifica haber tutelado el proyecto **PATOGENICIDAD, CARACTERIZACIÓN CULTURAL Y SENSIBILIDAD *in vitro* DE *Phytophthora* spp. ASOCIADO A MAZORCA DE CACAO**, que ha sido desarrollada por **PAÚL FRANCISCO LECTÓNG SOLÓRZANO**, previa la obtención del título de Ingeniero Agrícola, de acuerdo al **REGLAMENTO PARA LA ELABORACIÓN DE TRABAJO DE TITULACIÓN DE LA UNIDAD DE TITULACION ESPECIAL** de la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López.



.....
ING. FEDERICO DÍAZ TRELLES, MG

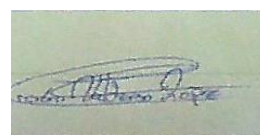
APROBACIÓN DEL TRIBUNAL

Los suscritos integrantes del tribunal correspondiente, declaramos que hemos APROBADO el trabajo de titulación **PATOGENICIDAD, CARACTERIZACIÓN CULTURAL Y SENSIBILIDAD *in vitro* DE *Phytophthora* spp. ASOCIADO A MAZORCA DE CACAO**, que ha sido propuesta, desarrollada y sustentada por **PAÚL FRANCISCO LECTÓNG SOLÓRZANO**, previa la obtención del título de Ingeniero Agrícola, de acuerdo al **REGLAMENTO PARA LA ELABORACIÓN DE TRABAJO DE TITULACIÓN** de la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López.



.....
Ing. Cristian Sergio
Valdivieso López, Mg.Sc

MIEMBRO



.....
Ing. Sergio Miguel
Vélez Zambrano, Mg.SC

MIEMBRO



.....
Ing Galo Alexander
Cedeño García, Mg. Sc

PRESIDENTE

AGRADECIMIENTO

Agradesco a DIOS por darme la vida y derramar bendiciones cada día y en cada paso que daba dentro de mi vida universitaria

A mis padres por ser el sustento primordial, apoyo incondicional, motor de vida, y sobre todo el impulso para lograr mis objetivos, brindándome siempre su amor y cariño absoluto.

A la universidad ESPAM MFL por abrirme las puertas y brindarme la oportunidad de una educación superior y permitirme crecer como persona.

A mi tutor de tesis el Ing. Federico Diaz Trelles por haberme guiado con su sabiduría y experiencia durante este trabajo.

A mi cotutor, Ing. Sergio Vélez Zambrano, quien fue un apoyo muy importante en la realización de este trabajo, con su conocimiento y predisposición para enseñar, me permitieron salir adelante.

A toda mi familia, hermana, sobrino, novia, tios, y amigos que estuvieron ahí brindándome siempre su apoyo para seguir adelante pese a los obstáculos que se presentaron en mi vida universitaria.

Paúl Francisco Lectómg Solórzano
AUTOR

DEDICATORIA

Dedico este trabajo primero a DIOS por su bendición y por haberme dado la fuerza para poder alcanzar mi objetivo, a mis padres por estar siempre a mi lado apoyándome y por la oportunidad que me brindaron de estudiar, a las demás personas que forman parte de mi vida y que de una u otra forma desinteresadamente me apoyaron dentro de mi carrera universitaria, a los docentes que aportaron con un granito de arena con sus conocimientos y que hoy es muy importante para el desenvolvimiento de mi vida profesional y a mi tutor y cotutor por la guía brindada a lo largo de la realización de este proyecto.

Paúl Francisco Lectóng Solórzano
AUTOR

CONTENIDO GENERAL

DERECHOS DE AUTORÍA	ii
CERTIFICACIÓN DE TUTORÍA	iii
APROBACIÓN DEL TRIBUNA	iv
AGRADECIMIENTO	v
DEDICATORIA	vi
RESUMEN	xi
ABSTRACT	xii
CAPÍTULO I. ANTECEDENTES	xii
1.1. PLANTEAMIENTO Y FORMULACIÓN DEL PROBLEMA	1
1.2. JUSTIFICACIÓN	2
1.3. OBJETIVOS	4
1.4. HIPÓTESIS	4
CAPITULO II. MARCO TEÓRICO	5
2.1. ORIGEN E IMPORTANCIA DEL CULTIVO DE CACAO	5
2.2. TAXONOMÍA DEL CULTIVO DE CACAO	5
2.3. DESCRIPCIÓN BOTÁNICA DEL CULTIVO DE CACAO	6
2.4. PRINCIPALES ENFERMEDADES DEL CULTIVO DE CACAO	7
2.5. ESCOBA DE BRUJA (<i>Moniliophthora perniciosa</i>)	7
2.6. MONILIASIS (<i>Moniliophthora roreri</i>)	8
2.7. MAZORCA NEGRA (<i>Phytophthora</i> spp)	9
2.8. PATOGENICIDAD Y AGRESIVIDAD <i>in vitro</i> DE CEPAS DE <i>Phytophthora</i> spp	11
2.9. SENSIBILIDAD <i>in vitro</i> DE <i>Phytophthora</i> spp	13
2.10. PRUEBAS DE CARACTERIZACIÓN CULTURAL DE <i>Phytophthora</i> spp	14
CAPÍTULO III. DESARROLLO METODOLÓGICO	16
3.1. UBICACIÓN	16
3.2. DURACIÓN	16
3.3. FASE DE LA INVESTIGACIÓN (ensayo 1)	16
3.4. FACTOR EN ESTUDIO	16
3.5. TRATAMIENTOS	16
3.6. DISEÑO EXPERIMENTAL	17
3.7. UNIDAD EXPERIMENTAL	17
3.8. VARIABLE A MEDIR	17

3.9.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	18
3.10.	MANEJO DEL EXPERIMENTO	18
3.11.	PATOGENICIDAD	20
3.12.	FASE DE LA INVESTIGACIÓN (ensayo 2)	20
3.13.	TRATAMIENTOS.....	21
3.14.	DISEÑO EXPERIMENTAL	21
3.15.	UNIDAD EXPERIMENTAL	21
3.16.	VARIABLE A MEDIR.....	22
3.17.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	22
3.18.	MANEJO DEL EXPERIMENTO	22
3.19.	FASE DE LA INVESTIGACIÓN (ensayo 3)	23
3.20.	TRATAMIENTOS.....	23
3.21.	DISEÑO EXPERIMENTAL	23
3.22.	UNIDAD EXPERIMENTAL	24
3.23.	VARIABLE A MEDIR.....	24
3.24.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	24
3.25.	MANEJO DEL EXPERIMENTO	24
	CAPITULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	26
4.1.	PRUEBAS DE PATOGENICIDAD Y AGRESIVIDAD	26
4.2.	PATOGENICIDAD DE LAS CEPAS DE <i>Phytophthora</i> spp	27
4.3.	AGRESIVIDAD DE <i>Phytophthora</i> spp, EN DOS CLONES DE CACAO	28
4.4.	EVALUACIÓN DE SENSIBILIDAD <i>in vitro</i> DE <i>Phytophthora</i> spp.....	32
4.5.	CARACTERIZACION CULTURAL DE LOS AISLADOS DE <i>Phytophthora</i> spp.....	34
4.6.	INDICE DE VELOCIDAD.....	36
4.7.	EVALUACIÓN DEL PATRÓN CULTURAL.....	38
	CAPITULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	40
5.1.	CONCLUSIONES.....	40
5.2.	RECOMENDACIONES.....	40
	BIBLIOGRAFÍA	41
	ANEXOS.....	45

CONTENIDO DE CUADROS Y FIGURAS

CUADROS:

Cuadro 3.1. Tratamientos de patogenicidad	16
Cuadro 3.2. Esquema del ADEVA	17
Cuadro 3.3. Tratamiento de sensibilidad <i>in vitro</i>	21
Cuadro 3.4. Esquema del ADEVA	21
Cuadro 3.5. Tratamiento de caracterización cultural <i>in vitro</i>	23
Cuadro 3.6. Esquema del ADEVA	24
Cuadro 4.1 Aislados de <i>Phytophthora</i> spp obtenidos de los diferentes sitios de muestreo	27
Cuadro 4.2. Análisis de varianza, Agresividad de <i>Phytophthora</i> spp, en clones de cacao (3 días).....	29
Cuadro 4.3. Análisis de varianza, Agresividad de <i>Phytophthora</i> spp, en clones de cacao (5 días).....	30
Cuadro 4.4. Análisis de varianza; sensibilidad <i>in vitro</i> de <i>Phytophthora</i> spp. al cuarto día de evaluación.....	33
Cuadro 4.5. Análisis de varianza en la prueba de, crecimiento micelial de <i>Phytophthora</i> spp, al cuarto día de evaluación.....	34
Cuadro 4.6. Patrones culturales de los aislados en diferentes medios de cultivo utilizados; CA: Carrot Agar, EMA: Extracto de malta agar, PDA: Papa Dextrosa Agar, SDA: Sabouraud Dextrosa Agar	38

FIGURAS:

Figura 4.1. Obtención de aislados de <i>Phytophthora</i> spp. (A) Colecta de frutos sintomáticos, provocados por <i>Phytophthora</i> spp de Clon "CCN-51"; (B) Aislados procedente de muestras de suelo; (C) Aislamiento de fragmentos; (D) Siembra de los aislados en medio de cultivo Agar PDA (Difco); (E) Reaislamiento y crecimiento del patogeno en medio de cultivo Agar Zanahoria; (F) Características microscópicas de <i>Phytophthora</i> spp; (G) Esporangios; (H) Clamidósporas.....	26
Figura 4.2. Prueba de patogenicidad y agresividad de <i>Phytophthora</i> spp. (A) inculación del patógeno en los materiales de siembra; (B) Medición de la agresividad; (C) frutos de cacao sintomáticos del clon CCN51 a los dos días de la inoculación; (C) Frutos de cacao clon EET-575 con síntomas, posterior a los 2 días de la inoculación	28
Figura 4.3. Patogenicidad y agresividad, Clon CCN51; (A) Cepa Cu-A9; (B) Cepa Ca-S5; (C) cepa Ca-S3 (D); Cepa Cu-A8.....	32
Figura 4.4. Patogenicidad y agresividad, Clon EET-575; (A) Cepa Cu-A9; (B) Cepa Cu-A8; (C) Cepa Ca-S3; (D) Cepa Cu-A3.	32
Figura 4.5. Sensibilidad <i>in vitro</i> a fungicidas de <i>Phytophthora</i> spp. (A) Azoxystrobin+Difenoconazole vs testigo; (B) Carboxin-Thiram vs testigo; (C) Mancozeb-Cymoxanil vs testigo; (D) Mancozeb-Metaxyl vs testigo; (E) Metalaxyl vs testigo.....	34

Figura 4.6. Diferencia del crecimiento micelial en varios medios de cultivo. (A) AZ vs PDA; (B) PDA vs EMA; (C) EMA vs AZ; (D) EMA vs SDA35

Figura 4.7. Patrones culturales de los aislados de *Phytophthora* spp. (A-B-C-D) Estrellado en Carrot Agar (CA) Cepa de mazorca Cu – A9; cepa de mazorca Ca – A4.1; cepa de suelo Cu – S8-2; cepa de suelo Ca – S5; (E-F-G-H) Aracnoide en extracto malta agar, (EMA) (I-J-K-L) Aracnoide en Papa dextrosa agar (PDA) (M-N-Ñ-O). Aracnoide en Sabouraud Dextrosa Agar (SDA).....39

RESUMEN

El propósito de esta investigación fue identificar morfológicamente el agente causal de la mazorca negra en cacao en los cantones de Quinindé y Calceta, como también evaluar el comportamiento patogénico, cultural y sensibilidad *in vitro* de aislados de *Phytophthora* spp provenientes de los cantones de Quinindé y Calceta. Esta investigación se ejecutó en los laboratorios de Biología Molecular de la ESPAM – MFL, Calceta – Ecuador. Se colectaron frutos sintomáticos en Calceta y Quinindé respectivamente, para la identificación del patógeno se aislaron las cepas y se las observaron en el microscopio, donde se visualizó las estructuras principales del patógeno como son esporangios y clamidosporas unidas al micelio, se realizó la patogenicidad y agresividad de las cepas obtenidas donde se corroboró posteriormente a los 2 y 3 días de la inoculación, los aislados de Quinindé fueron mas agresivos frente a los de la Calceta, los fungicidas (Carboxin-Thiram, Mancozeb-Cymoxanil, Mancozeb-Metaxyl y Metalaxyl), empleados en la prueba de sensibilidad *in vitro* controlaron el crecimiento del patógeno, en la prueba de caracterización cultural las cepas con mayor crecimientos fueron las sembradas en medio de cultivo Agar Zanahoria para ambos cantones, los patrones culturales que se presentaron en el ensayo de caracterización cultural fueron aracnoide en los medios EMA, PDA, SDA y estrellado en AZ.

Palabras clave: *Phytophthora* spp, Mazorca negra, Patogenicidad, Agresividad, Sensibilidad *in vitro*, Caracterización cultural.

ABSTRACT

The purpose of this investigation was to morphologically identify the causal agent of black pod in cocoa in the cantons of Quinindé and Calceta, as well as to evaluate the pathogenic, cultural and in vitro sensitivity behavior of isolates of *Phytophthora* spp from the cantons of Quinindé and Calceta. This research was carried out in the Molecular Biology laboratories at ESPAM - MFL, Calceta - Ecuador. Symptomatic fruits were collected in Calceta and Quinindé respectively, for the identification of the pathogen the strains were isolated and observed under the microscope, where the main structures of the pathogen such as sporangia and chlamydospores attached to the mycelium were visualized, pathogenicity and aggressiveness were performed of the strains obtained where it was corroborated 2 and 3 days after inoculation, the Quinindé isolates were more aggressive compared to the Calceta isolates, the fungicides (Carboxin-Thiram, Mancozeb-Cymoxanil, Mancozeb-Metaxyl and Metalaxyl), employed in the in vitro sensitivity test controlled the growth of the pathogen, in the cultural characterization test the strains with the highest growth were those sown in Agar Carrot culture medium for both cantons, the cultural patterns that were presented in the cultural characterization test They were arachnoid in the EMA, PDA, SDA media and crashed in AZ.

