CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y PATOGÉNICA DE *Phytophthora palmivora* Butl. EN CLONES REGIONALES DE *Theobroma cacao* L. EN LAS VARAS, TUMACO.

ANGELA CAROLINA TORRES GELPUD
MARIA JOSE VASQUEZ LAGOS

UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS AGRÍCOLAS
PROGRAMA DE INGENIERÍA AGROFORESTAL
SAN JUAN DE PASTO
2019

CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y PATOGÉNICA DE *Phytophthora palmivora* Butl. EN CLONES REGIONALES DE *Theobroma cacao* L. EN LAS VARAS, TUMACO.

ANGELA CAROLINA TORRES GELPUD
MARIA JOSE VASQUEZ LAGOS

Trabajo de Grado presentado como requisito parcial para optar al título de INGENIERO AGROFORESTAL

Presidente de tesis:

Claudia Milena Quiroz M.Sc.

UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS AGRÍCOLAS
PROGRAMA DE INGENIERÍA AGROFORESTAL
SAN JUAN DE PASTO
2019

NOTA DE RESPONSABILIDAD

Las ideas y conclusiones aportadas en el siguiente trabajo son responsabilidad exclusiva del autor.

Artículo 1ro del Acuerdo No. 324 de octubre 11 de 1966 emanado del Honorable Consejo Directivo de la Universidad de Nariño.

Nota de aceptación:

_____
_____
_____
_____
_____
_____
_____
_____
_____

_____
Firma de presidente de tesis

_____
Firma de jurado

_____
Firma de jurado

San Juan de Pasto, Septiembre de 2019.

Dedicatoria

Ángela Carolina Torres

Principalmente a Dios, porque me permitió culminar esta etapa con éxito.

A mi ángel en el cielo, mi padre Marco Torres, quien me acompañó en todo mi proceso incondicionalmente, mis más grandes logros son por él y para él.

María José Vásquez

A Dios, por permitirme alcanzar este logro.

A mi madre, Marlene Lagos, quien me brinda su amor incondicional y es la base de todos mis logros.

A mis hermanos, Andrés, Mario e Ivonne, por el amor y el apoyo que me han brindado siempre.

A mis sobrinos, Jorge Andrés, Santiago, Karla y Martín, quienes son el motor para avanzar y seguir cumpliendo metas.

A mi tía y madrina Carmen Lagos, por su apoyo emocional y compañía incondicional.

Agradecimientos

A nuestra presidente de tesis M.Sc Claudia Milena Quiroz, docente de la Facultad de Ciencias Agrícolas, Universidad de Nariño; por acompañar y dirigir este proceso, por ser una persona constante y brindarnos su apoyo académico en cada una de las etapas de este trabajo.

A la docente Ph.D Claudia Salazar Gonzales, líder del grupo investigación de Sanidad Vegetal, de la Universidad de Nariño, quien permaneció dispuesta a colaborarnos en todo momento y nos permitió hacer parte de dicho grupo, así como también realizar nuestro trabajo dentro de las instalaciones de GRISAV.

Al docente Ph.D William Ballesteros, quien nos colaboró muy atentamente en lo referente a temas estadísticos y permaneció disponible ante cualquier duda.

Al grupo de investigación en Sanidad Vegetal, por permitirnos hacer parte de este, trabajar en su laboratorio y facilitarnos sus equipos, así como también un agradecimiento especial a los integrantes Omar Yela, Bladimir Gómez y Carlos Florez por brindarnos su amistad, colaboración y apoyo.

A don Gustavo Mindineros, líder comunitario, por conseguirnos los permisos para entrar a las fincas productoras de cacao y guiarnos y acompañarnos durante el muestreo realizado en el Consejo Comunitario Las Varas, municipio de Tumaco.

A la Universidad de Nariño, a la Facultad de Ciencias Agrícolas y al Programa de Ingeniería Agroforestal, muchas gracias.

Tabla de contenido

1. Resumen……...2

2. Abstract…….3

2. Introducción...……..4

2. Materiales y métodos……...5

2.1. Localización……5

2.2. Muestreo……..…….....5

2.3. Preparación de cámaras húmedas……6

2.4. Aislamiento y purificación del Oomyceto…….....6

2.5. Caracterización morfológica de *P. palmivora*…….....7

2.6. Pruebas de patogenicidad…….8

2.7. Diseños experimentales……9

2.8 Análisis de la información…….....11

3. Resultados y discusión……....11

3.1. Caracterización morfológica…….....11

3.2 Descripción microscópica de la colonia…….....13

3.3. Pruebas de patogenicidad……16

4. Conclusiones…….....22

5. Referencias…….....23

Lista de tablas

Tabla 1. Escala de severidad de frutos afectados por *P. palmivora* en frutos de *Theobroma cacao* L.……..……..9

Tabla 2. Tratamientos de las pruebas de patogenicidad……..……10

Tabla 3. Características morfológicas macroscópicas de los aislamiento de *P. palmivora*…….11

Tabla 4. Variables microscópicas *Phytophthora palmivora* Butl……14

Tabla 5. Tasa de desarrollo de la mazorca negra (*P. palmivora*) en los tratamientos evaluados……...21

Lista de figuras

Figura 1. Mapa de muestreo realizado en tres zonas del Consejo Comunitario las Varas, Tumaco - Nariño……6

Figura 2. Estructuras microscópicas de *P. palmivora*. A. Micelio cenocítico, B. Ramificación simpodial, C. Esporangio con papila, D. Clamidosporas……...13

Figura 3. Mazorcas de cacao de CCL24 a los 3, 5, 7 y 9 días después de la inoculación con *Phytophthora palmivora*……..……17

Figura 4. Grado de sintomatología de los clones de cacao (*T. cacao* L.) después de la inoculación con *P. palmivora*……..….18

Figura 5. Severidad de la enfermedad de los aislamientos de *P. palmivora* después de la inoculación en los clones de cacao (*Theobroma cacao L.*)……..19

Caracterización morfológica y patogénica de *Phytophthora palmivora* Butl. en clones regionales de *Theobroma cacao* L. en las Varas, Tumaco*

Morphological and pathogenic characterization of *Phytophthora palmivora* Butl. in the regional clones of cocoa (*Theobroma cacao* L.) in the Varas, Tumaco.

Ángela Carolina Torres G.; María José Vásquez L.; Claudia Milena Quiroz.

*Artículo de trabajo de grado para optar por el título de Ingeniero Agroforestal en la facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad de Nariño.

1 Estudiante de Ingeniería Agroforestal, Facultad de Ciencias Agrícolas, Universidad de Nariño, Pasto, Colombia. caritotorres1996@gmail.com
2 Estudiante de Ingeniería Agroforestal, Facultad de Ciencias Agrícolas, Universidad de Nariño, Pasto, Colombia. mariajose-2796@hotmail.com
3 I. AF. M.Sc. Docente investigador, Facultad de Ciencias Agrícolas, Universidad de Nariño, Pasto, Colombia. cmqo@hotmail.com.

RESUMEN

La mazorca negra (*Phytophthora palmivora* Butl.), en Tumaco, es una enfermedad que afecta a las variedades regionales de cacao. Por esto, se planteó caracterizar morfológicamente y patogénicamente a *P. palmivora* presente en las Varas. Para esto se contó con nueve aislamientos (P, P1, P7, PC6, JC5, R1, R2, R3, R4); se utilizó un diseño irrestrictamente al azar con 9 tratamientos (aislamientos), y 4 repeticiones, para un total de 36 unidades experimentales. Se evaluó: patrón cultural, tasa de crecimiento, largo, ancho, relación L/A de zoosporangios y diámetro de clamidosporas. La patogenicidad se determinó mediante diseño experimental irrestrictamente al azar, bifactorial, con 4 repeticiones, el factor uno correspondió a los 9 aislamientos de *P. palmivora*, el factor dos, los clones regionales (CCL02, CCL07, CCL10, CCL24 y CCN51). Se encontraron diferencias significativas para largo, ancho, relación L/A de zoosporangios y diámetro de clamidosporas. Los esporangios de R4, R3, y P, fueron los más largos, con promedios de 55.8, 55.3 y 54 µm, respectivamente; así mismo, R4 y P, tuvieron los promedios más anchos, con valores entre de 40 y 39.8 µm respectivamente. En los aislamientos R3 y R2 estuvieron las clamidosporas de mayor

tamaño, con 42.86 y 40.84 µm. Los tratamientos 6, 7, 8, 9 y 10, obtuvieron los menores grados de sintomatología (grado 1), ante P1. Los tratamientos donde se inoculó el aislamiento P, fueron los de mayor susceptibilidad. Existe variabilidad morfológica y patogénica entre los aislamientos de *P. palmivora*.

Palabras clave: Enfermedad; Oomycete; Variabilidad genética; Virulencia.

ABSTRACT

The Black Pod (*Phytophthora palmivora*.), in Tumaco, is a disease that affects regional varieties of cocoa. Therefore, this study was proposed to characterize morphologically and pathogenically a *P. palmivora*, in the Varas. For this, nine isolations (P, P1, P7, PC6, JC5, R1, R2, R3, R4); an unrestricted random design was carried out with 9 treatments (isolations), and 4 repetitions per treatment, for a total of 36 experimental units. It was evaluated: cultural pattern, growth rate: length, width and the relation of zoosporangium and the diameter of chlamydospores. Pathogenicity was determined by unrestrictedly random, bifactorial experimental design, with 4 repetitions, the factor one were the 9 isolates of *P. palmivora*, while the factor two regional clones (CCL02, CCL07, CCL10, CCL24 and CCN51). The data were analyzed with the software SAS ($p< 0.05$) and a probability of 95%. Significant differences were found for the length /width, in relation to zoosporangium and diameter of chlamydospores. The zoosporangium of R4, R3, y P were the longest, with an average of 55.8, 55.3 y 54µm, respectively; in the same way, R4 and P had the widest averages, with values between 40 and 39.8 µm respectively. In the isolations R3 and R2 were the largest chlamydospores, with 42.86 and 40.84 µm. The treatments 6, 7, 8, 9 and 10, had the lowest degrees of symptomatology (grade 1), to P1. In contrast, the treatments where P isolation was inoculated, were the most susceptible and therefore. There is morphological and pathogenic variability between the isolations of *P. palmivora*.

Keywords: Disease; oomycete; genetic variability; virulence.

1. INTRODUCCIÓN

Para el año 2018, en Colombia, se estimó una producción de 101.019,94 toneladas de cacao, con un área sembrada de 190.469,94 hectáreas; durante los últimos cuatro años el cultivo de cacao ha presentado un crecimiento en cuanto al área sembrada del 3% anual (Agronet, 2018). En el año 2017, Colombia exportó 2.304 toneladas de cacao en grano, 2.475 toneladas de manteca de cacao y 1.043 toneladas de pasta de cacao, así mismo, en el país existen alrededor de 35 mil familias productoras de cacao y en varias de ellas, este cultivo ha sido utilizado como alternativa a los cultivos ilícitos (FINAGRO, 2017).

En Nariño se determinó que el área ocupada por el cultivo de cacao para el año 2018 fue de 22.483 hectáreas, ocupando el tercer a nivel nacional, con una producción de 4.146,87 toneladas y para el municipio de Tumaco el área de cacao cultivada fue de 18.600 hectáreas con una producción de 2.800 ton (Agronet, 2018).

La pudrición negra del fruto causada por *P. palmivora* Butl., es un problema económico serio en todas las regiones del mundo donde se cultiva *T. cacao*, causando pérdidas significativas de las cosechas que pueden alcanzar del 60 al 100% de la producción, dependiendo de las condiciones ambientales (Hernández *et al*., 2014).

Para el caso del cacao, los principales síntomas que manifiesta el cultivo una vez es infectado por *P. palmivora* son: quemaduras en diferentes órganos de la planta, úlceras malignas del tallo y la pudrición negra del fruto. Las mayores pérdidas ocurren cuando la enfermedad afecta al fruto, provocando pudriciones del 30% de las mazorcas y la muerte de hasta el 10% de las plantas, anualmente (Guest, 2007). Cabe resaltar que en Tumaco todavía no se considera la mazorca negra como un problema de importancia, debido a que solo se presentan pequeños brotes de la enfermedad, sin embargo si representa un problema potencial a largo plazo.

Por lo tanto, la información acerca de la variabilidad genética de *P. palmivora* y las variaciones de la patogenicidad entre las poblaciones presentes en las regiones donde se explota comercialmente el cultivo de cacao, resulta de utilidad para adoptar esquemas de manejo integrado de la mazorca negra en los sistemas de producción en los cuales la especie perenne es uno de sus componentes, así mismo, para asistir a programas de mejoramiento genético, en la selección de variedades tolerantes a la enfermedad (Enríquez y Paredes, 2000).

Con el fin de contribuir al conocimiento de la variabilidad genética de *P. palmivora* se planteó esta investigación cuyo objetivo fue determinar las características morfológicas y el grado de virulencia de *P. palmivora* Butl., en las variedades regionales de cacao (*Theobroma cacao* L.) del Consejo Comunitario Rescate las Varas, municipio de Tumaco, aportando al conocimiento científico de este patógeno.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Localización. La colecta de los frutos de cacao afectados por *P. palmivora*, se realizó en fincas el Consejo Comunitario las Varas, municipio de Tumaco, ubicadas a una altitud entre 0 y 50 m, con una precipitación anual de 2290 mm, temperatura media anual de 25,8ºC (Alcaldía de Tumaco, 2018). El aislamiento, purificación e identificación del patógeno, caracterización morfológica y pruebas de patogenicidad, se realizaron en los laboratorios del Grupo de Sanidad Vegetal - GRISAV pertenecientes a la Universidad de Nariño, sede Torobajo, a una altitud de 2720 m y temperatura media anual de 14ºC (CORPONARIÑO, 2015).

2.2 Muestreo. Se muestrearon tres zonas dentro del Consejo, las cuales correspondían a: zona de influencia costera, zona de colinas bajas y zona de carreteras (Figura 1), en cada zona se recolectaron tres muestras, para obtener un total de 9 aislamientos a caracterizar, que en cada caso fueron georreferenciados.