KEYWORDS

Phytophthora spp, Black cob, Pathogenicity, Aggressiveness, In vitro sensitivity, Cultural characterization

CAPÍTULO I. ANTECEDENTES

1.1. PLANTEAMIENTO Y FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

El cacao es uno de los cultivos de mayor impacto económico en el mundo sin embargo la producción viene disminuyendo relativamente debido a la enfermedades causada por microorganismos del complejo *Phytophthora* spp, conocida como mazorca negra originando pérdidas en rendimiento de hasta el 30 % del cultivo, asociado a siete especies siendo la más agresiva y de mayor daño en cacao *Phytophthora megakarya*, esta enfermedad produce daños severos y directos a la mazorca provocando una mancha de color café alrededor del fruto donde ocurre el principal daño (Matos *et al.*, 2011).

Moniliophthora roreri es otro microorganismo patógeno en el cultivo de cacao, causante de la moniliasis que afecta el fruto en cualquier etapa de desarrollo irrumpiendo el tejido interno provocando síntomas como desproporción de mazorca, necrosis y madures precoz, considerado como el agente principal de la disminución de la productividad de cacao a nivel mundial (Correa, 2014).

La moniliasis se manifiesta en la mayoría de los países americanos entre esos el Ecuador causando grandes pérdidas en la producción del cultivo debido a su devastadora y severa infestación, las estrategias de control tradicional han formado problemas colaterales como la resistencia genética del organismo en algunas regiones del país (Torres *et al.*, 2011).

En el país la producción de cacao se da mayormente en las zonas de Guayas, Los Ríos y Manabí con 22, 20 y 18 % de la producción total, con un rendimiento hasta el 2017 de 301,352 TM (ANECACAO, 2018). Actualmente uno de los factores más limitantes en la producción de cacao en el país es la presencia de enfermedades provocadas por microorganismos patógenos como *Moniliophthora roreri* (monilla), *M. pernicioso* (escoba de bruja), *Ceratocystis cacaofunesta* (mal de machete), *Phytophthora* spp. (mazorca negra), que conjuntamente con la zona donde se encuentra el cultivo, un manejo agronómico inadecuado y la agresividad del inoculo hace que la producción disminuya en su totalidad (Jaimes y Aránzazu 2010).

Arciniega (2017), manifiesta que la productividad en Ecuador se ve afectada por un sin número de factores como plagas, suelo, agua y enfermedades principalmente, dichas enfermedades son consideradas muy perjudiciales para la economía del productor debido a que ataca directamente el fruto disminuyendo la calidad del grano. Evans *et al.*, (2003) menciona que en el país se consideran que existen pérdidas que va del 16 al 80 % de la producción variando de acuerdo a la zona y cuidado del cultivo.

La comprensión apropiada de los patógenos que causan estas enfermedades es una necesidad de suma importancia para poder crear estrategias de control de dichos microorganismos, de acuerdo a esto el investigador se formula las siguientes interrogantes.

¿Los fungicidas utilizados en las pruebas de sensibilidad *in vitro* podrán ejercer control sobre los aislados de *Phytophthora* spp?

¿Los aislados colectados de *Phytophthora* spp pueden presentar patogenicidad en frutos sanos de cacao?

¿Los aislados de *Phytophthora* spp pueden mostrar diferente comportamiento de acuerdo al medio de cultivo?

1.2. JUSTIFICACIÓN

Ecuador es reconocido como pionero en producir cacao fino de aroma con 415,000 hectáreas sembradas hasta el 2016, produciendo 164,705 mil TM del producto. Este rubro genera ingresos y recursos en la mayor parte de la población del país, tanto como materia prima o industrializado (ANECACAO, 2013).

El cacao como fuente de ingreso muy importante de la mayor parte de los agricultores del país se ve afectado severamente por *Phytophthora* spp conocida como mazorca negra, su control ha sido un problema para los productores ya que desde hace algunos años se demostró que no es un hongo y la reacción a fungicidas no es la ideal por este motivo se requiere el óptimo conocimiento de la patogenicidad de las cepas del microorganismo y su agresividad en las diferentes especies existentes (Delgado y Bosman, 2010).

Los síntomas de *M. royeri* son similares a *Phytophthora* y la fusión de estos dos agentes pueden ser muy perjudiciales para una plantación de cacao, por ello es fundamental conocer las características de estos patógenos, desde su genética, morfología, patogenicidad, reacción a productos químicos y hasta su adaptación a ciertos lugares para establecer nuevas estrategias de control en el hábitat del microorganismo (Suárez y Rangel, 2013).

Las prácticas culturales son las técnicas más empleadas para contrarrestar las enfermedades que afectan el cultivo de cacao, se utiliza también las técnicas de control a través de fungicidas, sin embargo no son las idóneas debido al elevado costo y desconocimiento del productor, provocando erróneas y excesivas aplicaciones del producto, por ello es necesario seleccionar el fungicida óptimo para neutralizar esta enfermedad y que el producto no altere las condiciones ambientales de la naturaleza.

Con el fin de establecer el fungicida adecuado que controle el desarrollo de los microorganismos asociados a enfermedades de cacao se lleva a cabo la sensibilidad *in vitro*, la patogenicidad en frutos sanos con el objetivo de verificar la agresividad del patógeno y la caracterización cultural para corroborar el crecimiento de la cepa en diferentes medios de cultivos nutricionales.

1.3. OBJETIVOS

1.3.1. OBJETIVO GENERAL

- Evaluar el comportamiento patogénico, cultural y sensibilidad *in vitro* de *Phytophthora* spp de los cantones de Quinindé y Calceta asociado a enfermedades de mazorca de cacao (*Theobroma cacao* L).

1.3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar cuál de los aislados de *Phytophthora* spp de ambas zonas, presenta mayor patogenicidad en frutos sanos en dos clones de cacao.
- Establecer la sensibilidad *in vitro* a fungicidas de *Phytophthora* spp
- Caracterizar culturalmente los aislados de *Phytophthora* spp de los cantones de Quinindé y Calceta, en diferentes medios de cultivo.

1.4. HIPÓTESIS

Los aislados de *Phytophthora* spp de ambas zonas, presentaran patogenicidad en frutos sanos de cacao.

Los productos fúngicos manipulados en la prueba de sensibilidad *in vitro* ejercerán control sobre los aislados de mazorca de cacao.

Las cepas obtenidas de *Phytophthora* spp mostraran diferentes tasas de crecimientos en distintos medios de cultivos.

CAPITULO II. MARCO TEÓRICO

2.1. ORIGEN E IMPORTANCIA DEL CULTIVO DE CACAO

El cacao (*Theobroma cacao* L). cuya planta es originaria de América principalmente de la parte sur y norte del continente extendiéndose especialmente en los países de Ecuador, Colombia, Brasil y Perú, tiene mucha importancia en el ámbito nacional e internacional debido a ser un rubro de considerable ingreso en el mundo. El cultivo fue evolucionando con el pasar del tiempo y se distribuyó alrededor de todo el mundo con variedades predominantes y de gran valor, con particularidades genéticas específicas como son Nacional, Criollo, Trinitario y Forastero (Motamayor *et al.*, 2002).

La jerarquía del cultivo del cacao radica en la importancia que esta toma para los agricultores y las industrias procesadoras de chocolates, donde este cultivo juega el papel más importante, debido a las fuentes de empleos que se genera en el país, siendo su explotación el recurso e ingreso para más de miles de familias que se dedican a la producción, comercialización e industrialización del producto (INIAP, 2009).

2.2. TAXONOMÍA DEL CULTIVO DE CACAO

Según Artica (2008) la taxonomía del cultivo del cacao es la siguiente:

Reino	Vegetal
Clase	Dicotiledonea
Orden	Malvales
Familia	<i>Esterculacia</i>
Genero	<i>Theobroma</i>
Especie	<i>Cacao</i>

2.3. DESCRIPCIÓN BOTÁNICA DEL CULTIVO DE CACAO

La planta del cacao es perenne con polinización cruzada y se puede reproducir de forma sexual y asexual, su botánica general se describe a continuación: (Artica, 2008).

El tallo de la planta de cacao es erecto que puede llegar a medir hasta un aproximado de 1,50 m de altura, donde emergen las ramas en un total de 3 a 5 dependiendo del cuidado del cultivo permitiendo el crecimiento de las ramificaciones (De la Cruz *et al.*, 1995).

Para el mismo autor las ramas del cacao son de dos tipos diferentes dependiendo de su crecimiento, que puede ser vertical llamado chupón consta de hojas alternas pero su crecimiento es limitado debido que con el tiempo dará origen a lo llamado abanico terminal. Mientras que el crecimiento horizontal es llamado abanico con hojas alternas y crecimiento indefinido, este tipo de crecimiento da origen a ramas laterales del mismo tipo.

La raíz del cultivo del cacao está constituida por una raíz principal pivotante que puede llegar a medir aproximadamente 1m de profundidad. Cuando ocurre siembra de cultivos clonales no existe una raíz pivotante sino raíces prolfieras que sirven para fijar la planta al suelo (Navarro y Mendoza, 2012).

Las hojas son de color verde oscura y delgadas cuando la planta se encuentra en estado adulto se hallan adheridas a las ramas por medio del peciolo. Y dentro del peciolo se encuentra la yema, donde se producen nuevas ramas que se usan para injertación (Rondón y Cumana, 2005).

El mismo autor menciona que el cultivo del cacao es cualífero, es decir sus flores y frutos emergen en partes más viejas de la planta como ejemplo tronco y ramas. Las flores emergen de donde existían hojas anteriormente, estas flores son hermafroditas es decir con ambos sexos que puede usarse para el cruce genético. El fruto es una baya de distintos colores dependiendo de la variedad, su tamaño aproximado es de 30 cm de longitud y 10 de ancho que contiene

cercanamente de 20 a 40 semillas, dentro de ella se encuentra el embrión que sirve para próximas reproducciones.

2.4. PRINCIPALES ENFERMEDADES DEL CULTIVO DE CACAO

El cultivo de cacao alrededor del mundo disminuye intensivamente su producción y calidad debido principalmente a enfermedades causadas por microorganismos patógenos pertenecientes al reino fúngico como la monilla ocasionada por el hongo (*Moniliophthora roreri*), escoba de bruja originada por (*Moniliophthora perniciosa*) y mazorca negra producida por (*Phytophthora* spp) del reino chromista. Todas estas enfermedades ocasionadas por estos microorganismos fitopatógenos incrementan el costo de producción del cultivo provocando pérdidas económicas significativas a los productores (Hebbar, 2007).

Actualmente estas enfermedades impactan desfavorablemente la producción mundial del cacao induciendo pérdidas que pueden llegar al 30% del potencial productivo, considerando a las causadas por los microorganismos del género *Moniliophthora* como las mas desvadoras y agresivas para los cultivos b de cacao (Ayala y Navia, 2008).

2.5. ESCOBA DE BRUJA (*Moniliophthora perniciosa*)

Para Aime y Phillips Mora (2005) *M. perniciosa* es el agente causal de una de las 3 enfermedades principales del cultivo del cacao conocida como escoba de bruja, este hongo inicia su ciclo de vida en la planta cuando las esporas conocidas como medio de propágulos del microorganismo infectan los tejidos meristemáticos del cultivo del cacao debilitando la planta y reduciendo su producción.

2.5.1. SINTOMATOLOGÍA

La sintomatología de éste microorganismo patógeno es bastante variada, debido a que afecta a casi toda la planta o puntos de crecimiento, cuando infecta brotes y ramas esta enfermedad provoca hinchazón en la parte afectada, dando paso a formación de hojas con apariencia de escoba de bruja, cuando la enfermedad se manifiesta en cojinetes florales existe la formación de las escobas de brujas

y en ciertos casos frutos afectados en su formación normal, tomando formas de chirimoyas (frutos partenocarpicos) (Meinhardt *et al.*, 2008).

2.6. MONILIASIS (*Moniliophthora roreri*)

La moniliasis es una enfermedad producida por un hongo fitopatógeno perteneciente al genero *Moniliophthora*, es considerada la enfermedad mas agresiva y destructiva del cultivo del cacao ocasionando pérdida desde el 30% hasta su totalidad en zonas donde se presente la enfermedad (Krauss, 2010).

2.6.1. ORIGEN DE LA ENFERMEDAD

La moniliasis era considerada originaria del Ecuador sin embargo mediante estudios moleculares por científicos experto en el tema se pudo evidenciar que la enfermedad se reportó en Colombia como su lugar de origen y distribuida en casi toda Latino America en países como Venezuela, Perú, Panamá, Honduras, Guatemala entre otros que se ven afectado por la agresividad del patógeno (Phillips–Mora, 2003).

2.6.2. CICLO DE VIDA DEL HONGO

M. roreri es un hongo que posee un nivel elevado de adaptación a ambientes distintos, puede proliferar a condiciones climáticas (muy secas o muy húmedas) y altos niveles de altitudes (hasta 1000msnm), en Ecuador la enfermedad se puede manifestar en casi todo el año comenzando en la época seca sin embargo su gran infestación se da cuando encuentra la humedad óptima para reproducirse (Urquillas, 2004).

Las esporas del hongo es el único inóculo de la enfermedad y los frutos de especies como *Theobroma* y *Herrania* actúan como hospederos donde el microorganismo puede afectar, su germinación se da en presencia de una película de agua cerca de los 24°C, en condiciones *in vitro* las esporas conservan su viabilidad y poder infectivo aproximadamente 22 meses a partir de la esporulación (Merchán, 1981).

2.6.3. SINTOMATOLOGÍA

Los síntomas de la enfermedad en mazorcas de cacao generalmente empiezan con pequeñas lesiones acuosas, desproporción, madurez precoz y manchas de color chocolate. Estas afectaciones pueden suceder en cualquier período de desarrollo del fruto, sin embargo varían con la edad del fruto y con la severidad del ataque. Pero son más afectables las mazorcas de estado inicial hasta los 3 meses de edad (Evans, 2007).

Después de irrumpir el patógeno en el fruto sano de la planta este se desarrolla intercelularmente (fase biotrófica), la mancha de color café provocada por el hongo desarrolla un micelio blanco a partir de los 4 a 5 días (fase necrótica), luego de esto los frutos se secan y se momifican permaneciendo adheridos al tallo de las plantas, estos frutos afectados producen gran cantidad de esporas constituyéndose fuente principal de inóculo para posteriores infecciones en otras plantaciones (López y Martins, 2005).