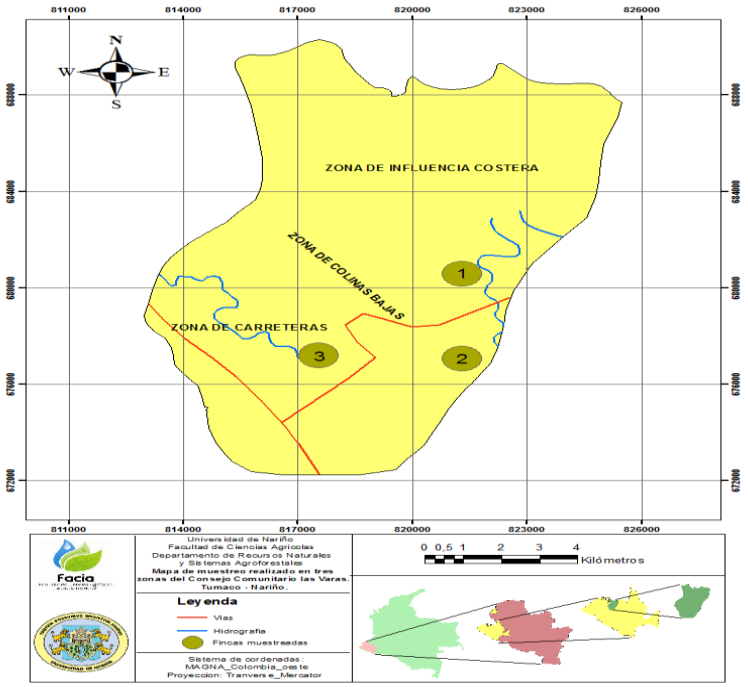


Figura 1. Mapa de muestreo realizado en tres zonas del Consejo Comunitario las Varas, Tumaco - Nariño.

2.3 Preparación de cámaras húmedas. Las muestras se lavaron con agua potable con el fin de eliminar contaminantes externos, para ello se dejó correr el agua por la superficie de las mazorcas durante al menos 2 min, para lograr mayor asepsia, las muestras se desinfectaron con una solución al 3% de hipoclorito durante 1 min, y se enjuagaron con agua destilada estéril por 1 min, las muestras se dejaron secar en la cámara de flujo laminar (Castaño-Zapata *et al*., 1997).

Posteriormente, se introdujeron las muestras en cámara húmeda, la cual consistió en una bolsa de plástico, con una mota de algodón, humedecida con agua, en donde el material vegetal permaneció a temperatura ambiente entre 24 y 72 horas con permanente observación, (Castaño-Zapata *et al*., 1997).

2.4 Aislamiento y purificación del oomicete. El aislamiento de *P. palmivora* se hizo por medio de siembra directa de la epidermis de las mazorcas y se utilizó medio de cultivo agar avena, compuesto por 30g de avena y 15g de agar bacteriológico para un litro de agua,

además, al medio en su preparación, se le agrego antibiótico y fungicida, que en este caso fueron Rifampicina al 0,1% y Benomil al 0,01%, para evitar la contaminación de los aislamientos.

Para la siembra, con el bisturí flameado se tomaron partes del margen de las lesiones que contenían tejido entre enfermo y sano de aproximadamente 0,4 x 0,4 cm, seguidamente se lavaron con abundante agua destilada estéril (ADE) y con hipoclorito sódico al 3% por un min y nuevamente se sumergieron dos veces en agua destilada por un min, para retirar el exceso del desinfectante; se procedió a realizar la siembra de éstos en las cajas Petri y se incubaron a una temperatura de 25ºC (Castaño-Zapata *et al*., 1997).

Para la purificación del patógeno, se hicieron observaciones al microscopio de las estructuras tomadas de las colonias desarrolladas alrededor de los cultivos para confirmar la presencia del oomycete; de las colonias donde se evidenció la presencia de *P. palmivora*, se hicieron repiques en el medio de cultivo continuamente, hasta lograr la purificación de los aislamientos, para su posterior multiplicación y evaluación (Ames, 2004).

2.5 Caracterización morfológica de los aislamientos

Para realizar la caracterización morfológica se tuvo en cuenta las siguientes variables:

Descripción de la colonia o patrón cultural. Se definió el color, textura, hábito de crecimiento, aspecto del micelio, tipo de crecimiento, patrón de crecimiento y forma del borde (Santacruz, 2013).

Tasa de crecimiento de la colonia. Se determinó mediante la medición de diámetro horizontal y vertical de la colonia en cm a los 2, 4 y 6 días después de la siembra (dds) esto según la metodología utilizada por Santacruz (2013).

Descripción microscópica. Se realizó una descripción de las siguientes estructuras producidas por el patógeno: esporangios y clamidosporas; considerando variables tales como: forma, largo, ancho, relación L/A y diámetro dependiendo de la estructura estudiada (Machado *et al*., 2008).

Para la caracterización de clamidosporas y esporangios se hicieron 25 descripciones para cada estructura, en la etapa de desarrollo intermedia se analizaron clamidosporas y en la etapa inicial los esporangios, el conteo y las mediciones se obtuvieron de 3 fotografías por aislamiento, realizadas en un microscopio con cámara y a un objetivo de 40X (Machado *et al*., 2008), la medición del largo y ancho de los esporangios así como también del diámetro de las clamidosporas se hizo mediante la utilización del software libre ImageJ 1.41.

2.6 Pruebas de patogenicidad. Se llevaron a cabo utilizando la metodología propuesta por Tuset *et al*. (1993), para esto se tomaron frutos sanos de aproximadamente tres meses de edad, los cuales para garantizar su absoluta esterilización, fueron desinfestados con hipoclorito de sodio al 3%, lavados con ADE (agua destilada estéril) para retirar el exceso de desinfectante y flameados después de haber sido rociados con alcohol. Posteriormente se les realizó una incisión en la parte superior del fruto en forma de triángulo, donde se inocularon con dos discos de 1cm de diámetro, obtenidos de cultivos puros de los aislamientos del oomycete. Una vez inoculadas las mazorcas, se incubaron en cámara de humedad, por un periodo de 6 a 14 días, a temperatura ambiente, tiempo en el cual se midieron las variables a evaluar.

Las variables, resistencia y tasa de desarrollo de la enfermedad, se evaluaron a partir de los datos que se tomaron a los 3, 5, 7 y 9 días después de la inoculación. La resistencia de los clones hacia el *P. palmivora* se determinó siguiendo la clasificación recomendada por Villavicencio y Jiménez (2010) (Tabla 1) y la tasa de desarrollo de la enfermedad, se determinó a partir de la medición de la severidad de la enfermedad (porcentaje de tejido afectado por la mazorca negra), utilizando la fórmula propuesta por Van Der Plank (1963)

$$r = \frac{1}{t1 - t0}\left[log\frac{x1}{1 - x1} - log\frac{x0}{1 - x0}\right] \; x \geq 0{,}5$$

Tabla 1. Escala de severidad de frutos afectados por *P. palmivora* en frutos de *Theobroma cacao* L.

Grado	Síntoma
0	Ningún síntoma aparente
1	Pequeños y pocos puntos aceitosos
2	Puntos aceitosos bien definidos y abundantes, más deformación o madurez irregular.
3	Necrosis sin esporulación
4	Necrosis más esporulación en un área menor de la cuarta parte de la superficie necrótica.
5	Necrosis más esporulación en un área mayor de la cuarta parte de la superficie necrótica.