2.7. MAZORCA NEGRA (*Phytophthora spp*)

Phytophthora es el agente causal de la pudrición de la mazorca del cacao, este microorganismo patógeno es considerado un pseudo hongo debido a sus similitudes con las halgas, esto fue detectado por medio de estudios moleculares del patógeno, por esta razón se lo considera dentro del grupo de los chromista, este falso hongo provoca reducción de la producción total del cacao principalmente en países Africanos como Nigeria, y Ghana, donde la agresividad del patógeno es mucho más determinante y en nuestro continente en países como Brasil, y Venezuela (Mora, 2009).

2.7.1. ORIGEN Y DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA DE LA ENFERMEDAD

Estudios moleculares muestran a África como el centro de origen de la enfermedad, se originó a partir de la introducción de las primeras plantas a este continente, este patógeno se encuentra distribuido alrededor del mundo con distintas especies de acuerdo a la zona geográfica, material genético y hospedero, en el cultivo de cacao se han reportado siete especies diferentes de

Phytophthora patógenas que son: *P. palmivora*, *P. megakarya*, *P. capsici*, *P. citrophthora*, *P. nicotianae* var. *parasitica*, *P. megasperma* y *P. arecae* (Ali et al., 2016).

2.7.2. TAXONOMÍA DE *Phytophthora* spp

Según Bolaños et al. (2017) las especies de *Phytophthora* que ocasiona la mazorca negra en cultivos de cacao se localizan asociadas de la siguiente forma:

Reino: Chromista

División: Oomycota

Subdivisión: Mastigomicotina

Clase: Phycomycetes

Subclase: Oomycetes

Orden: Peronosporales

Familia: *Pythiaceae*

Género: *Phytophthora*

2.7.2. ETIOLOGÍA

La enfermedad denominada mazorca negra o pudrición de mazorca de cacao es ocasionada por varias especies de *Phytophthora*. Este genero abarca varios agentes patógenos causales de enfermedades en un sin número de plantas hospederas como papas, cacao, pimiento entre otras. Las especies de *Phytophthora* constan de una fase haploide y su pared celular compuesta esta de celulosa, careciendo de quitina, características que juegan un papel importante para diferenciarse de los hongos y clasificarse dentro del reino chromista (Tahi et al., 2006).

2.7.3. CICLO DE VIDA DEL PATÓGENO

Dentro del ciclo de vida del microorganismo se involucra los dos estados, sexual y asexual, que se presentan dependiendo de las condiciones ambientales de la zona donde se encuentre el patógeno, sin embargo en nuestra zona debido a las

condiciones climáticas y el ambiente predomina el estado asexual, donde inicia la efectación a través del inóculo que puede ser frutos enfermos en planta, suelo o resto de cosecha, esta inoculación inicia cuando el esporangio germina en condiciones óptimas de humedad y temperatura liberando las zoosporas, esta estructura reproductiva cumple dos papeles fundamentales dentro de la vida del patógeno, sirve como transmisión del microorganismo de un hospedero hacia otro y como orientador del patógeno hacia los sitios de infección (Judelson y Blanco, 2005).

2.7.4. SINTOMATOLOGÍA

Una de las primeras observaciones en campo sobre la enfermedad causada por este microorganismo patógeno, se da sobre la superficie de la mazorca con una leve lesión provocando una pequeña mancha color café, en pocas semanas la mancha puede cubrir totalmente la mazorca. El tejido interno del producto también se mancha, descomponiendo el mucílago, hasta llegar a las almendras, que son fáciles de extraer, generalmente, aún estando infectadas. Sin embargo estas almendras pueden permanecer sin daño durante días, desde que inicia la afectación en la casacara preveniendo pérdidas realizando cosechas frecuentes, esto se da en frutos adultos cuyas afectaciones no alcanzan a las semillas y pueden ser cosechados con facilidad reduciendo la pérdida de la producción (Bailey y Meinhardt, 2016).

En circunstancias de elevada humedad relativa, aproximadamente de 3 a 6 días la lesión se propaga y el oomiceto origina esporangios blanquecinos en el área del fruto. En frutos jóvenes, los síntomas más comunes son: manchas, rugosidades y posterior ennegrecimiento, pudiendo ser fácilmente confundido con marchites fisiológica (McMahon y Purwantara, 2004).

2.8. PATOGENICIDAD Y AGRESIVIDAD *in vitro* DE CEPAS DE

Phytophthora spp

Según Chin (2001) la patogenicidad es la capacidad que posee un microorganismo infeccioso para producir una enfermedad en un huésped

La patogenicidad del microorganismo va depender de muchos factores como por ejemplo la agresividad de la cepa, la zona donde este se encuentre, el ambiente donde se desenvuelva y la capacidad de vulnerabilidad del hospedero (Scheffer, 1997).

Gómez *et al.* (2018) realizó investigaciones de patogenicidad de *Phytophthora capsici* y *Rhizoctonia solani* en plantas de ají (*Capsicum annuum*). Obteniendo ocho aislados de *P. capsici* y dos de *R. solani*. Se identificó que una vez introducido el inóculo de la cepa de *P. capsici* esta muere aproximadamente en 21 días y que los daños en las plantas se pueden presentar aproximadamente a los 10 días después de la inculación de la cepa, y se pudo identificar diferencias significativas entre el origen del inóculo de las cepas.

En pruebas realizadas por Almaraz *et al.* (2016) con cepas de *Phytophthora cinnamomi* en plantas de *Pseudotsuga mensiezi*, se comprobó que las plantas empezaron a manifestar síntomas como marchitez de los brotes, clorosis, muerte de ramas, cancro en el tallo y necrosis. La cepa aislada codificada como COL-A del Arrayanal fue la primera en causar síntomas visibles a los 67 días apartir de la inoculación y la muerte de la planta a los 120 días después de la inoculación, también en este ensayo se observó que la cepa ya mencionada fue la primera en cubrir la caja petril a los cinco días después de haberse sembrado

En estudios realizados por Campelo *et al.* (1982) en Brasil determinaron la virulencia y agresividad de algunas especies de *Phytophthora* ya identificadas como *P. citrophthora*, *P. palmivora*, *P. capsici*, estas fueron inoculadas en frutos sanos y tallos de plantas de cacao con 5 meses de edad, donde se mostró que *P. citrophthora* es mas agresiva que las otras especies en los frutos, a diferencia de *P. palmivora* que fue la mas agresiva en plantulas, este estudio fue confirmado por (Lawrence *et al.*, 1982)

Decloquement (2018) realizó una investigación con diferentes clones de cacao como CCN 51 FB206, PS1319, VB1151 y MP01-104, donde comprobó que el 52, 7% de los aislamientos fueron patógenos en frutos sanos de cacao en el clon CCN 51, ocasionandole síntomas típico como la mancha chocolate hasta 7 días posteriores a la inoculación de la cepa, la investigación la realizó con cepas de *Phytophthora* sp como probable nueva especie y con *Phytophthora palmivora*,

donde comprobó que las cepas de la nueva especie fueron mas agresivas que las de *P. palmivora* independientemente del material de cacao utilizado.

Otra investigación efectuada por Kudjordjie (2015) donde realiza inoculación de cepas de *Phytophthora* en frutos de cacao, demostró diferentes tiempos de manifestación del síntoma en los frutos sanos y todo varía de acuerdo a la especie en estudio por ejemplo se observó que los aislados de *P. palmivora* registraron los períodos de infección más cortos 2 días después de la inoculación. Y todas los frutos de cacao inoculados con *P. megakarya* mostrarn síntomas de la enfermedad después de 5 días.

En estudios realizados para demostrar la incidencia de las enfermedades de cacao en diferentes genotipo por Arciniegas y Philips (2004) y luego por Cardenas (2016). Se demostraron la ligera suceptibilidad del clon CCN51 a este patógeno en diferencia a otros clones evaluados como son ICS95 y FSA12

2.9. SENSIBILIDAD *in vitro* DE *Phytophthora* spp

El común error cometido por los agricultores a la hora de realizar la aplicación de los productos fúngicos, es la selección de fungicidas específicos y en aplicaciones repetidas, debido a que el modo de acción del fungicida es limitado lo que contribuye a la resistencia de las poblaciones de los patógenos existentes (Gisi *et al.*, 2002). Las pruebas de sensibilidad *in vitro* son utilizadas con el fin de comprobar el fungicida óptimo que inhiba el crecimiento del patógeno y tambien identificar los productos al que el patógeno a creado resistencia (Pfaller, 2005).

Riveros *et al.* (2003) aislaron cepas de *P. infestans* de cultivo de papa y lo sometieron a prueba de sensibilidad *in vitro*, con el objetivo de observar la resistencia o inhbición del patógeno a metalaxil, como resultado obtuvieron que el total de las cepas desarrollaron colonias con crecimiento entre el 80 a 100 % del crecimiento normal observado en el testigo.

En una investigación realiaza en Machala – Ecuador , evaluaron el efecto de productos fúngicos *in vitro* sobre *Phytophthora* spp, los fungicidas utilizados fueron Metalaxyl-M+Mancozeb, Difeconazol, Azoxystrobin y Sulfato de cobre

pentahidratado, a una dosis de 1000ppm (1 microlitro). Como resultado obtuvieron que a los 3, 9 y 15 días posteriores a la inoculación del hongo los fungicidas Azoxystrobin, Sulfato de cobre pentahidratado y Testigo alcanzaron el crecimiento total de la caja 4.5 mm a diferencia del Metalaxil- M+Mancozeb y Difeconazol que alcanzaron un radio de 0 y 3.4 mm respectivamente. La acción antifúngica del Metalaxil-M+Mancozeb, observada a los tres, nueve y quince días después de la inoculación fue del 100% de control, inhibiendo totalmente el crecimiento micelial y la germinación de oosporas del hongo *Phytophthora* sp (Calva y Jaramillo 2016).

2.10. PRUEBAS DE CARACTERIZACIÓN CULTURAL DE

***Phytophthora* spp**

Medina *et al.* (2018) menciona que la identificación taxonómica de especies de *Phytophthora* está basada en caracteres morfológicos, temperaturas de crecimiento y velocidades de colonización en medios de cultivo, más la secuenciación de ADN que es una herramienta en la identificación de patógenos de plantas de importancia económica, los mismos autores realizaron pruebas de caracterización cultural de *P. palmivora* en palmas en Colombia, una vez obtenidos los aislados usaron como medios de cultivo Agar Zanahoria, jugo V8 y Agar Avena, adecuados con antibióticos, los valores mas alto de crecimiento lo obtuvo el Agar Avena con un aproximado de 21 mm día⁻¹, seguido por Agar Zanahoria y jugo V8, sin embargo en todos los medios de cultivo se presentó micelio blanco y estrellado.

Erwin & Ribeiro (1996) recalcan algunas formas de patrones culturales propios de los Oomycetos pertenecientes al género *Phytophthora*, entre ellas se encuentran la forma estrellada para *P. palmivora* y forma rosáceo para *P. cinnamomi* y la forma crisantemo para *P. citrícola*.

Iribarren (2015) realizó ensayos experimentales con aislados de *P. nicotianae* y *P. capsici* en Agar Manzana tomate, Agar Arina de Maíz, jugo V8 y Papa Dextrosa Agar, donde evidenciaron que los aislados obtuvieron el mayor y mas rápido crecimiento de colonias en V8 presentando micelios estrellado, con respecto a los demás medios, Appiah *et al.* (2003). menciona que cuando el

crecimiento del patógeno es de forma estrellada, se cree que son aislamientos posibles de de *P. palmivora*, por la información conocida de esta especie.

Decloquement (2018) realizó una caracterización cultural con *Phytophthora* sp. y *P. palmivora* en medios de cultivo BDA, V8, EMA y CA, donde evidenció que en los aislados de *Phytophthora* sp, se obtuvo un índice de velocidad de crecimiento (IVCM) aproximadamente de 5,4 mm día⁻¹, mientras que *P. palmivora* creció a una tasa de 1.27 mm día⁻¹.

En los medios de CA, MEA y V8, *Phytophthora* sp. presentó IVCM de aproximadamente 13, 10 y 13 mm día⁻¹, respectivamente. y *P. palmivora* manifestó tasas de crecimiento aproximadas a 11, 7 y 10 mm día⁻¹ en los medios AZ, MEA y V8, respectivamente.

CAPÍTULO III. DESARROLLO METODOLÓGICO

3.1. UBICACIÓN

El trabajo de investigación se ejecutó en el laboratorio de Biología Molecular de Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López, ubicada en el sitio el Limón, Cantón Bolívar de la Provincia de Manabí, ubicada geográficamente entre las coordenadas 0°49'23'' Latitud Sur; 80°11'01'' Longitud Oeste y una altitud de 15 msnm.¹

3.2. DURACIÓN

La presente investigación tuvo una duración de seis meses.

3.3. FASE DE LA INVESTIGACIÓN (ensayo 1)

Agresividad de *Phytophthora* spp en frutos sanos de cacao.

3.4. FACTOR EN ESTUDIO

Cepas de *Phytophthora* spp. Se realizó dos ensayos separados con cada material genético de cacao (EET-575 y CCN-51).

3.5. TRATAMIENTOS

Cuadro 3.1. Tratamientos de patogenicidad

A1=Cepa 1	A11=Cepa 11	A21=Cepa 21
A2=Cepa 2	A12=Cepa 12	A22=Cepa 22
A3=Cepa 3	A13=Cepa 13	A23=Cepa 23
A4=Cepa 4	A14=Cepa 14	A24=Cepa 24
A5=Cepa 5	A15=Cepa 15	A25=Cepa 25
A6=Cepa 6	A16=Cepa 16	A26=Cepa 26
A7=Cepa 7	A17=Cepa 17	A27=Cepa 27
A8=Cepa 8	A18=Cepa 18	A28=Cepa 28
A9=Cepa 9	A19=Cepa 19	A29=Cepa 29
A10=Cepa 10	A20=Cepa 20	A30=Cepa 30

¹ Datos tomados en la estación meteorológica del INANMI, situada en la ESPAM MFL, correspondiente al periodo, Enero 2011 abril 2019.

3.6. DISEÑO EXPERIMENTAL

3.6.1. ESQUEMA DEL ADEVA

En este ensayo se utilizó un Diseño completamente al azar (DCA).

Cuadro 3.2. Esquema del ADEVA

ADEVA		
FUENTES DE VARIACIÓN	FORMULA	GRADOS DE LIBERTAD
Total	tr-1	119
Tratamientos	t-1	29
Error experimental	t(r-1)	90

3.7. UNIDAD EXPERIMENTAL

El ensayo se estableció con 30 tratamientos 4 réplicas y 120 unidades experimentales, Cada unidad experimental se conformó por un fruto sano, Se evaluaron dos clones de cacao “EET-575 y CCN- 51” con dos ensayo por separado por cada material genético

3.8. VARIABLE A MEDIR

3.8.1. CRECIMIENTO DEL PATÓGENO EN FRUTOS SANO

- Longitud horizontal del progreso del patógeno en las mazorcas de cacao. Se midió en dirección a la longitud del fruto de cacao.

Esta variable se midió con una cinta métrica en ambas perturbaciones del patógeno, los dos valores del crecimiento se agruparon y se consiguió un promedio, los resultados fueron indicados en (mm). Los datos se evaluaron cada dos días a partir de la inoculación de la cepa del microorganismo en los frutos sanos, es decir (1-3-5 días).

$$\text{Crecimiento del patógeno} = \frac{\text{Longitud 1} + \text{Longitud 2}}{2}$$

3.9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis de datos se realizó a través del ADEVA y la separación de medias con la prueba de Tukey 5% de probabilidades de error..

3.10. MANEJO DEL EXPERIMENTO

A) Recolección de mazorcas con síntomas de mazorca negra (*Phytophthora* spp)

Se colectaron muestras de cacao (frutos) que manifestaron síntomas característicos de infección provocada por *Phytophthora* spp, (manchas circulares de color café oscuro). También, con el fin de evaluar una posible relación entre la presencia de estructuras del patógeno *Phytophthora* spp sobreviviente en el suelo y la observación de los síntomas en los frutos, fueron recolectadas muestras de suelo, en el área de riego, cerca (50cmx20cm) de la base de las plantas de cacao. Las muestras de mazorcas recolectadas fueron acondicionadas en bolsas de papel, y las muestras de suelo en bolsas plásticas del tipo Zip-loc. Se añadió agua destilada esterilizada (ADE) para humedecer las muestras cuando fue necesario. Las mismas se almacenaron en cajas de isopor y conducidas al Laboratorio de Biología Molecular de la ESPAM MFL.

Los frutos sintomáticos se recolectaron con ayuda de una tijera de podar (desinfectada superficialmente en una solución de hipoclorito de sodio 2% (v / v), y obtenidas las medidas de distancia entre el fruto (pedúnculo) y suelo. En los puntos donde fueron recolectados frutos, se obtuvieron muestras de suelo, se muestreó a (5-10 cm de profundidad) para aislamiento de *Phytophthora* spp.

Estas muestras fueron colectadas bajo permiso del Ministerio de Medio Ambiente mediante el contrato Marco **MAE-DNB-CM-2018-0095**

B) Desinfección y obtención de los aislados de frutos

Frutos con síntomas característicos del microorganismo se lavaron con agua común y jabón, y secados en papel. Se manejó fragmentos (4 cm x 4 cm) de la región de transición entre tejido enfermo y sano, y llevados a cámara de flujo laminar. La desinfección superficial del tejido vegetal se realizó en alcohol 70% (1 min), hipoclorito de sodio (2,5% v / v, 5 min), lavados tres veces en ADE, Los

segmentos desinfectados se colocaron en caja Petri (90 mm Ø) y secados en papel toalla esterilizada.

C) Siembra del aislado en el medio

Para el efecto del aislamiento de *Phytophthora* spp se obtuvieron fragmentos de 0,5 cm de la región interna del tejido vegetal (50% enfermo y 50% sano) y se colocaron en medio de cultivo PDA. Se utilizó el medio de cultivo PDA (papa dextrosa agar) con una concentración de 39 gramos por litro de agua preliminarmente autoclavado, antes de la dispensación del medio de cultivo en las cajas Petri se añadió antibiótico (ampicilina, gentamicina) y fungicida (Pentacloronitrobenzeno.) con el fin de evitar una posible contaminación por hongos y bacterias. La siembra de los aislados se realizó en la cámara de flujo laminar y se sembraron cinco fragmentos de 0,5 cm por caja Petri (90 mm Ø), luego se sellaron las cajas con plástico, Una vez realizada la siembra se incubaron los cultivos a 26 ± 2 °C durante tres días hasta notar el crecimiento de las colonias fúngicas.

D) Repicaje de *Phytophthora* spp

Se prepararon cajas Petri (90 mm Ø) con 20 mL del medio de cultivo Agar Zanahoria, se añadió antibiótico (ampicilina, gentamicina) para evitar una contaminación de agentes externos, esto se hace para obtener cultivos puros del patógeno de interés (*Phytophthora* spp) a partir del cultivo o fuente de inóculo inicial que se aisló previamente. La siembra se la realizó en la cámara de flujo laminar con la ayuda de una aguja previamente esterilizada, posterior a la siembra las cajas Petri con el patógeno se incubaron a 26 ± 2 °C durante 15 días.

E) Obtención de los aislados de suelo

Para el aislamiento de *Phytophthora* spp de las muestras de suelo, se utilizaron frutos de cacao como trampa. Los frutos sanos de cacao (2 a 3 meses) “clon CCN51” fueron lavados en agua corriente y jabón, secados en papel, se realizó una lesión de (10 mm Ø y 10 mm de profundidad) con ayuda de un sacabocado (previamente esterilizado). Se insertó una parte de la muestra del suelo dentro del orificio del fruto sano. Las muestras de suelo se humedecieron con ADE, depositadas en la superficie de los frutos (con lesión), y mantenidos en cámara

húmeda a 23 ± 2 °C durante cinco días. Los frutos que presentaron síntomas de pudrición se utilizaron para realizar el aislamiento indirecto del microorganismo en medio PDA con antibióticos y fungicida.

3.11. PATOGENICIDAD

La prueba se realizó con el objetivo de determinar la capacidad infectiva de los aislados de *Phytophthora* spp, sobre mazorcas sanas de cacao, en los clones ETT- 575 y CCCN-51

A) Colecta de las mazorcas

Se colectaron mazorcas de cacao sanas de dos a tres meses de edad aproximadamente, en el área de Unidad de Docencia, Investigación y Vinculación de Cacao de la ESPAM MFL. Utilizando como materiales una tijera de podar previamente desinfectada con alcohol al 70%. Los frutos fueron trasladados al laboratorio de biología molecular de la ESPAM MFL, donde se lavaron con agua común y jabón líquido (1 minuto), consecutivamente enjuagadas con agua purificada y posteriormente se procedió a la inoculación del patógeno.

B) Patogenicidad de *Phytophthora* spp

De los aislados obtenidos, con ayuda de un sacabocados (5 mm Ø) se efectuaron varios discos del patógeno de cada cepa, los cuales fueron extraídos de la caja Petri con palillos de dientes previamente esterilizados para ser inoculados y dejando colocado el disco en las mazorcas de dos a tres meses de edad aproximadamente, la inoculación de los discos con el patógeno se realizaron en ambos extremo de la mazorca en una misma dirección, luego las mazorcas inoculadas se ingresaron a una cámara húmeda realizada con una funda (10 cm x 16 cm) y papel toalla humedecido con agua destilada. Cada aislado constó de cuatro repeticiones. Los datos se evaluaron en los días (1-3-5) posterior a la inoculación del patógeno. El crecimiento se midió con una cinta métrica tomando datos de ambas afectaciones.

3.12. FASE DE LA INVESTIGACIÓN (ensayo 2)

Sensibilidad *in vitro* del patógeno *Phytophthora* spp.

3.13. TRATAMIENTOS

Los tratamientos se conformaron de fungicidas y dosis (cuadro 3.3.)

Cuadro 3.3. Tratamiento de sensibilidad in vitro

n° TRATAMIENTOS	FUNGICIDAS	Dosis	Descripción del tratamiento	A	B	Códigos
1	Azoxystrobin+Difenoconazole	0,075 mL	Azoxystrobin+Difenoconazole/0,075 mL	1	1	A1B1
2		0,12 mL	Azoxystrobin+Difenoconazole/0,12 mL	1	2	A1B2
3		0,17 mL	Azoxystrobin+Difenoconazole/0,17 mL	1	3	A1B3
4	Carboxin-Thiram	0,25 mL	Carboxin-Thiram/0,25 mL	2	1	A2B1
5		0,30 mL	Carboxin-Thiram/0,30 mL	2	2	A2B2
6		0,35 mL	Carboxin-Thiram/0,35 mL	2	3	A2B3
7	Mancozeb-Cymoxanil	0,32 g	Mancozeb-Cymoxanil/0,32 g	3	1	A3B1
8		0,37 g	Mancozeb-Cymoxanil/0,37 g	3	2	A3B2
9		0,42 g	Mancozeb-Cymoxanil/0,42 g	3	3	A3B3
10	Mancozeb-Metaxyl	0,20 g	Mancozeb-Metaxyl/0,20 g	4	1	A4B1
11		0,25 g	Mancozeb-Metaxyl/0,25 g	4	2	A4B2
12		0,30 g	Mancozeb-Metaxyl/0,30 g	4	3	A4B3
13	Metalaxyl	0,10 g	Metalaxyl/0,10 g	5	1	A5B1
14		0,15 g	Metalaxyl/0,15 g	5	2	A5B2
15		0,20 g	Metalaxyl/0,20 g	5	3	A5B3
16	TESTIGO	TESTIGO	TESTIGO	TESTIGO	TESTIGO	TESTIGO

3.14. DISEÑO EXPERIMENTAL

3.14.1.ESQUEMA DEL ADEVA

Se utilizó un Diseño completamente al azar (DCA)

Cuadro 3.4. Esquema del ADEVA

Fuente de variación	Grados de libertad
Tratamientos	15
Error experimental	64
Total	79

3.15. UNIDAD EXPERIMENTAL

El experimento se conformó de 16 tratamientos, 5 réplicas y 80 unidades experimentales, que fueron conformadas de una caja Petri (MP90-25I300--90 mm Ø)

3.16. VARIABLE A MEDIR

A) Crecimiento *in vitro* del patógeno en cajas Petri de 90 mm Ø

La toma de datos de esta variable se la realizaron con un calibrador Vernier, se marcaron las cajas en dos direcciones para conocer su crecimiento longitudinal y transversal en la parte posterior para llevar un orden en la toma de datos, los datos fueron expresados en milímetros. La toma de datos se la realizó a partir de la siembra del patógeno y culminó cuando el crecimiento *in-vitro* del patógeno del testigo absoluto llenó toda la caja Petri.

3.17. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis de datos se realizó a través del ADEVA y la separación de medias con la prueba de Tukey 5% de probabilidades de error.

3.18. MANEJO DEL EXPERIMENTO

A) Preparación de concentraciones de los fungicidas en agar zanahoria

Para la preparación de las concentraciones se trabajó con la dosis comercial y se calculó una dosis alta y una dosis baja de los fungicidas de acuerdo con los tratamientos seleccionados. La dosis calculada de cada fungicida se preparó en Agar Zanahoria, teniendo en cuenta el volumen final del medio a preparar. Los tratamientos requeridos fueron expresados en g/L para los fungicidas sólidos y para los fungicidas líquidos en ml/L. La mezcla del medio de cultivo más el fungicida, se la realizó en la cámara de flujo laminar, adicionando la dosis del fungicida al medio agar zanahoria, se mezcló hasta lograr la homogenización completa del medio más el fungicida, se dispensó 20 mL del medio a las cajas Petri de 90 mm Ø.

B) Sensibilidad *in vitro* de *Phytophthora* spp

Para la prueba de sensibilidad se seleccionó un aislado representativo de *Phytophthora* spp de cada zona, el cual se sometió a una prueba con cinco fungicidas y tres dosis, para esto, se trabajó con discos de micelio (5 mm Ø) del patógeno extraído de la caja Petri, el cual fueron obtenidos con un sacabocados previamente esterilizado, los discos se colocaron en el centro de las cajas Petri

(90 mm Ø) con medio agar zanahoria más el fungicida. Los datos se evaluaron cada dos días siendo (1-3-5) días hasta el respectivo llenado de caja del testigo.

3.19. FASE DE LA INVESTIGACIÓN (ensayo 3)

Caracterización cultural de los aislados de *Phytophthora* spp.

3.20. TRATAMIENTOS

Los tratamientos se conformaron de medios de cultivos y cepas de *Phytophthora* spp. (Cuadro 3.5.)

Cuadro 3.5. Tratamiento de caracterización cultural in vitro

Nº TRATAMIENTO	MEDIOS DE CULTIVO	CEPAS DE <i>Phytophthora</i> spp	DESCRIPCIÓN	A	B	CODIGO
1	Agar Zanahoria (AZ)	Cepa 1 M	AZ/Cepa 1 M	1	1	A1B1
2		Cepa 2 M	AZ/Cepa 2 M	1	2	A1B2
3		Cepa 1 S	AZ/Cepa 1 S	1	3	A1B3
4		Cepa 2 S	AZ/Cepa 2 S	1	4	A1B4
5	Extracto de malta-agar (EMA)	Cepa 1 M	EMA/Cepa 1 M	2	1	A2B1
6		Cepa 2 M	EMA/Cepa 2 M	2	2	A2B2
7		Cepa 1 S	EMA/Cepa 1 S	2	3	A2B3
8		Cepa 2 S	EMA/Cepa 2 S	2	4	A2B4
9	Papa dextrosa agar (PDA)	Cepa 1 M	PDA/Cepa 1 M	3	1	A3B1
10		Cepa 2 M	PDA/Cepa 2 M	3	2	A3B2
11		Cepa 1 S	PDA/Cepa 1 S	3	3	A3B3
12		Cepa 2 S	PDA/Cepa 2 S	3	4	A3B4
13	Sabouraud dextrosa agar (SDA)	Cepa 1 M	SDA/Cepa 1 M	4	1	A4B1
14		Cepa 2 M	SDA/Cepa 2 M	4	2	A4B2
15		Cepa 1 S	SDA/Cepa 1 S	4	3	A4B3
16		Cepa 2 S	SDA/Cepa 2 S	4	4	A4B4

3.21. DISEÑO EXPERIMENTAL

3.21.1.ESQUEMA DEL ADEVA

Se utilizó un Diseño completamente al azar (DCA)

Cuadro 3.6. Esquema del ADEVA

Fuente de variación	Grados de libertad
Tratamiento	15
Error experimental	48
Total	63

3.22. UNIDAD EXPERIMENTAL

El experimento se desarrolló con 16 tratamientos, 4 réplicas y 64 unidades experimentales. La unidad experimental se conformó una caja Petri (MP90-251300--90 mm Ø).