2.7 Diseños experimentales. Para la caracterización morfológica de los aislamientos se utilizó un diseño irrestrictamente al azar con 9 tratamientos, los que correspondieron a los 9 aislamientos de *P. palmivora* y 4 repeticiones por tratamiento (Machado *et al*., 2008), para un total de 36 unidades experimentales, siendo la unidad experimental una caja de Petri. La tasa de crecimiento media de las cuatro repeticiones se calculó para todos los aislamientos y los valores obtenidos se normalizaron mediante (ArcoSen√%).

La evaluación de las pruebas de patogenicidad, específicamente de la severidad y la resistencia, se hizo por medio de un diseño experimental irrestrictamente al azar, bifactorial, con 4 repeticiones por tratamientos, el factor uno correspondió a los 9 aislamientos de *P. palmivora*, el factor dos, las variedades regionales (CCL02, CCL07, CCL10 y CCL24) y el universal CCN51, destacado por ser un material de comprobada alta susceptibilidad a *P.*

palmivora (*Rodríguez y Vera*, 2015). Los 9 aislamientos se inocularon por separado en cada uno de los clones, para un total de 45 tratamientos y 180 unidades experimentales (Tabla 2).

Tabla 2. Tratamientos de las pruebas de patogenicidad.

Tratamiento	Cepa	Clon	Tratamiento	Cepa	Clon	Tratamiento	Cepa	Clon
1		CCL10	16		CCL10	31		CCL10
2		CCL24	17		CCL24	32		CCL24
3	P	CCN51	18	R1	CCN51	33	R4	CCN51
4		CCL02	19		CCL02	34		CCL02
5		CCL07	20		CCL07	35		CCL07
6		CCL10	21		CCL10	36		CCL10
7		CCL24	22		CCL24	37		CCL24
8	P1	CCN51	23	R2	CCN51	38	JC5	CCN51
9		CCL02	24		CCL02	39		CCL02
10		CCL07	25		CCL07	40		CCL07
11		CCL10	26		CCL10	41		CCL10
12		CCL24	27		CCL24	42		CCL24
13	P7	CCN51	28	R3	CCN51	43	PC6	CCN51
14		CCL02	29		CCL02	44		CCL02
15		CCL07	30		CCL07	45		CCL07

2.8 Análisis de la información. Los datos obtenidos se analizaron mediante un análisis de varianza (ANOVA), cuando se presentaron diferencias estadísticas significativas una prueba de Tukey fue suficiente para separar los factores y sus interacciones, todos los experimentos se analizaron con una probabilidad del 95% y se procesaron con el paquete estadístico SAS v. 9.4.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se obtuvieron 9 aislamientos de *P. palmivora,* siendo R1, R2, R3 pertenecientes a la zona de carreteras, P1, P7, R4 a la zona de colinas bajas y JC5, PC6, P a la zona de influencia costera.

3.1 Caracterización morfológica de los aislamientos

Para la descripción de la colonia o patrón cultural, de manera general se pudo observar que en el total de los aislamientos de *P. palmivora,* el color que presentaban las colonias tanto en haz como envés fue blanco crema, la textura que se observó fue algodonosa y en cuanto al hábito de crecimiento del patógeno fue de tipo ligeramente estrellado (Tabla 3), aunque en algunos casos se presentó de forma radiada. Estos resultados fueron similares a los encontrados por Pérez *et al.*, (2010), quienes manifiestan que es característico *P. palmivora*, el hábito de crecimiento ligeramente estrellado o marcadamente radiado, con bordes redondeados, que frecuentemente es aéreo.

Tabla 3. Características morfológicas macroscópicas de los aislamiento de *P. palmivora*.

Muestra	Color	Textura	Habito de Crecimiento	Aspecto	Tipo de crecimiento	Patrón de crecimiento	Forma del borde
R2	Blanco	Algodonosa	Estrellado	Denso	Aéreo	Continuo	Circular
PC6	Blanco	Algodonosa	Estrellado	Denso	Aéreo	Discontinuo	Irregular

P7	Blanco	Algodonosa	Estrellado	Ralo	Plegado	Discontinuo	Circular
R3	Blanco	Algodonosa	Estrellado	Denso	Aéreo	Continuo	Circular
R4	Blanco	Algodonosa	Estrellado	Denso	Aéreo	Continuo	Circular
P1	Blanco	Algodonosa	Radiado	Denso	Aéreo	Continuo	Circular
R1	Blanco	Algodonosa	Estrellado	Denso	Aéreo	Discontinuo	Irregular
P	Blanco	Algodonosa	Radiado	Ralo	Aéreo	Continuo	Circular
JC5	Blanco	Algodonosa	Estrellado	Ralo	Aéreo	Discontinuo	Irregular

Machado *et al.* (2013), evaluaron 89 aislamientos, encontrando que la forma de crecimiento más común para *P. palmivora*, es estrellada, de igual manera Volpe *et al.* (2019) realizaron un estudio con 31 aislamientos de *P. palmivora,* donde el 93,5% presentó micelio ligeramente estrellado y algodonoso.

En cuanto a la tasa de crecimiento de la colonia se determinó que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los aislamientos de *P. palmivora* evaluados (P, P1, P7, PC6, JC5, R1, R2, R3, R4), siendo 90 mm, el valor alcanzado para todos los aislamientos, esto debido a que al finalizar la toma de mediciones todas las muestras evaluadas habían llegaron al límite de crecimiento posible y el cual se determinaba por el tamaño de la caja Petri en donde se desarrollaban. Steer y Coates (1991) afirmaron que el diámetro promedio después de tres días de la siembra de *P. palmivora*, fue 74 mm, lo que permitió establecer que la colonia obtuvo rápido crecimiento en ambos casos.

En la investigación llevada a cabo por González *et al.* (2014), se evaluó el crecimiento de *Phytophthora* sp., encontrándose que el 90% de las muestras alcanzaron un crecimiento de

90 mm a los seis días después de la siembra, resultado que es igual al encontrado en el presente estudio.

3.2 Descripción microscópica de la colonia

Se observó el micelio cenocítico (Figura 2A), así como también, la ramificación de los mismos, que fue típica simpodial (Figura 2B), en cuanto a los esporangios, estos fueron ovoides y elipsoides, los cuales presentaron formación de papila (Figura 2C), además, en la totalidad de los aislamientos había una abundante formación de clamidosporas usualmente hialinas (Figura 2D); algo usual de *P. palmivora*. Martínez *et al.* (2010), en su investigación observaron claramente los esporangios papilados, elipsoides con un pedicelo corto, así mismo Volpe *et al.* (2019), indican que los aislamientos produjeron abundantes esporangios los cuales fueron deciduos y papilares, predominantemente de forma elipsoidal.