3.23. VARIABLE A MEDIR

A) Crecimiento *in vitro* de *Phytophthora* spp en cajas Petri de 90 mm Ø

La toma de datos de esta variable se la realizó mediante un calibrador Vernier digital, el diámetro (en dos posiciones perpendiculares) de las colonias se evaluó diariamente, los datos se expresaron en milímetros, y el índice de velocidad de crecimiento micelial (IVCM) se calculó por la fórmula (Díaz *et al.*, 2005)

$$IVCM = \frac{\Sigma(D - Da)}{N}$$

Siendo: IVCM = índice de velocidad de crecimiento micelial; D = diámetro medio actual; Da = diámetro medio anterior; N = número de días después del repicado

3.24. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis de datos se realizó a través del ADEVA y la separación de medias con la prueba de Tukey 5% de probabilidades de error.

3.25. MANEJO DEL EXPERIMENTO

Para la prueba de caracterización cultural de *Phytophthora* spp, se escogieron dos aislados que fueron derivados de mazorcas enfermas y dos aislados procedentes de suelo de cada zona muestreada. Para esta prueba se trabajó con discos de micelio (5 mm Ø) extraídos con un sacabocados preliminarmente esterilizado, luego se insertaron en el centro de las cajas Petri (90 mm Ø)

conteniendo los medio de cultivo, Agar Zanahoria (AZ), Extracto de malta-agar (EMA), Papa dextrosa agar (PDA), Sabouraud dextrosa agar (SDA), se utilizó cuatro repeticiones por aislado por medio de cultivo, siendo cada caja Petri una unidad experimental.

CAPITULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. PRUEBAS DE PATOGENICIDAD Y AGRESIVIDAD

4.1.1. OBTENCIÓN DE AISLADOS DE *Phytophthora* spp

Para la obtención de los aislados, se sembraron fragmentos de mazorcas de cacao sintomáticas en medio de cultivo PDA (Difco) con antibiotico y fungicidas, realizandolo en varios aislados. Para la identificación del patógeno se realizaron laminas semi permanentes, y se procedió a observar en el microscopio las estructuras principales y propias del agente causal. (Figura 4.1)

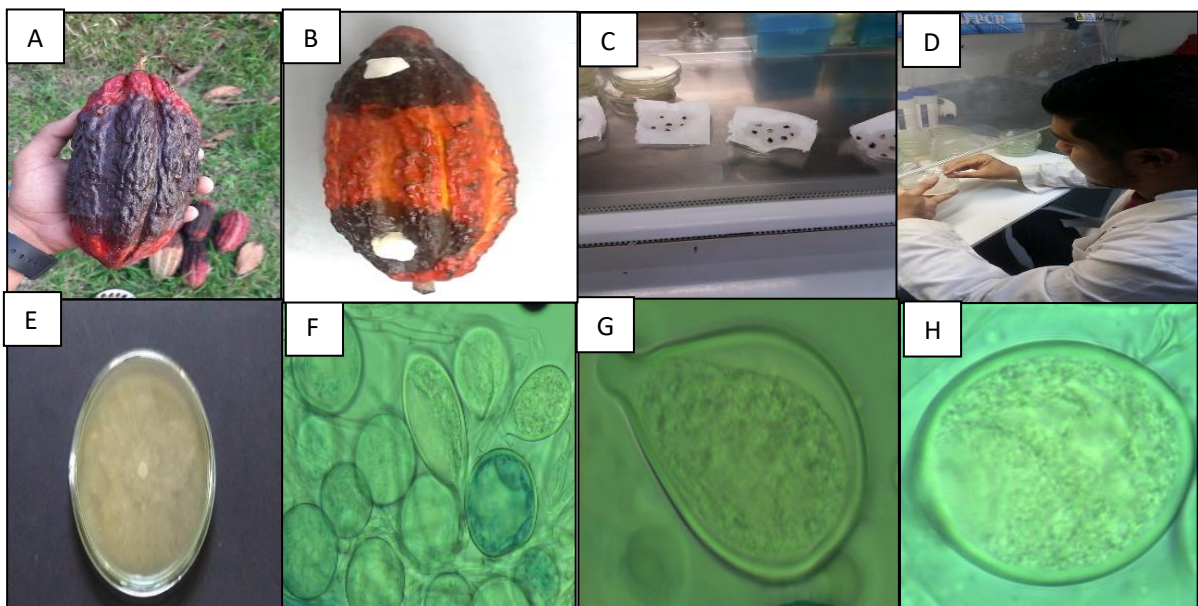


Figura 4.1. Obtención de aislados de *Phytophthora* spp. (A) Colecta de frutos sintomáticos, provocados por *Phytophthora* spp de Clon "CCN-51"; (B) Aislados procedente de muestras de suelo; (C) Aislamiento de fragmentos; (D) Siembra de los aislados en medio de cultivo Agar PDA (Difco); (E) Reaislamiento y crecimiento del patogeno en medio de cultivo Agar Zanahoria; (F) Características microscópicas de *Phytophthora* spp; (G) Esporangios; (H) Clamidósporas.

Previo a la prueba de patogenicidad se obtuvieron cepas aisladas a partir de muestras recolectadas (Frutos sintomáticos y suelo) en la provincia de Esmeraldas, parroquia Cube y en la provincia de Manabí, parroquia Calceta, Se consiguieron 30 cepas de *Phytophthora* spp, de las localidades de las provincias mencionadas, 70% (21 aislados) obtenidos de frutos y 30% (9 aislados) obtenidos de muestras de suelo (cuadro 4.1).

Cuadro 4.1 Aislados de *Phytophthora* spp obtenidos de los diferentes sitios de muestreo

Localidades	Provincia	Cantón	Sector	Código de la cepa (tratamientos)
Localidad 1	Esmeraldas	Quinindé	Cube	Cu – A1 MP Cu -A9-2 Cu - A3-12 Cu – A3-3 Cu – A3-5 Cu – A8-2 Cu – A9 Cu – A3-2 Cu – A8-3 Cu – A3-4 Cu – A1- M2.4 Cu – A3-6 Cu – A3 Cu – A1-M2 Cu – A3-11 Cu – A3-10 Cu – S1.4 Cu – S1.1 Cu – S1.2 Cu – S1.3 Cu – S4.2
Localidad 2	Manabí	Calceta	El limón	Ca – A3-1 Ca – A4-1 Ca – A3-C Ca – A5-1 Ca – A4-B2 Ca – S5-B Ca – S1-A Ca – S6-B Ca – S1-B Ca – S7-A

4.2. PATOGENICIDAD DE LAS CEPAS DE *Phytophthora* spp

La inoculación artificial realizada a las cepas de *Phytophthora* spp corroboró la patogenicidad de los aislados obtenidos, a los dos y tres días posteriores a la inoculación, esto coincide con Kudjordjie (2015) que en inoculaciones realizadas, con especies de *P. palmivora* observó que los aislados obtenidos registran periodos de infección de la mazorca dos días posteriores a la inoculación.

Todos los aislados (100%) de *Phytophthora* spp mostraron patogenicidad en frutos sanos de cacao de los clones EET-575 y CCN51, realizando síntomas típicos de la enfermedad provocada por este patógeno, como es la mancha color marrón ocasionada por la podredumbre de la mazorca, hasta seis a siete días

posteriores a la inoculación, esto concuerda con Decloquement (2018) que determinó que los aislados de *Phytophthora* spp inoculado en diferentes materiales de siembra presentaron síntomas típicos de la enfermedad hasta siete días posteriores a la inoculación del patógeno indiferentemente de cual haya sido el material utilizado (Figura 4.2).

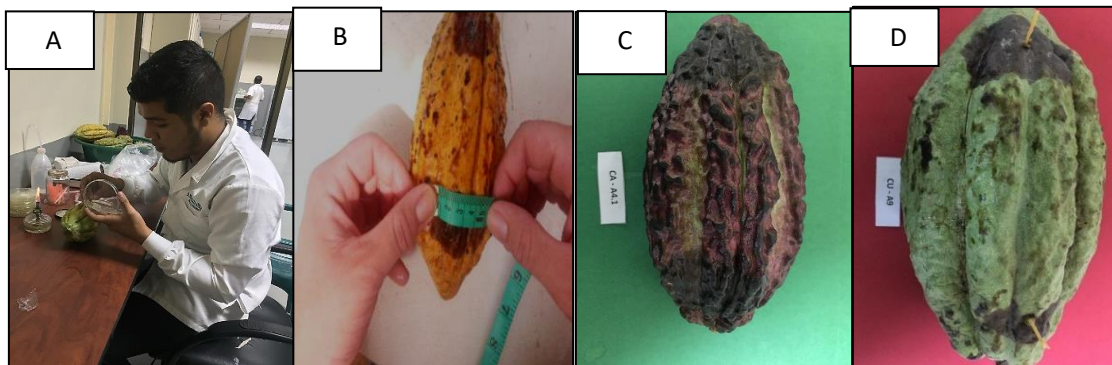


Figura 4.2. Prueba de patogenicidad y agresividad de *Phytophthora* spp. (A) inoculación del patógeno en los materiales de siembra; (B) Medición de la agresividad; (C) frutos de cacao sintomáticos del clon CCN51 a los dos días de la inoculación; (D) Frutos de cacao clon EET-575 con síntomas, posterior a los 2 días de la inoculación.

4.3. AGRESIVIDAD DE *Phytophthora* spp, EN DOS CLONES DE CACAO

4.3.1. AGRESIVIDAD DE *Phytophthora* spp, EN CLONES DE CACAO (3 DÍAS)

La Agresividad del patógeno en frutos de cacao del clon EET-575 no fue influenciada significativamente ($p=0,3500$) por ninguna de las cepas evaluadas, independientemente de su procedencia. Sin embargo numéricamente la mayor agresividad fue alcanzada por las cepas Cu-A8-2 y Cu-A9 provenientes de la parroquia Cube, Quinindé, Esmeraldas, con diámetros de lesión de 31,75 y 30,63 mm respectivamente (cuadro 4.2).

Para el caso del clon CCN-51 la agresividad del patógeno a los 3 días después de la inoculación de la cepa, reportaron diferencias estadísticas significativas ($p=0,001$), lo cual indica que la agresividad del patógeno varía de acuerdo a las cepas de *Phytophthora* spp evaluadas y por tanto de la procedencia. Entre las cepas evaluadas se destacan Cu-A3-4 y Cu-A3-5 con mayor promedios de agresividad, con diámetros de lesión de 42,75 y 42,38 mm respectivamente,

ambas procedentes de Cube, Quinindé, Esmeraldas, diferenciándose de los aislados de Manabí que mostraron menores niveles de agresividad (ver cuadro 4.2).

Cuadro 4.2. Análisis de varianza, Agresividad de *Phytophthora* spp, en clones de cacao (3 días).

CLON CCN51			CLON EET-575		
Diámetro del crecimiento día 3 (mm)			Diámetro del crecimiento día 3 (mm)		
Códigos	Medias	p-valor	Códigos	Medias	p-valor
CU-A3-4	42,75 A	0,001	CU-A8-2	31,75 A	0,3500
CU-A3-5	42,38 A B		CU-A9	30,63 A	
CU-A9	39,5 A B C		CU-A9-2	26,75 A	
CU-A9-2	38,13 A B C D		CU-A3-4	24,88 A	
CU-A3-12	36,75 A B C D		CU-A3-5	24,13 A	
CU-A8-3	36,5 A B C D		CU-A3-12	19,88 A	
CU-A3-2	35,75 A B C D		CU-A1-MP	19,38 A	
CU-A8-2	34,88 A B C D E		CA-A4-B2	16,13 A	
CU-A3-11	33,88 A B C D E F		CU-A3-6	16 A	
CU-A1-MP	31,5 A B C D E F		Cu-S1.4	15,88 A	
CU-A3-6	31,25 A B C D E F		CA-S7-A	15,75 A	
CU-A1-M2.4	31,25 A B C D E F		CA-A5-1	15,13 A	
CA-S7-A	31,13 A B C D E F		CU-A1-M2.4	15 A	
CA-S1-B	31,13 A B C D E F		CU-A3-2	14 A	
CA-S6-B	28,88 A B C D E F G		CA-S5-B	13,38 A	
Cu-S1.2	28,88 A B C D E F G		CA-S1-B	12,75 A	
Cu-S1.1	28,75 A B C D E F G		CA-A3-C	10,25 A	
CU-A3-10	28,63 A B C D E F G		CU-A3-11	10 A	
CU-A1-M2	28,63 A B C D E F G		CA-A3-1	10 A	
CU-A3	28,25 A B C D E F G		CU-A3-10	9,5 A	
Cu-S4.2	27,13 A B C D E F G	CA-S1-A	9,13 A		
CU-A3-3	23,63 A B C D E F G H	CU-A8-3	8,25 A		
CU-S1.3	23,25 A B C D E F G H	Cu-S1.2	8,13 A		
CU-S1.4	18,63 B C D E F G H	Cu-S1.3	8,13 A		
CA-S1-A	18 C D E F G H	Cu-S4.2	8,13 A		
CA-S5-B	15,25 D E F G H	CA-S6-B	7,75 A		
CA-A5-1	11,88 E F G H	CA-A4-1	7,63 A		
CA-A3-C	10,13 F G H	CU-A3-3	6,63 A		
CA-A4-1	6,5 G H	CU-A3	6,63 A		
CA-A3-1	3,13 H	CU-A1-M2	6,25 A		
CA-A4-B2	0 H	CU-S1.1	5,63 A		
Testigo	0 H	Testigo	0 A		

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

4.3.2. AGRESIVIDAD DE *Phytophthora* spp, EN CLONES DE CACAO (5 DÍAS)

La Agresividad del patógeno en frutos de cacao del clon EET-575 a los cinco días después de la inoculación de la cepa, reportaron diferencias estadísticamente significativas ($p=0,001$), lo cual demuestra que la agresividad del patógeno varía de acuerdo a las cepas evaluadas y de las zonas de donde provienen. En cuanto a los aislados, las cepas Cu-A9 y Cu-S1.3 mostraron los mayores promedios de agresividad, con diámetros de lesión de 72 y 70,5 mm respectivamente, pertenecientes a la parroquia Cube, Quinindé, Esmeraldas, diferenciándose de los aislados de Manabí que presentaron menores niveles de agresividad en las cepas (cuadro 4.3)

Así mismo el clon CCN-51, fue afectado significativamente ($p=0,001$), donde destacan entre las cepas evaluadas, Cu.A3.4 y Cu-A3-11, como las de mayor promedios de agresividad con diámetros de 88,63 y 87 mm respectivamente, pertenecientes al Cantón Quinindé, Esmeraldas, en contraste de los aislados de Calceta, Manabí que presentaron menores niveles de agresividad (cuadro 4.3)

Cuadro 4.3. Análisis de varianza, Agresividad de *Phytophthora* spp, en clones de cacao (5 días).

CLON CCN51				CLON EET-575			
Diámetro del crecimiento día 5 (mm)				Diámetro del crecimiento día 5 (mm)			
CEPA	Medias		p-valor	CEPA	Medias		p-valor
CU-A3-4	88,63	A	0,0001	CU-A9	72	A	0,0001
CU-A3-11	87	A B		CU-S1.3	70,5	A B	
CU-A1-M2	85,13	A B C		CU-A9-2	69,5	A B	
Cu-S1.4	83,75	A B C D		CU-S1.4	67,75	A B C	
CU-A3-10	83,13	A B C D		CU-A3-4	64,13	A B C	
CU-A9	81,5	A B C D		CU-A3-5	61,75	A B C	
CU-A9-2	79,88	A B C D		CU-A1-MP	60,88	A B C	
CU-A3	79,63	A B C D		Cu-S1.1	56,25	A B C	
CU-A3-12	78,38	A B C D		CU-A3-10	56	A B C	
Cu-S1.2	78,25	A B C D		CU-A8-2	53,63	A B C	
Cu-S4.2	77,63	A B C D		CU-A3-12	52,25	A B C	
Cu-S1.1	76,75	A B C D		CU-A1-M2.4	47,5	A B C	
CU-A8-3	76,63	A B C D		CU-A3	47,25	A B C	
CU-A3-5	75,63	A B C D		CU-S1.2	44,5	A B C	
CU-A3-2	73,75	A B C D E		CU-A1-M2	44,25	A B C	
Cu-S1.3	73,5	A B C D E		CU-A3-6	43,25	A B C	
CU-A8-2	73	A B C D E		CU-A3-2	39,13	A B C	

CU-A1-MP	70,75	A B C D E F	CU-A8-3	38	A B C
CU-A3-3	64	A B C D E F	CU-A3-11	36,63	A B C
CU-A3-6	63,63	A B C D E F	CA-A5-1	35,63	A B C
CU-A1-M2.4	56,75	A B C D E F G	CA-S1-A	34,75	A B C
CA-S7-A	55	B C D E F G H	CA-S5-B	34,38	A B C
CA-S1-B	53,5	C D E F G H	CA-A3-1	33	A B C
CA-S6-B	50,75	D E F G H I	CA-A4-B2	31,25	A B C
CA-S1-A	41,88	E F G H I	CA-A3-C	30,13	A B C
CA-S5-B	41,88	E F G H I	CU-S4.2	29,13	A B C
CA-A5-1	37,63	F G H I	CA-S6-B	27,75	A B C
CA-A3-C	28,88	G H I	CA-S1-B	23,13	A B C
CA-A4-1	27,63	G H I	CA-S7-A	22,63	A B C
CA-A3-1	22,5	H I	CU-A3-3	20,63	B C
CA-A4-B2	20	I	CA-A4-1	17,75	C
Testigo	0	I	Testigo	0	

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Los aislados de Quinindé y de Calceta fueron agresivos en ambos clones evaluados, sin embargo el clon CCN51 fue más susceptible en presencia de *Phytophthora* spp (figura 4.3 y 4.4). En este contexto los resultados encontrados fueron similares a los arrojados por Arciniegas y Philips (2004) y Cárdenas (2016) los cuales muestran que el clon CCN51 es mayormente susceptible en presencia del patógeno a diferencia de otros clones como ICS95 y FSA12 que presentaron una mayor resistencia del material genético. Los resultados coinciden con los hallazgos de Decloquement (2018), que muestra que el clon CCN51 inoculado con *P. palmivora* obtuvo una ligera susceptibilidad al patógeno a diferencia del clon FB206.

Las cepas obtenidas presentaron variaciones, esto puede deberse a la diferencia existente entre la patogenicidad y agresividad de los aislados y entre las especies (Kudjordjie, 2015). De esta manera, se puede considerar que los aislados de *Phytophthora* spp. provenientes de Cuba son más agresivos en crecimiento de lesión en frutos de cacao, lo que podría estar relacionado en función del origen y agresividad de las cepas, donde en condiciones de campo se observa una mayor incidencia y severidad de la enfermedad

Clon CCN-51

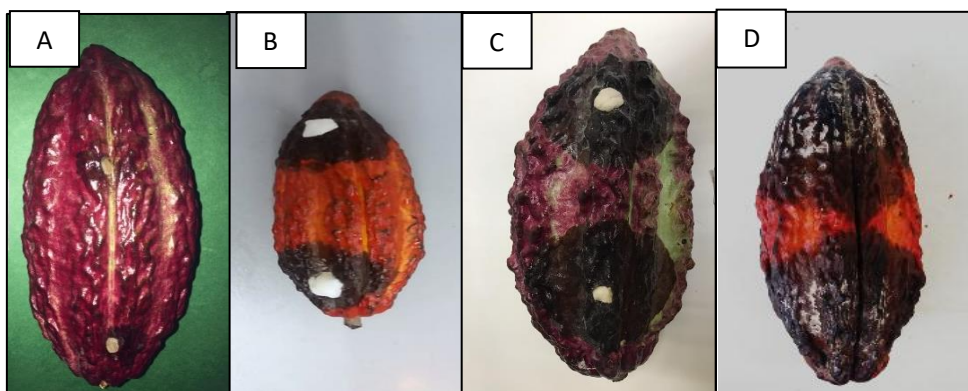


Figura 4.3. Patogenicidad y agresividad, Clon CCN51; (A) Cepa Cu-A9; (B) Cepa Ca-S5; (C) cepa Ca-S3 (D); Cepa Cu-A8.

Clon EET-575



Figura 4.4. Patogenicidad y agresividad, Clon EET-575; (A) Cepa Cu-A9; (B) Cepa Cu-A8; (C) Cepa Ca- S3; (D) Cepa Cu-A3.

4.4. EVALUACIÓN DE SENSIBILIDAD *in vitro* DE *Phytophthora* spp

El porcentaje de inhibición de crecimiento micelial al cuarto día de evaluación fue afectado significativamente ($p= 0,001$), por las combinaciones de fungicidas probadas, independientemente de las cepas evaluadas donde los tratamientos Carboxin-Thiram, Mancozeb-Cymoxanil, Mancozeb-Metaxyl y Metalaxyl alcanzaron el mayor porcentaje de inhibición micelial del patógeno, en contraste a los tratamientos Azoxystrobin+Difenoconazole y el control que mostraron menores tasas de inhibición (ver cuadro 4.4 y figura 4.5). Lo anterior indica, el potencial que muestran las combinaciones de Carboxin-Thiram, Mancozeb-Cymoxanil, Mancozeb-Metaxyl y Metalaxyl como posibles tratamientos promisorios para el control de la enfermedad.

Cuadro 4.4. Análisis de varianza; sensibilidad *in vitro* de *Phytophthora* spp. al cuarto día de evaluación.

Tratamientos	Cu-A9	Cu-S4.2	Ca-A4-1	Ca-S5-B
Mancozeb-Metaxyl/D2	94,44 A	94,4 A	94,4 A	94,4 A
Mancozeb-Metaxyl/D1	94,44 A	94,4 A	94,4 A	94,4 A
Mancozeb-Cymoxanil/D2	94,44 A	94,4 A	94,4 A	94,4 A
Mancozeb-Metaxyl/D3	94,44 A	94,4 A	94,4 A	94,4 A
Metalaxyl/D2	94,44 A	94,4 A	94,4 A	94,4 A
Metalaxyl/D1	94,44 A	94,4 A	94,4 A	94,4 A
Metalaxyl/D3	94,44 A	94,4 A	94,4 A	94,4 A
Mancozeb-Cymoxanil/D1	94,44 A	94,4 A	94,4 A	94,4 A
Carboxin-Thiram/D2	94,44 A	94,4 A	94,4 A	94,4 A
Carboxin-Thiram/D3	94,44 A	94,4 A	94,4 A	94,4 A
Carboxin-Thiram/D1	94,44 A	94,4 A	94,4 A	94,4 A
Mancozeb-Cymoxanil/D3	94,44 A	94,4 A	94,4 A	94,4 A
Azoxystrobin+Difenoconazol./D1	77,11 B	83,3 B	94,3 A	67,4 B
Azoxystrobin+Difenoconazol./D2	64,89 C	68,5 C	89,4 A	67 B
Azoxystrobin+Difenoconazol./D3	52,67 D	66,7 C	60,3 B	66,5 B
TESTIGO	0 E	0 D	0 C	0 C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

En este contexto los resultados hallados son cercanos a los reportados por Calva y Jaramillo (2016) dado que con los fungicidas Azoxystrobin y Sulfato de cobre pentahidratado, no logran controlar el crecimiento del patógeno *in vitro* a los 3, 6 y 9 días posteriores a la inoculación a diferencia de la combinación Metalaxyl-M+Mancozeb, que inhibió el 100% del crecimiento micelial y germinación de oosporas.

En este mismo contexto los hallazgos de Riveros *et al.* (2003) difieren con lo antes mencionado, debido a que cepas de *P. infestans* aisladas del cultivo de papa y sometidas a prueba de sensibilidad *in vitro* con Metalaxil, no fueron inhibidas con este fungicida, donde las cepas alcanzaron crecimientos entre el 80 y 100 % lo cual indica que el Metalaxil no fue efectivo para su control.

Contrariamente a lo reportado por Riveros *et al.* (2003), resultados alcanzados por Reis *et al.* (2006) y Kudjordjie (2015) mostraron que Metalaxil en dosis adecuadas inhibieron el crecimiento *in vitro* de *P. Infestans* de cultivo de papa y tomate lo cual podría indicar que el efecto de este fungicida puede estar en función del origen y agresividad de las cepas.

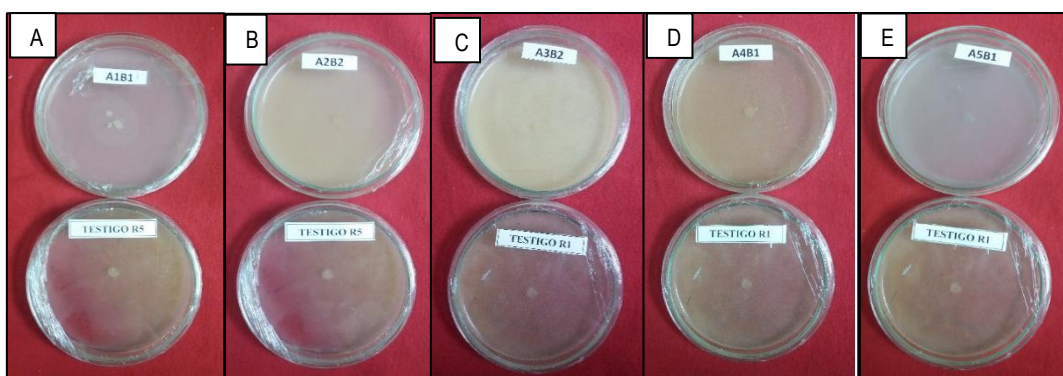


Figura 4.5. Sensibilidad *in vitro* a fungicidas de *Phytophthora* spp. (A) Azoxyestrobil+Difenoconazole vs testigo; (B) Carboxin-Thiram vs testigo; (C) Mancozeb-Cymoxanil vs testigo; (D) Mancozeb-Metaxyl vs testigo; (E) Metalaxyl vs testigo.

4.5. CARACTERIZACION CULTURAL DE LOS AISLADOS DE *Phytophthora* spp

4.5.1. EVALUACION DEL CRECIMIENTO MICELIAL

El crecimiento micelial del patógeno fue influenciado significativamente, ($p=0,001$) por los medios de cultivo probados donde el tratamiento con Agar Zanahoria (AZ) mostró mayor crecimiento micelial, en comparación a los medios PDA, EMA, SDA. En cuanto a los aislados, las cepas Ca-A4-1, Ca-S5-B, Cu-S4.2 y Cu-A9 mostraron el mayor crecimiento micelial con 94,4; 92,75; 90,40 y 78,23 mm de diámetro respectivamente en el medio AZ (ver cuadro 4.5). Lo anteriormente expuesto indica, que independientemente de las cepas y las zonas donde provienen, el medio Agar Zanahoria (AZ), se muestra como una buena alternativa para inducir mayor crecimiento del patógeno para desarrollar ensayos *in vitro*.

Cuadro 4.5. Análisis de varianza en la prueba de, crecimiento micelial de *Phytophthora* spp, al cuarto día de evaluación.