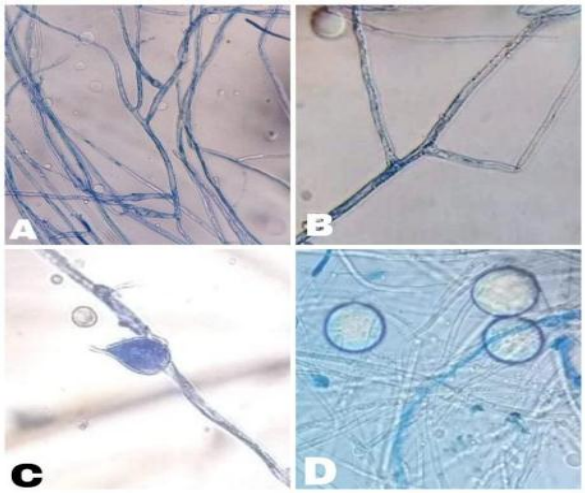


Figura 2. Estructuras microscópicas de *P. palmivora*. A. Micelio cenocítico, B. Ramificación simpodial, C. Esporangio con papila, D. Clamidosporas.

En cuanto a la variable largo de esporangios se encontraron diferencias estadísticamente significativas (Pr>0,05) entre los aislamientos evaluados; se determinó que los aislamientos R4, R3, y P, presentaron un mayor largo con respecto al resto de aislamientos comparados, los valores promedios que se obtuvieron fueron 55.8, 55.3, y 54 µm respectivamente, así mismo se estableció que el aislamiento de menor largo promedio de esporangios fue PC6, con un tamaño promedio de 40,8 µm (Tabla 4).

Tabla 4. Variables microscópicas *Phytophthora palmivora* Butl.

Aislamientos	Largo sporangios (µm)	Ancho de orangios (µm)	Relación Largo/Ancho orangios (µm)	Diámetro midosporas (µm)
R1	45,8	32,3	1,5	39,6
R2	42,6	31,7	1,1	40,8
R3	55,3	34,4	1,7	42,8
R4	55,8	40,0	1,2	35,1
P1	42,0	30,7	1,3	36,6
P7	44,4	31,8	1,2	33,2
JC5	47,2	28,5	1,8	38,8
PC6	40,8	24,6	1,6	37,4
P	54,0	38,9	1,3	39,3

Torres-Londono (2016), en un estudio donde se realizó la caracterización morfológica de 186 aislamientos de *P. palmivora,* encontró que el largo promedio fue de 43.24 µm, lo que resultó similar a los datos obtenidos en la presente investigación.

Referente al ancho de los esporangios, se determinó que existían diferencias estadísticamente significativas (Pr>0,05) entre los aislamientos. Los valores más altos del ancho de los esporangios se presentaron en R4 y P, con valores promedio de 40, y 39.8µm respectivamente, por otro lado el aislamiento PC6 fue en el cual se encontró el menor promedio en cuanto al ancho de esporangios con un valor de 24.5 µm (Tabla 4), resultados

muy cercanos a los encontrados por Torres-Londono (2016), quién determinó en su estudio que el ancho promedio de los esporangios fue 25.4 µm.

Steer y Coates (1991) señalaron que para *P. palmivora*, la longitud promedio de los esporangios varía considerablemente, oscilando entre 45 y 69 µm y el promedio del ancho fluctúa entre 28 y 35 µm, lo que está muy cerca de los resultados encontrados en el presente estudio, donde en general el promedio del tamaño de los esporangios fue de 47.58 µm x 32.60 µm, asemejándose a lo dicho por Machado *et al.* (2013), quienes determinaron que las medias encontradas en cuanto al tamaño de esporangios fueron 48.4 µm x 31.5 µm, en concordancia también con lo dicho por Martínez *et al*. (2010), quienes afirmaron que el tamaño promedio de los esporangios en *P. palmivora* fue de 52 µm x 37.1 µm, por lo que se puede argumentar que el tamaño de los esporangios puede variar teniendo en cuenta factores como la humedad, la tensión de oxígeno, la luz, la temperatura y la nutrición esto según lo manifestado por Flórez (2015).

Con respecto, al diámetro de las clamidosporas, se encontraron diferencias significativas (Pr>0,05) entre los aislamientos de *P. palmivora* evaluados, los mayores diámetros correspondieron a los aislamientos R3 y R2 con valores de 42.86 y 40.84 µm, respectivamente, así mismo se determinó que el menor diámetro se presentó en el aislamiento P7, con 42.86 µm (Tabla 4). Al comparar con los resultados encontrados por Martínez *et al*. (2010), donde el diámetro promedio de las clamidosporas fue de 42.4 µm y se encontraron de forma abundante en medios de cultivo, para el caso del presente estudio, el diámetro promedio de clamidosporas para los 9 aislamientos evaluados fue de 38.1µm, algo similar ocurrió en el estudio realizado por Torres-Londono (2016), en el que el diámetro promedio de 186 aislamientos fue 32.72µm.

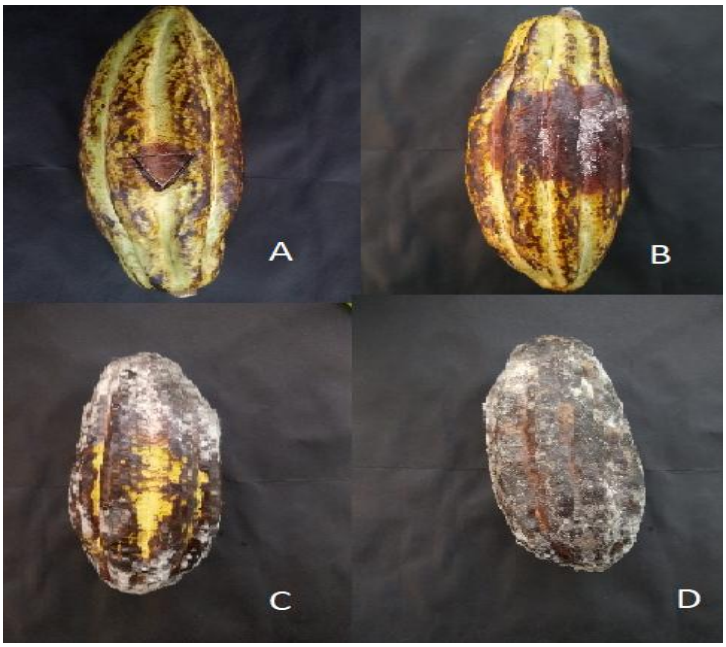
En la variable relación L/A de esporangios, se encontraron diferencias estadísticamente significativas (Pr>0,05) entre los aislamientos evaluados, estableciéndose que los de mayor relación L/A fueron JC5, R3 y PC6, con valores de 1.8, 1.7 y 1.6 µm respectivamente, en contraste con el aislamiento R2 el cual tuvo la menor relación L/A, con un valor de 1.1 micras, así mismo el promedio fue de 1.4 µm (Tabla 4); siendo la relación largo ancho

(RL/A) una variable de importancia que representa que tan ovalados son los esporangios, es decir, los valores más cercanos a 1 tienden a ser más redondos y los más lejanos son de forma ovoide.

Machado *et al*. (2013), quienes evaluaron 89 aislamientos de 10 países diferentes, aseguran que la relación L/A promedio para los aislamientos de *P. palmivora* fue de 1.5µm, siendo estos resultados similares a los determinados en el presente estudio. Así mismo Volpe *et al*. (2019) Afirmaron que la relación L/A varió de 1.3 a 1.9; además otros autores como Martínez y Pérez (2016), quien trabajaron con *P. palmivora* afirmaron que el rango promedio de la proporción largo ancho de los esporangios fue de 1.6-2 µm, rangos en el que se encuentra el promedio obtenido en esta investigación.