Tratamiento	Crecimiento micelial (mm)	p-valor
AZ/Cepa 2 KLZ ma	94,40 A	0,0001
AZ/Cepa 2 KLZ su	92,75 A	
AZ/Cepa 1 Cu ma	90,40 A	
AZ/Cepa 1 Cu su	78,23 B	
EMA/Cepa 2 KLZ ma	32,38 C	
EMA/Cepa 2 KLZ su	30,43 C	

EMA/Cepa 1 Cu ma	29,58	C	
SDA/Cepa 2 KLZ su	28,88	C	
EMA/Cepa 1 Cu su	28,45	C	
SDA/Cepa 2 KLZ ma	27,10	C	D
PDA/Cepa 2 KLZ ma	20,18		D E
PDA/Cepa 2 KLZ su	20,15		D E
SDA/Cepa 1 Cu ma	18,63		E
SDA/Cepa 1 Cu su	18,08		E
PDA/Cepa 1 Cu ma	15,15		E
PDA/Cepa 1 Cu su	13,35		E

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Los resultados obtenidos difieren a los alcanzados por Medina *et al.* (2018) en Colombia quienes reportaron mayor crecimiento de *P. palmivora* aisladas de palmas africana, en medio Agar Avena con 21 mm dia^{-1} , en contraste a los medios Agar Zanahoria y Jugo V8 con menor crecimiento. Por su parte, en ensayos desarrollados por Iribarren (2015) demostró que aislados de *P. nicotianae* y *P. capsici* mostraron mayor crecimiento en medio V8, en relación a los medios Agar Manzana tomate, Agar Harina de Maíz y Papa Dextrosa Agar, los resultados alcanzados coinciden a los descritos por Decloquement (2018) quien indica que los medios óptimos para el crecimiento de *Phytophthora* spp son Agar Zanahoria (CA) y Jugo V8, en relación a los medios PDA y EMA. (Ver figura 4.6)

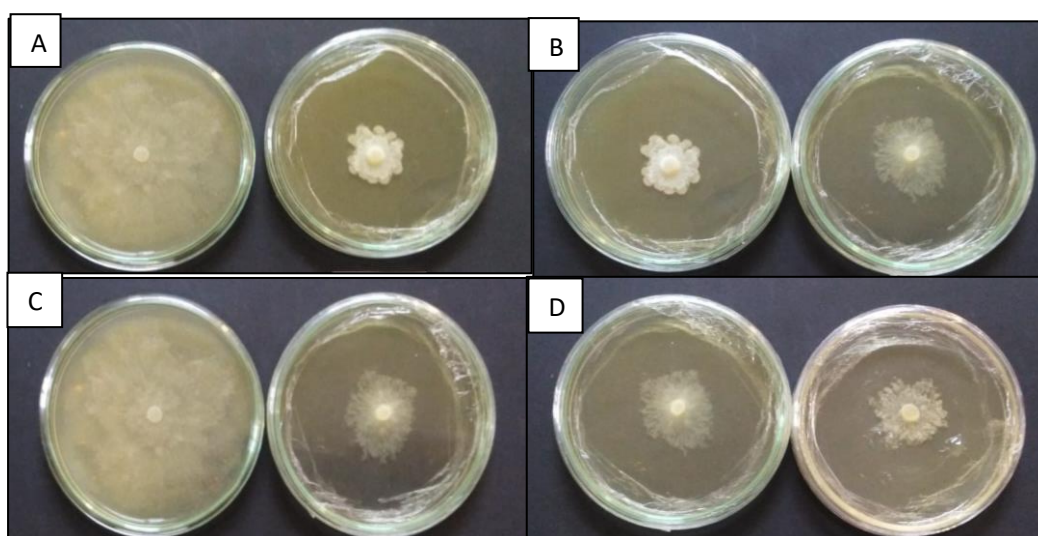


Figura 4.6. Diferencia del crecimiento micelial en varios medios de cultivo. (A) AZ vs PDA; (B) PDA vs EMA; (C) EMA vs AZ; (D) EMA vs SDA

4.6. INDICE DE VELOCIDAD

Dentro del medio de cultivo Agar Zanahoria (AZ), entre los aislados del cantón Quinindé destaca Cu-A9 con un IVCM promedio de 5,2 mm día⁻¹, en comparación al IVCM mostrado por los medios de cultivos EMA, PDA y SDA con 2,8, 0,8 y 0,7 2 mm día⁻¹ respectivamente. Por su parte en el cantón Calceta se destaca el aislado Ca- A4.1 con un IVCM promedio de 5,2 mm día⁻¹ mientras que los medios EMA, PDA y SDA los promedios del IVCM de esta cepa fueron 2,7, 1,1 y 1,0 2 mm día⁻¹ respectivamente (ver grafico 4.1). En este sentido , los resultados coinciden a los reportados por Decloquement (2018) quien indicó que en el medio de cultivo Agar Zanahoria (AZ) se presentaron mayores promedios de IVCM, en contraste a los medios PDA, EMA entre otros.

Cepas de *Phytophthora* spp, de Quinindé

Cepas de *Phytophthora* spp, de Calceta

DIAMETRO DE LA COLONIA (mm)

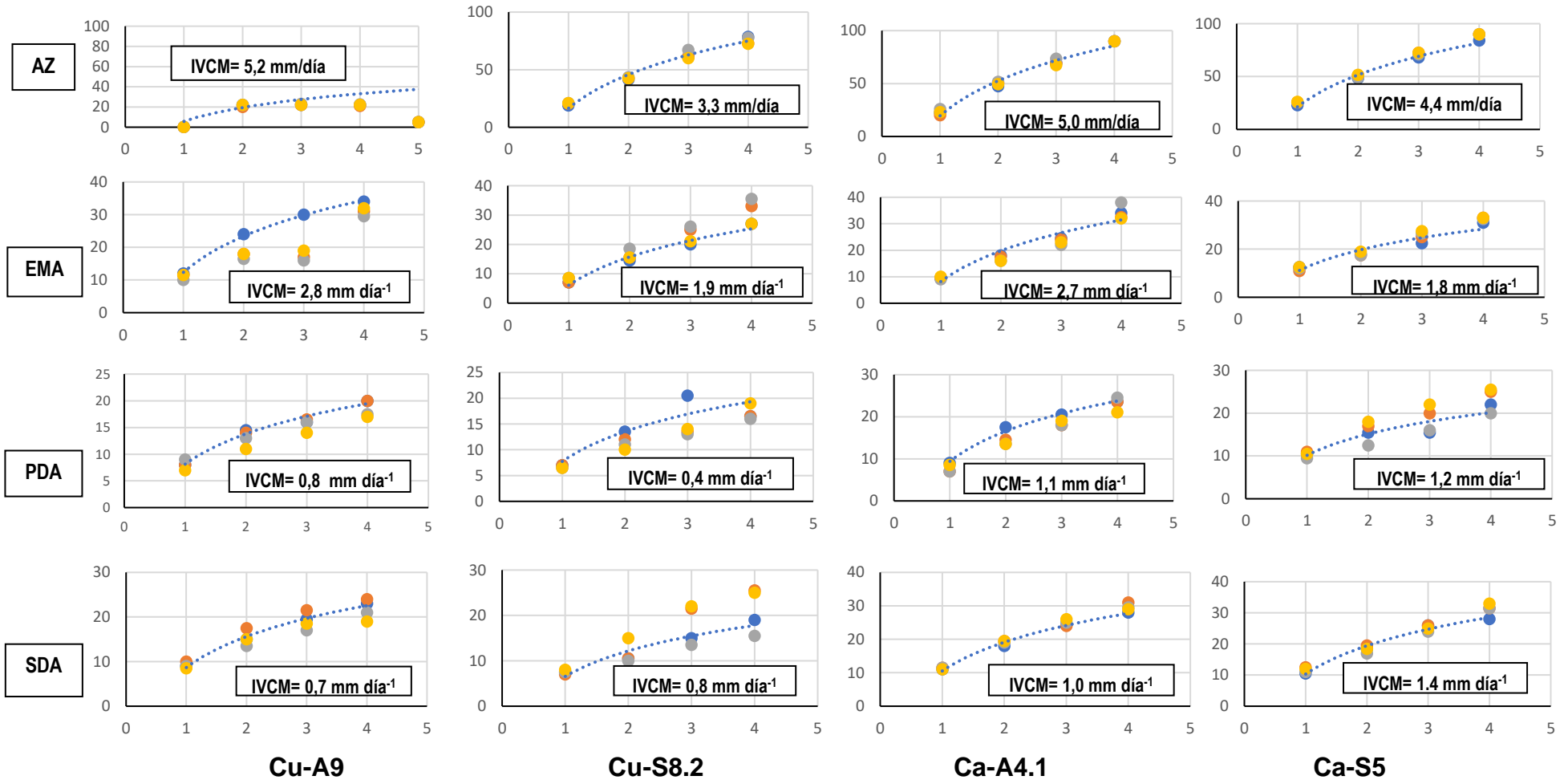


Grafico 4.1 . Curvas de crecimiento micelial de los aislados de *Phytophthora* spp, en medios de cultivo AZ, PDA, EMA, SDA.

4.7. EVALUACIÓN DEL PATRÓN CULTURAL

Los aislados obtenidos de ambos cantones tuvieron un comportamiento similar en lo que se refiere al patrón cultural de *Phytophthora* spp. En el medio de cultivo AZ, prevaleció el patrón cultural estrellado, mientras que en PDA, EMA y SDA, las cepas aisladas presentaron un patrón cultural aracnoide (ver cuadro 4,6). Esto concuerda con Medina *et al.* (2018) que en medios de cultivos óptimos para el crecimiento del patógeno como son, Agar Zanahoria, Agar Avena y Jugo V8, las cepas aisladas presentaron micelio blanco y estrellado. Erwin & Ribeiro (1996) recalcan algunas formas de patrones culturales propios de los Oomycetos pertenecientes al género *Phytophthora*, entre ellas se encuentran la forma estrellada para *P. palmivora*, forma rosáceo para *P. cinnamomi* y la forma crisantemo para *P. citrícola*. En la figura 4.7 se puede observar los diferentes patrones culturales encontrados en las cepas aisladas.

CEPAS AISLADAS	PATRÓN CULTURAL			
	CA	EMA	PDA	SDA
Cu - A9	Estrellado	Aracnoide	Aracnoide	Aracnoide
Cu - S8.2	Estrellado	Aracnoide	Aracnoide	Aracnoide
Ca - A4.1	Estrellado	Aracnoide	Aracnoide	Aracnoide
Ca - S5	Estrellado	Aracnoide	Aracnoide	Aracnoide

Cuadro 4.6. Patrones culturales de los aislados en diferentes medios de cultivo utilizados; CA: Carrot Agar, EMA: Extracto de malta agar, PDA: Papa Dextrosa Agar, SDA: Sabouraud Dextrosa Agar.

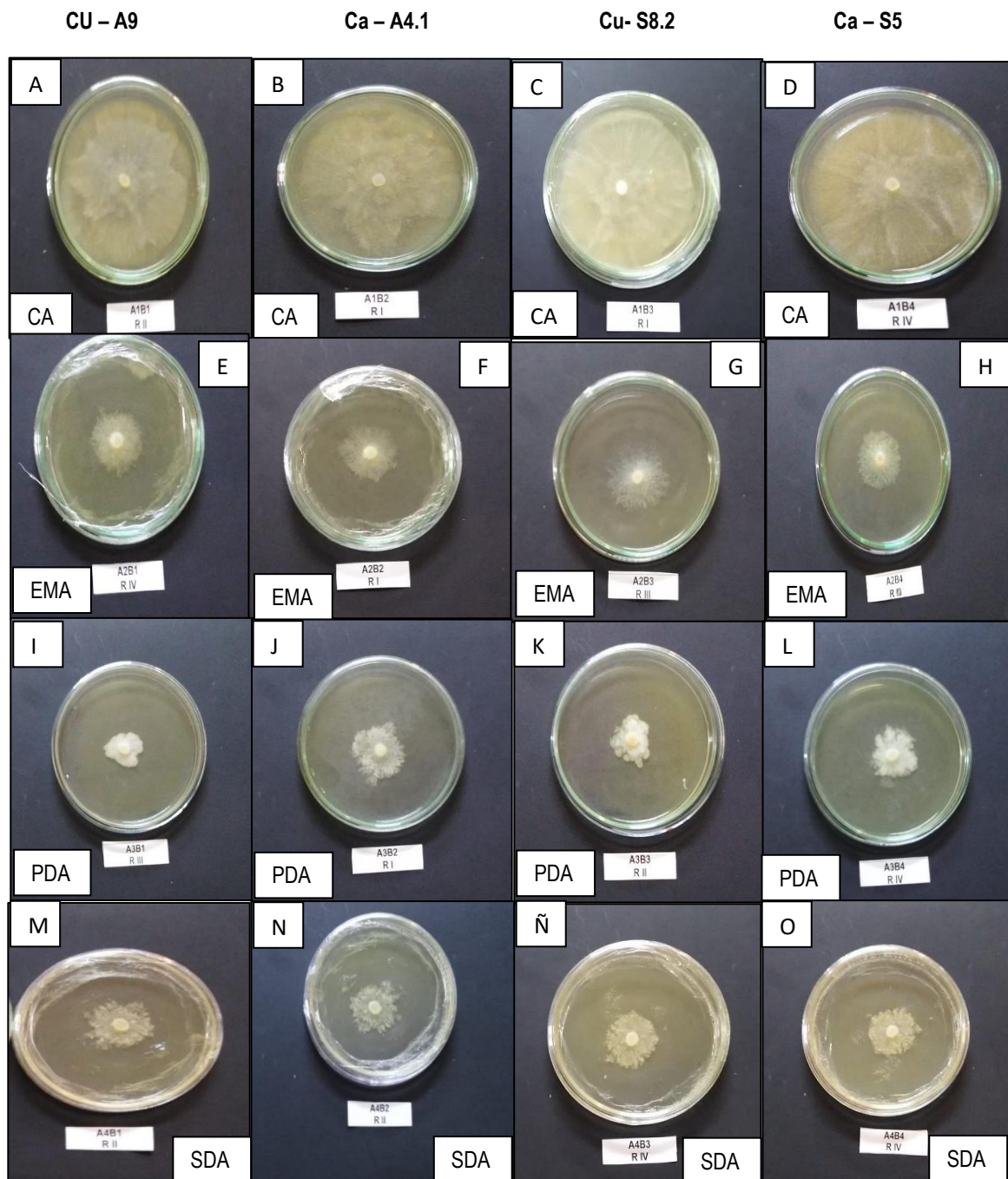


Figura 4.7. Patrones culturales de los aislados de *Phytophthora* spp. (A-B-C-D) Estrellado en Carrot Agar (CA) Cepa de mazorca Cu – A9; cepa de mazorca Ca – A4.1; cepa de suelo Cu – S8-2; cepa de suelo Ca – S5; (E-F-G-H) Aracnoide en extracto malta agar, (EMA) (I-J-K-L) Aracnoide en Papa dextrosa agar (PDA) (M-N-Ñ-O). Aracnoide en Sabouraud Dextrosa Agar (SDA)

CAPITULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. CONCLUSIONES

- Se identificó morfológicamente a *Phytophthora* spp mediante el microscopio observando las diferentes estructuras del patógeno como son esporangios con varias formas desde ovoide a elíptica y clamidosporas en abundancia adheridas al micelio.
- Las cepas de *Phytophthora* spp presentaron patogenicidad a los dos y tres días después de la inoculación en materiales de cacao como EET – 575 y CCN51
- El clon CCN51 fue mas susceptible en relación al clon EET – 575 frente a *Phytophthora* spp
- Los aislados provenientes de Esmeraldas (Cube) fueron más agresivos con respecto a los aislados provenientes de Manabí (Calceta)
- Los productos fúngicos (Carboxin-Thiram, Mancozeb-Cymoxanil, Mancozeb-Metaxyl y Metalaxyl), ejercieron control en los aislados de *Phytophthora* spp.
- Los aislados utilizados presentaron el mayor crecimiento in vitro en medio de cultivo Agar zanahoria (AZ)
- Las cepas aisladas de *Phytophthora* spp presentaron como patrón cultural formas aracnoides en los medios Extracto de Malta Agar (EMA) Papa Dextrosa Agar (PDA) y Sabouraud Dextrosa Agar (SDA) y estrellado en Agar Zanahoria (AZ)

5.2. RECOMENDACIONES

- Efectuar identificaciones de las cepas aisladas a nivel molecular para evidenciar cual de las especies de *Phytophthora* spp ocasionan la enfermedad en los cantones estudiados.
- Efectuar pruebas con fungicidas a nivel de campo para confirmar la autenticidad de los resultados obtenidos en laboratorio.