3.3 Pruebas de patogenicidad. Los síntomas de la enfermedad iniciaron a los 3 - 4 días en el 90% de las muestras después de la inoculación del patógeno en los frutos sanos, con una pequeña mancha aceitosa con bordes definidos. Con el paso de los días la mancha se tornó a una necrosis que empezaba desde la parte superior de la mazorca y que a medida de que la necrosis aumentaba su tamaño, inició la aparición de micelio blanco sobre ella, finalizando con la necrosis total del fruto (Figura 3). En referencia, Martínez *et al.* (2010), presenciaron la primera aparición de los síntomas el día 4 después del inóculo, en el 85% de las muestras evaluadas.

La infestación por mazorca negra (*P. palmivora*) se inicia con una mancha de color negra, con límites bien definidos, usualmente se presentan en los extremos de la mazorca; sobre la superficie afectada se produce la aparición de micelio blanquecino, en la que se forma la masa de esporas. La mazorca finalmente se ennegrece totalmente y se marchita (ICA, 2012).



A: Puntos aceitosos bien definidos y abundantes, más deformación o madurez irregular, B: Mancha marrón más esporulación, C: Necrosis más esporulación, D: Necrosis en 100% del fruto.

Figura 3. Mazorcas de cacao de CCL24 a los 3, 5, 7 y 9 días después de la inoculación con *Phytophthora palmivora.*

En referencia a la resistencia se encontraron diferencias significativas (Pr>0,05), siendo los tratamientos 6, 7, 8, 9 y 10, los que obtuvieron los menores grados de sintomatología, es decir todos los clones resultaron resistentes ante el aislamiento P1, en contraste con los tratamientos 1, 2, 3, 4 y 5, que por su parte fueron los que presentaron mayores valores de susceptibilidad; en cuanto a los demás tratamientos, en su mayoría fueron poco resistentes ante los diferentes aislamientos, manteniéndose en un rango de 3 a 4 grados, en otros términos, se clasificaron en la categoría de altamente susceptibles, alcanzando en poco tiempo la pudrición de los frutos (Figura 4). Sin embargo, se pudo establecer que clones CCL07 y CCL24 presentaron una tendencia en cuanto a mayor resistencia con respecto a los 9 aislamientos evaluados.

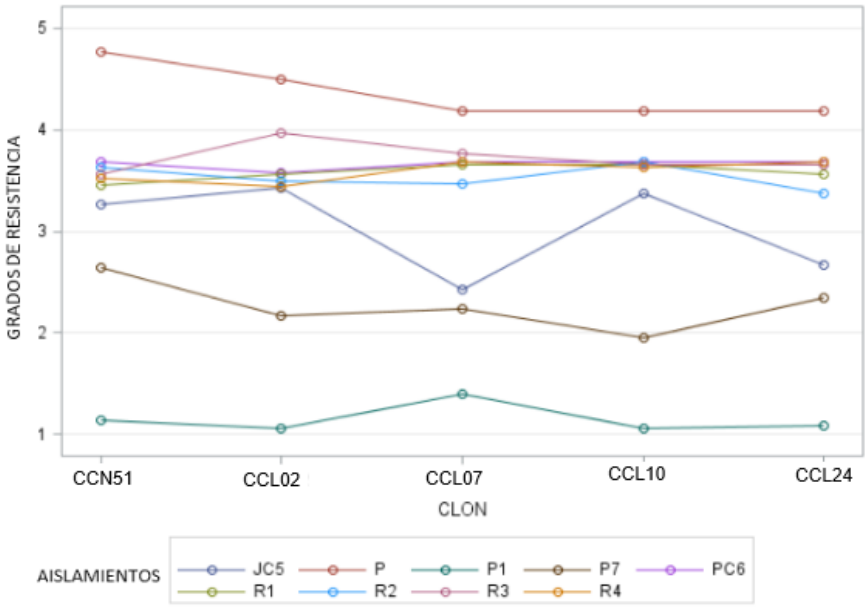


Figura 4. Grado de sintomatología de los clones de cacao (*T. cacao* L.) después de la inoculación con *P. palmivora*.

De acuerdo a lo manifestado por Rodríguez (1983), la resistencia de *T. cacao* a la mazorca negra puede deberse a la interacción de los tejidos del hospedero, la cual impide o retarda la germinación de las zoosporas, dicha interacción se debe a barreras mecánicas propias de los tejidos internos del epicarpio o a la acción de sustancias que en el exterior inhiben el desarrollo de las hifas infectivas del hongo; el autor realizó un estudio donde comparó la resistencia de 11 aislamientos de *P. palmivora*, encontrando diferencias significativas entre ellos, lo que él argumenta principalmente se debe a la heredabilidad de los genes de susceptibilidad en los cultivares de cacao, además de la patogenicidad de los aislamientos evaluados. Por otro lado, los autores Vanegtern *et al.* (2015), señalaron que la resistencia puede variar en los diferentes materiales de cacao, debido al tamaño de cutícula de las mazorcas, entre otros factores; tal como, la activación de vías metabólicas y barreras bioquímicas asociadas a la defensa contra la infección (Martínez, 2015).

Delgadillo (2018), accesiones de IMC - 67, y CCN - 51, después de la inoculación con discos de agar agua en 40 muestras del material anteriormente nombrado, determinó los primeros

síntomas a los 2 días después del inóculo, lo anterior se asemeja a los resultados de esta investigación, indicando que el crecimiento de *P. palmivora* en condiciones adecuadas se da en relativamente poco tiempo, lo que se confirma con lo reportado por Rodríguez y Vera (2015), quienes afirman que los síntomas pueden aparecer 30 horas después de la infección, con pequeñas manchas acuosas, dando paso a las lesiones necróticas que pueden aparecer entre los 2 - 5 días después del inóculo.

En relación a la severidad de la enfermedad, se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos (Pr>0,05), evidenciando los menores porcentajes de severidad en los tratamientos 6, 7, 8 y 9, siendo el aislamiento P1, el menos severo, por el contrario los tratamientos 3, 4, 29, y 41, obtuvieron los mayores valores de severidad; con respecto a los demás tratamientos, los porcentajes de 30 a 40%, fueron los más frecuentes (Figura 5); sin embargo al igual que en la resistencia existió una tendencia para los clones CCL07, CCL24 y CCL10 a presentar los menores porcentajes de severidad; cabe resaltar que en este caso se tomó los promedios de severidad para realizar el análisis estadístico, por lo que los resultados son muy generales en comparación con la tasa de desarrollo, que se obtiene de acuerdo a la fórmula descrita en la metodología y en esta se tiene en cuenta el desarrollo de la enfermedad de acuerdo al tiempo transcurrido después de la inoculación.

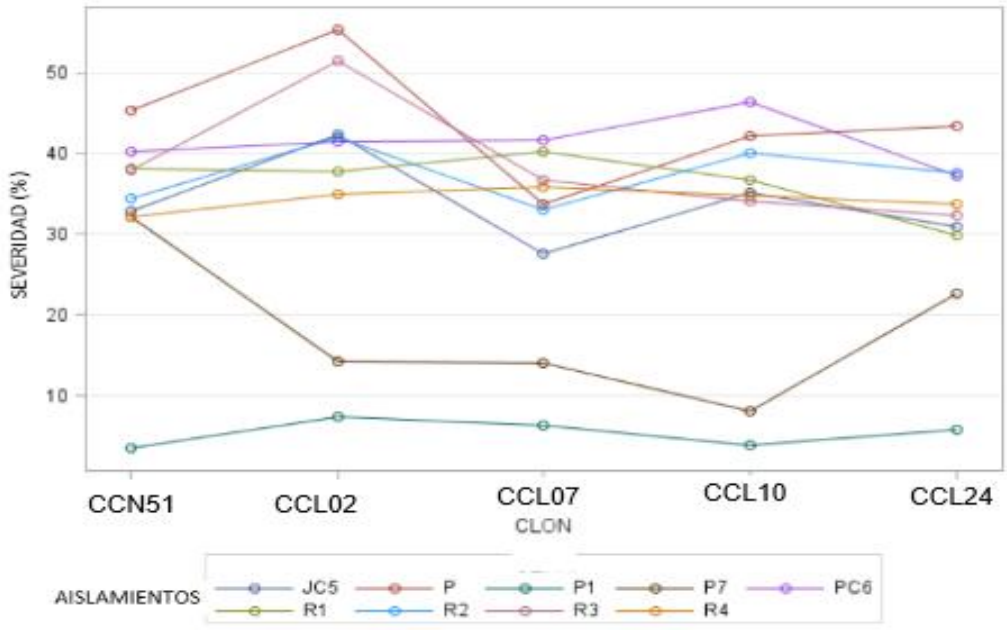


Figura 5. Severidad de la enfermedad de los aislamientos de *P. palmivora* después de la inoculación en los clones de cacao (*Theobroma cacao L.*).

En la tasa de desarrollo de la enfermedad (Tabla 5), se determinó que los tratamientos 9, 14 y 15, presentaron los menores valores, tendiendo a cero, lo que indica que la producción de estructuras reproductivas de dichas cepas es menor, en contraste con los tratamientos 4 y 39, en los cuales el valor encontrado para las tasas de desarrollo es cercano a 0.7, acercándose a 1 y reflejando los mayores porcentajes de severidad, lo que permite que la enfermedad se desarrolle en menor tiempo; en referencia a los demás tratamientos, en su mayoría presentaron valores entre 0.4 y 0.6. La tendencia tal como se indicó anteriormente es para los clones CCL07, CCL24 y CCL10, que obtuvieron los valores más cercanos a 0, lo que los cataloga como los más resistentes.

Ramírez, (2019) realizó una investigación con 80 clones de cacao, los cuales fueron inoculados con *P. palmivora* y se clasificaron de acuerdo a los niveles de severidad, en 4 categorías (Resistente- R, moderadamente resistente- MR, moderadamente susceptible- MS y susceptible- S), obteniendo el 42% de moderadamente resistentes, el 17,5 de moderadamente susceptibles, 20% susceptibles y el 15% resistentes. Esto indica que la mayoría de clones presentaron resistencia moderada al patógeno, en contraste a lo encontrado en la presente investigación, donde existieron diferencias significativas.

Según la investigación llevada a cabo por Coulibaly *et al.* (2018), en la cual se evaluaron 30 clones de cacao, con respecto a 36 aislamientos de *P. palmivora*, se encontraron diferencias estadísticas sobre la agresividad de dichos aislamientos, los autores señalan que el patógeno es muy diverso en cuanto a patogenicidad lo que se debe a la gran variabilidad genética que posee, dicha diversidad se puede encontrar tanto en aislamientos procedentes de una misma parcela o de diferentes áreas geográficas entre sí. Para este estudio los resultados fueron similares, encontrando diferencias entre los aislamientos y siendo estos provenientes de diferentes zonas.

Tabla 5. Tasa de desarrollo de la mazorca negra (*P. palmivora*) en los tratamientos evaluados.

Tratamiento	Tasa de desarrollo	Tratamiento	Tasa de desarrollo	Tratamiento	Tasa de desarrollo
1	0,50	16	0,45	31	0,48
2	0,53	17	0,38	32	0,47
3	0,45	18	0,40	33	0,44
4	0,67	19	0,32	34	0,60
5	0,40	20	0,35	35	0,56
6	0,48	21	0,50	36	0,48
7	0,48	22	0,50	37	0,20
8	0,42	23	0,56	38	0,40
9	0,04	24	0,58	39	0,67
10	0,33	25	0,62	40	0,20
11	0,08	26	0,38	41	0,57
12	0,15	27	0,39	42	0,47
13	0,59	28	0,37	43	0,41
14	0,09	29	0,37	44	0,58
15	0,43	30	0,36	45	0,55

Los resultados de este estudio, se acercan a lo reportado por Moreno (1993), en donde se inocularon plantas de cacao con *P. palmivora*, en las plantas que se inocularon por medio de herida los síntomas se presentaron a los 4 días, esto debido a que los frutos de cacao permanecieron bajo cámara húmeda, durante todo el proceso de medición de severidad por lo que la aparición de síntomas en los frutos pudo haberse acelerado de acuerdo a lo dicho por Santos *et al.* (2014), quienes observaron que al someter 4 muestras inoculadas con *P. palmivora*, a una humectación durante 60 a 70 horas, y a una temperatura de 25 a 30°C se estimuló el proceso de infección por *P. palmivora* y aumentó la susceptibilidad del huésped, influyendo en la tasa de progresión de la enfermedad. Estos mismos autores afirman que la mayoría de los hongos y oomycotas fitopatógenos requieren agua libre en la superficie del tejido del huésped para iniciar el proceso de infección, ya que la humedad es indispensable para el inicio del ciclo de infección, y por ende de las lesiones más características de la pudrición de la fruta causada por *P. palmivora.*

4. CONCLUSIONES

Los nueve aislamientos presentaron diferencias estadísticas significativas en sus estructuras, indicando que existe variabilidad genética entre estos.

Existen diferencias en cuanto al grado de patogenicidad de los nueve aislamientos de *P. palmivora*, debido a la variabilidad genética del patógeno que se expresó a través de las diferencias en el grado de sintomatología entre clones.

Los clones CCL07, CCL24 y CCL10 que presentaron una tendencia hacia la mayor resistencia a los aislamientos de *P. palmivora*, puesto que estos exhibieron los menores valores de resistencia, severidad y tasa de desarrollo.

5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agronet. (2018). Cadena de cacao: Indicadores e Instrumentos. Recuperado de https://www.agronet.gov.co/Documents/NARI%C3%91O_2017.pd

Alcaldía de Tumaco. (2018). Nuestro municipio. Recuperado de http://www.tumaco-narino.gov.co/municipio/nuestro-municipio

Ames, T. (2004). *Manual de Laboratorio para el Manejo de Hongos Entomopatógenos*. Lima, Perú: Centro Internacional de la Papa (CIP). 62 p.

Castaño-Zapata, J., Del Río, L. & Barletta, H. (1997). *Manual para el diagnóstico de: hongos, bacterias, virus y nemátodos y fitopatógenos* (No. Doc. 18857) CO-BAC, Bogotá. 210p.