BIBLIOGRAFÍA

- Aime, M., y Phillips-Mora, W. (2005). The causal agents of witches' broom and frosty pod rot of cacao (chocolate, *Theobroma cacao*) from a new lineage of Marasmiaceae. *Mycology*, 97(5), 1012-1022.
- Almaraz, A, Alvarado, D, Leiva, G, Equihua, A, Aranda, S y Hernandez, J. (2016). Pruebas de patogenicidad de *Phytophthora cinnamomi* Rands. en *Pseudotsuga mensiezii*. Revista mexicana de Fitopatología .Scielo. MX. Vol.34.
- Ali, S, Amoako-Attah, Bailey, R, Strem, M, Schmidt, M., Akrofi, E Phillips-Mora, w., Meinhardt, L, y Bailey, B (2016). Identificación basada en PCR de agentes causales de la vaina negra de cacao e identificación de factores biológicos que posiblemente contribuyan al dominio del campo de *Phytophthora megakarya* en África Occidental. Patología Vegetal.
- ANECACAO (Asociación Nacional de exportadores de cacao-Ecuador). (2013). 1er seminario Internacional ANACACAO 2013. El Productor, el periódico del campo.
- ANECACAO (Asociación Nacional de exportadores de cacao-Ecuador). (2018). Los precios del cacao en el mundo; Desafíos y objetivos para el sector cacaotero. Ecuador. Guayaquil. *Revista Especializada en Cacao*. 16 ed., 37.
- Arciniega, J. (2017). Propuesta de manejo integrado de la moniliasis (*Moniliophthora roreri*) del cacao (*Theobroma cacao*) en Santo Domingo de los Tsáchilas. Ecuador. Tesis doctoral. Ingeniero Agrónomo. 1.
- Arciniegas A, Phillips MW. (2004). Caracterización de genotipos superiores de cacao seleccionados por el programa de mejoramiento genético del CATIE por su rendimiento y/o resistencia a moniliasis. En: Libro de resúmenes, International Cocoa Research Conference: proceedings actes. San José, Costa Rica; 2006. p. 21-25.
- Ártica, M. (2008). Cultivo del cacao. Empresa Editora MACRO. Perú. 2008
- Appiah, A. A., Flood, J., Bridge, P. D., & Archer, S. A. (2003). Inter- and intraspecific morphometric variation and characterization of *Phytophthora* isolates from cocoa. *Plant Pathology*, 52(2), 168-180.
- Ayala, M; Navia, D. (2008). Manejo integrado de moniliasis (*Moniliophthora roreri*) en el cultivo de cacao (*Theobroma cacao* L) mediante el uso de

- fungicidas, combinado con labores culturales. CICYT –ESPOL. Guayaquil, Ecuador. 6.
- Bailey, B., Meinhardt, L. (2016). *Cacao Diseases: A History of Old Enemies and New Encounters*. Springer International Publishing Switzerland
- Bolaños, M., Guerrero, D., Pérez., Simón, F., y Vargas, D. (2017). Caracterización y epifitología de *Phytophthora* sp., en cacao (*Theobroma cacao* L.) en áreas cacaoteras de esmeraldas. *Investigación y saberes*, 6(2), 47-66
- Calva, C. y. Jaramillo, A. (2016) Control químico *in vitro* de *phytophthora* sp agente causal de la mancha negra en el cultivo de cacao (Trabajo de titulación). UTMACH, Unidad Académica de Ciencias Agropecuarias, Machala, Ecuador.
- Campelo, A. N. Luz, E. D. e Resnik, F. C. (1982). Podridao parda do cacaueiro no Estado da Babia, Brasil. I. Virulencia das especies de *Phytophthora*. *Revista tbeobroma* 12(1):1-6.
- Cardenas, N. (2016). Análisis espacial de la incidencia de enfermedades en diferentes genotipos de cacao (*Theobroma cacao* L.) en el yopal (casanare), Colombia. Universidad Nacional de Colombia. nº. 45-03. Bogotá D.C., Colombia.
- Chin James (ed.). (2001) El control de las enfermedades transmisibles. Décimo séptima edición. Organización Panamericana de la Salud.
- Correa, J; Castro, S; y Coy, J. (2014). Estado de la moniliasis del cacao causada por *Moniliophthora roreri* en Colombia . *Revista científica Scielo. Acta Agronómica*, 63(4), 388-399.
- Decloquement, J. (2018). Caracterizacao morfo-molecular e patogenicidade de *Phytophthora* spp . associadas ao cacaueiro (*Theobroma cacao* L .) (Tesis de maestría). Universidad de Brasília. Brasília, Brasil
- Delgado, R., y Bosman, B. (2010). Caracterización de razas de *Phytophthora infestans* asociadas a papas nativas en la provincia del Carchi, Ecuador. Memorias. Quito, Ecuador: INIAP/CIP. 92-93
- De la Cruz M, Whitkus R, Gómez-Pompa A, Mota-Bravo L. (1995). Origins of cacao cultivation. *Nature* 375:542 – 543
- Erwin, D., & Ribeiro, O. (1996). *Phytophthora* Disease Worldwide. APS Press, the American Phytopathological Society, St. Paul, Minn. pp. 562.
- Evans H. (2007). Enfermedades del cacao - La trilogía revisada. *Fitopatología* 97: 1640-1643.

- Evans, H., Holmes K., Reid A. (2003). Phylogeny of the frosty pod rot pathogen of cocoa. *Plant Pathology*, 52(1), 476-485.
- Gisi, U; Sierotzki, H; Cook, A; McCaffery, A. (2002). Mechanisms influencing the evolution of resistance to Qo inhibitor fungicides. *Pest Management Science* 58: 859-867
- Gómez-Hernández, D.; Carrillo-Rodríguez, J. C.; ChávezServia, J. L.; Perales-Segovia, C. (2018). Pathogenicity of *Phytophthora capsici* Leon and *Rhizoctonia solani* Khün, on seedlings of 'costeño' pepper (*Capsicum annum* L.). *Revista Bio Ciencias* 5(1), e356.
- Hebbar P. (2007). Las enfermedades del cacao: una perspectiva global. desde un punto de vista de la industria. *Fitopatología* 97: 1658-1663.
- Iribarren, M. (2015). Caracterización de *Phytophthora capsici* como patógeno de especies hortícolas presentes en la zona noreste de la provincia de Buenos Aires (Tesis doctoral). Universidad Nacional De La Plata. Buenos Aires, Argentina.
- INSTITUTO NACIONAL AUTÓNOMO DE INVESTIGACIÓN AGROPECUARIA (INIAP). (2009). Manual del cultivo de cacao para la Amazonia ecuatoriana. Quito, Ecuador. 25p.
- Jaimes, Y. y Aranzazu, F. (2010). Manejo de las enfermedades del cacao (*Theobroma cacao* L.) en Colombia, con énfasis en Monilla (*Moniliophthora roreri*). In: Hoyos L.M. (ed.). Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria, Corpoica, Colombia. p. 90
- Judelson H, Blanco F. (2005). The spores of *Phytophthora*: weapons of the plant destroyer. *Nature Reviews Microbiology* 3:47-58.
- Krauss, U. (2010). Manejo integrado del patógeno invasor del cacao, *Moniliophthora roreri*, agente causal de la podredumbre helada. En: Caribbean Food Crops Society 46th Meeting Anual ant. T-Star Invasive Symposium. 11-17 de julio de 2010, Boca Chica, República Dominicana, 75-86.
- Kudjordjie, E. (2015). *Phytophthora megakarya* and *P. palmivora* on *Theobroma cacao*: aspects of virulence and the effects of temperature on growth and resistance to fungicides. (Master's thesis). University of Cop Enhagen. Camerun.
- Lawrence, J. S, Luz. E. D. and Resnik. F. C. (1982). The relative virulence of *Phytophthora palmivora* - and *E. capsici* in cocoa in Brasil. *Revista theobroma* 12(3): 189-198.
- López M, Martins E. (2005). Principales enfermedades del cacao en Brasil. Ilhéus, CEPLAC / CEPEC / SEFIT. 132 p.
- Matos, Y; Peteira, B; Matos, G; Decock, C; Hubeaux, D; Lambertt, W; Bidot, I; Acebedo, Y; Ochoa, P; Clape, P. (2011). Prueba de apareamiento en 90 aislamientos de *Phytophthora*, proveniente de frutos enfermos de cacao

- (*Theobroma cacao*.) En el municipio de Baracoa Provincia Guantánamo, Cuba. *Revista científica Scielo*. Cuba. 1 ed. Vol. 2. p. 1-3
- McMahon P, Purwantara A. (2004). Major crops affected by *Phytophthora*. En André Drenth y David Guest. Diversity and Management of *Phytophthora* in Southeast Asia. ACIAR Monograph 114.104-105 p.
- Medina, H. Mestizo, Y. Sarria, G. (2018). Caracterización cultural, patogénica y molecular de *Phytophthora palmivora* (Butler) obtenido de palmas afectadas con la Pudrición del cogollo en la Zona Norte Colombia. Centro de convenciones Cartagena. Colombia.
- Meinhardt L, Rincones J, Bailey B, Aime C, Griffith G, Zhang D, Pereira G. (2008). *Moniliophthora perniciosa*, el agente causal de la escoba de bruja. *Patología Molecular de Plantas* 9: 577-588.
- Merchán V. (1981). Avances de la investigación de la moniliasis del cacao en Colombia. *El Cacaotero Colombiano* 16:26-41.
- Motamayor J, Risterucci A, Lopez P, Ortiz C, Moreno A, Lanaud C. (2002). Cacao domestication I: the origin of the cacao cultivated by the Mayas. *Heredity* 89:380-386.
- Mora, V. (2009). Utilización de microsatélites en el estudio de la resistencia de árboles seleccionados de cacao (*Theobroma cacao* L.) a la enfermedad "Mancha de Agua" (*Phytophthora megasperma*). Trabajo de grado para optar al título de Licenciado en Biología, Facultad de Ciencias de la Universidad de Los Andes. Mérida, estado Mérida, Venezuela. 117 p.
- Navarro, M. Mendoza, I. (2012). Cultivo del cacao en sistemas agroforestales. Nicaragua. P.6
- Pfaller MA. (2005). Antifungal susceptibility testing methods. *Curr Drug Targets* 2005;6:929-43.
- Reis, A. Ribeiro, F. y Mizubuti, E. (2006). Caracterização de Isolados de *Phytophthora infestans* do Distrito Federal e de Goiás. *Embrapa Hortaliças, Brasil*. 31:270-276.
- Riveros, F. Sotomayor, R. Rivera, V. Secor, G. y Espinoza, B. 2003. Resistencia de *Phytophthora infestans* (montagne) de bary a metalaxil, en cultivo de papas en el norte de chile. *revista agricultura técnica. chile*. vol. 63. n2.
- Rondón, J. y Cumana, L. (2005). Revisión Taxonómica del género *Theobroma* (*Sterculiaceae*) en Venezuela. *Acta. Bot. Venez*, 28(1), 113-133.
- Scheffer, R. (1997). The nature of disease in plants. Cambridge University Press, Cambridge.

- Suarez, L. y Rangel, A. (2013). Aislamiento de microorganismos para control biológico de *Moniliophthora roreri*. *Revista Acta Agronómica* 62:370 – 378
- Tahi G, Kébe B, Goran J, Sangaré A, Mondeil F, Cilas C, Eskes A. (2006). Eficacia de selección esperada para la resistencia a la podredumbre de la cacao (*Phytophthora palmívora*) comparando inoculaciones de disco de hoja con Observaciones de campo. *Euphytica* 149: 35-44.
- Torres de la Cruz, M.; García Ortiz, C.; Téliz Ortiz, D.; Aguilera, A. M.; y Díaz, C. N. (2011). Temporal *Acta Agronómica*. 63 (4) 2014, p 388-399 399 progress and integrated management of frosty pod rot (*Moniliophthora roreri*) of cocoa in Tabasco, Mexico. *J. Plant Pathol.* 93:31 - 36.
- Urquillas L. (2004). Inducción de la germinación para mejorar la eficiencia de dos agentes antagonicos para el control de la monilia (*Crinipellis roreri*) del cacao (*Theobroma cacao*) (tesis de Maestría) Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE). Turrialba, Costa Rica. 72 p.

ANEXOS

ANEXO 1.**Obtención e identificación de los aislados.**

ANEXO 2.

Patogenicidad y agresividad de *Phytophthora* spp.



ANEXO 3.

Sensibilidad *in vitro* de *Phytophthora* spp.



ANEXO 4.

Caracterización cultural *Phytophthora* spp.