CORPONARIÑO. (2015). Vertimientos Universidad de Nariño – sede Torobajo. Recuperado de http://corponarino.gov.co/expedientes/descontaminacion/porhqsantalucia.pdf

Coulibaly, K., Aka, R. A., Camara, B., Kassin, E., Kouakou, K., Kébé, B. I., Assi, M. E. (2018). Molecular identification of *Phytophthora palmivora* in the Cocoa Tree Orchard of Côte d'Ivoire and Assessment of the Quantitative Component of Pathogenicity. *International journal of Sciences,* (7): 9p. doi: 10.18483/ijSci.1707

Delgadillo, L. (2018). Estudio de la respuesta de defensa de la especie Theobroma cacao L. a la infección de *Phytophthora palmivora* (Butler). Bogotá: Universidad Nacional de Colombia. 87p.

Enríquez, G & Paredes, A. (2000). *El cultivo de cacao*. San José, Costa Rica: EUNED. 83p.

Escobar, J. (2008). Caracterización morfológica in situ de árboles regionales sobresalientes de cacao *Theobroma cacao* L, en los núcleos productivos del municipio de Tumaco – Nariño. Undergraduate thesis. FACIA, Universidad de Nariño, Pasto, Colombia. 96p.

Fondo para el financiamiento del sector agropecuario - FINAGRO. (2017). Inteligencia de mercado: cacao. Recuperado de https://www.finagro.com.co/sites/default/files/node/basic-page/files/ficha_cacao_version_ii.pdf

Flórez, M. (2015). Evaluación de la tasa de crecimiento de *phytophthora* spp. en medios alternativos. México: Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.

González, F., Costales, D., Falcón, A. (2014). Efecto de diferentes medios de cultivo sobre el desarrollo de *Phytophthora nicotianae* Breda de Haan. *Revista de Protección Vegetal*, 29(1): 33-41p.

Guest, D. (2007). Black pod: diverse pathogens with a global impact on cocoa yield. *Phytopathology*. 97(12): 1650-1653.

Hernández, A., Ruíz, Y., Acebo, Y., Miguélez, Y. & Heydrich, M. (2014). Antagonistas microbianos para el manejo de la pudrición negra del fruto en *Theobroma cacao L:* Estado actual y perspectivas de uso en Cuba. *Protección Vegetal.* 29(1):11-19.

Instituto Colombiano Agropecuario - ICA. (2012). *Manejo fitosanitario del cultivo de cacao (Theobroma cacao). Medidas para la temporada invernal. Bogotá*, Colombia. 46p.

Machado, M., Peña, M., Álvarez, A., Díaz, A., Zamora, V & Coto O. (2013). Variabilidad intraespecífica de cepas de *Phytophthora palmivora* Butler (Butler) aisladas de plantaciones de aguacatero (*Persea americana* Mill.) en Cuba. *Rev. Protección Veg*. 28(1): 178-184.

Machado, M., Peña, M., Álvarez, A., Díaz, A., Zamora, V & Coto, O. (2013). Intraspecific variability of *Phytophthora palmivora* Butler (Butler) strains isolated from avocado (Persea americana Mill.) orchards on Cuba. *Protección Vegetal*. 28(3):178-184.

Machado, M., Peña, M., Coto, O., López, M. O., Zamora, V., Cabrera, R. I., & Aranguren, M. (2008). Caracterización morfológica y fisiológica de P*hytophthora* spp. aisladas de plantas de aguacatero con síntomas de marchitez. *Citrifrut.* (25)2: 49-56.

Martínez, D. (2015). Bases Conceptuales del Mecanismo de interacción planta- patógeno (patosistema cacao-monilia). Bucaramanga, Colombia: Universidad Nacional Abierta y a Distancia.. 46p.

Martínez, E & Pérez, L. (2016). Incidencia de enfermedades fúngicas en plantaciones de cacao de las provincias orientales de Cuba. *Rev. Protección Veg.* 30(2): 87-96.

Martínez, G; Sarria, G; Torres, G; Varon, G; Romero, H y Sanz, J. (2010). P*hytophthora palmivora* es el agente causal de la pudrición del cogollo de la palma de aceite. *PALMAS.* 31(1): 55-63.

Martínez, S. (1993.) Aspectos biológicos de patógenos que infectan frutos en el cultivo de cacao (*Theobroma Cacao*) en Tingo María. Tingo María, Perú: Universidad Nacional Agraria de la Selva. 74p.

Pérez, M. I., Peñaranda, L. F & Herazo, M. M. (2010). Impacto, manejo y control de enfermedades causadas por *Phytophthora palmivora* en diferentes cultivos. Santander*:* Universidad de Pamplona, ESP. 71 p.

Ramírez, O. (2019). *Resistencia genética de cultivares de cacao a la enfermedad de la mazorca negra.* Honduras: Fundación Hondureña de Investigación Agrícola. 45p.

Ribeira, T & Dora, E. (2011). Avaliação de métodos, concentrações de inóculo e idade das plântulas para inoculação de *Phytophthora palmivora* em mamoeiro. *Tropical Plant Pathology.* 36(6): 383-389.

Rodríguez, E.P. Y Vera R, A. (2015). Identificación y manejo de la pudrición parda de la mazorca (*Phytophthora* sp.) en cacao. Colombia: Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria – Corpoica. 84p.

Santacruz, C. (2013). Caracterización morfológica, patogénica y molecular de especies de *Colletotrichum* spp. causantes de la antracnosis del fruto de aji y pimenton capsicum spp. en el Valle del Cauca. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Palmira. 70p.

Santos, T., Bassay, E., Alves, E., Macedo, G & Martins, E. (2014). Factores epidemiológicos de *Phytophthora palmivora* afetando a severidade da podridão-dos-frutos do mamoeiro na pós-colheita. *Summa Phytopathol.* 40(3): 256-263.

Rodríguez, G. (1983). Herencia de la reacción del cacao (*Theobroma cacao* L.) a la pudrición de la mazorca causada por *Phytophthora palmivora* Butl. Costa Rica. 20p.

Torres-Londono, G. A. (2016). *Morphological Characterization, Virulence, and Fungicide Sensitivity Evaluation of Phytophthora palmivora.* Michigan State University. *Plant Pathology*. (7) 47p.

Tuset J C, Hinarejos y J. García. 1983. Present status of *Phytophthora* disease of citrus in Spain. Primer Congreso Internacional de Viveristas de Agrios. *International Journal of Agriculture and Natural Resorces*. (33). 34p. doi: http://dx.doi.org/10.7764/rcia.v33i3.347

Plank, J. V. D. (1963). *Plant diseases: epidemics and control. Plant diseases: epidemics and control.* Academic Press,1° Ed. Nueva York, 349 p

Vanegtern, B., Rogers, M & Nelson, S. (2015). Black Pod Rot of Cacao Caused by *Phytophthora palmivor*. College of Tropical and Agriculture and Human Resources. *Plant Disease*. (3). 40p.

Villavicencio, M., & Jiménez, M. (2010). Caracterización morfológica, fisiológica y patogénica de *Moniliophthora roreri* aislados de cinco provincias de la Costa Ecuatoriana. Ecuador: Escuela Superior Politécnica del Litoral. 65p.

Volpe, H., Figuerado, A., Martins, E & Tessmann, D. (2019). *Phytophthora palmivora*: agente causal da podridão da base do estipe da pupunheira no Brasil. *Summa Phytopathol.* 45(2): 164-171.