

¿Existe la tolerancia genética del cacao (*Theobroma cacao*) a *Rosellinia bunodes* y *Rosellinia pepo*?

Johnny García Córdoba¹
 André George²
 Tim Argyle^{1,3}
 Martijn ten Hoopen⁴
 Ulrike Krauss¹

RESUMEN. *Rosellinia* spp. son patógenos oportunistas del suelo con un amplio rango de hospedantes. Una vez establecidos en el suelo, son difíciles de controlar. Se han sugerido la resistencia genética y el control biológico para complementar las medidas agronómicas. Sin embargo, casi no existe evidencia de resistencia hacia *R. bunodes* y *R. pepo*. En este estudio evaluamos progenitores de una polinización abierta de clones de cacao (*Theobroma cacao*) susceptibles (UF667, PA121 y CC222) y tres clones para los cuales se reportó cierta tolerancia hacia *R. pepo* (IMC67, Pound 7 y UF613) con respecto a su reacción frente a este patógeno, empleando un bioensayo con plántulas. No logramos estimar la reacción hacia *R. bunodes*. Además, analizamos las poblaciones de micoparásitos en la rizosfera de los clones puros utilizando ‘tortas mixtas’ de hongos y *R. bunodes* como cebos.

A pesar de diferencias significativas en las longitudes de raíces entre clones, estas diferencias no fueron relacionadas con la reacción genética presunta hacia *R. pepo*. Más bien, estas diferencias solamente se observaron en plántulas del testigo, mientras que la inoculación redujo la longitud de las raíces independientemente del clon. Todas las muestras de suelo rizosférico albergaron múltiples especies de micoparásitos con potencial documentado para el control biológico. Las más comunes fueron *Clonostachys* spp., seguidas por *Trichoderma* spp. Seis especies de micoparásitos fueron más abundantes en clones susceptibles, dos no mostraron ninguna preferencia de germoplasma y solamente una especie relativamente rara colonizó preferentemente clones supuestamente tolerantes. No obstante, este comportamiento dependió fuertemente del hongo cebo usado. No se detectó preferencia hacia germoplasma con *R. bunodes* como cebo. Los números de micoparásitos de *R. bunodes* llegaron a sobrepasar las 1000 unidades formadores de colonias por gramo de suelo. A pesar de que los distintos clones soportaron cantidades diferentes de micoparásitos de *R. bunodes*, no se observó ningún patrón con relación al germoplasma para ninguno de los micoparásitos.

No encontramos evidencia que soporte el postulado de tolerancia a *Rosellinia*, ni en bioensayos con plántulas, ni evaluando la micoflora antagónica en la rizosfera. Sin embargo, el desarrollo de metodologías para medir resistencia a patógenos de suelo en forma cuantitativa y reproducible requiere más trabajo. Asimismo, se debería considerar la diversidad de poblaciones de los patógenos. Los antagonistas de *Rosellinia* son abundantes y valdría la pena estudiar con mayor detalle su eficacia como biocontroladores.

Palabras clave: *Clonostachys*, cacao, germoplasma, llaga, micoparásitos, patógenos de suelo, resistencia genética, *Rosellinia bunodes*, *Rosellinia pepo*, *Theobroma cacao*, *Trichoderma*.

ABSTRACT. Does genetic tolerance of cocoa (*Theobroma cacao*) to *Rosellinia bunodes* and *Rosellinia pepo* exist? *Rosellinia* spp. are opportunistic soil-borne pathogens with a wide host range. Once established, they are difficult to control. Both genetic resistance and biocontrol have been suggested as promising supplements to cultural methods. However, evidence of tolerance towards *R. bunodes* and *R. pepo* is virtually non-existent. We evaluated openly pollinated progeny from three susceptible cocoa (*Theobroma cacao*) clones (UF667, PA121 and CC222) and three clones with a reported tolerance towards *R. pepo* (IMC67, Pound 7 and UF613) for their reaction towards this pathogen using a seedling bioassay. We were unable to test the reaction towards *R. bunodes*. We also analysed mycoparasite populations in the rhizosphere of the pure clones using ‘mixed fungal pies’ and *R. bunodes* as baits.

¹ Convenio CABI/CATIE/USDA, Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE), 7170 Turrialba, Costa Rica. u.krauss@cabi.org

² Universidad de Costa Rica, Escuela de Agronomía, Sede del Atlántico, Turrialba, Costa Rica.

³ Department of Biology and Biochemistry, University of Bath, Bath BA2 7AY, Reino Unido.

⁴ Convenio CABI/CATIE/DGIS, CATIE, 7170 Turrialba, Costa Rica.

Although significant differences in root length were detected between clones, these were not related to the presumed genetic reaction of this germplasm towards *R. pepo*. In fact, these differences were only observed in control plants, whereas inoculated plants exhibited reduced root growth with no differences between clones. All rhizosphere soil samples harboured multiple mycoparasite species of known biocontrol potential. *Clonostachys* spp. were the most common, followed by *Trichoderma* spp. Six mycoparasite species were more abundant on susceptible clones, two showed no preference and only a relatively rare species preferentially colonised supposedly tolerant clones. This behaviour, however, strongly depended on the bait fungus used and, no preference of mycoparasites of *R. bunodes* was observed. On occasions, mycoparasites of *R. bunodes* exceeded 1000 colony-forming units per gram of soil. Although different clones supported different population levels, no relationship with supposed reaction was discernible for any taxon.

We did not find evidence of a differential reaction of cocoa germplasm to *Rosellinia* using a seedling bioassay and assessing the associated rhizosphere antagonist flora. However, more work is needed on quantitative and reproducible screening procedures for resistance to soil-borne pathogens. The diversity of pathogen isolates should also be considered. Antagonists of *Rosellinia* are plentiful, and their efficacy as biocontrol agents merit further study.

Key words: *Clonostachys*, cocoa, genetic resistance, germplasm, mycoparasites, root rot, *Rosellinia bunodes*, *Rosellinia pepo*, soil-borne pathogens, *Theobroma cacao*, *Trichoderma*.

Introducción

La podredumbre radicular —también llamada “llaga negra”, “llaga radicular negra”, “llaga estrellada”, “podredumbre negra” y “roselinia” (Merchán 1990)— es una enfermedad que ataca muchos cultivos a escala mundial, causando pérdidas económicas importantes en algunos de ellos. Tal es el caso de Colombia, donde los problemas más graves se presentan en cacao (*Theobroma cacao*), café (*Coffea arabica*; pérdidas de hasta US \$489 ha⁻¹ año⁻¹; Bautista y Magdiel 2000) y frutales (Merchán 1993).

El agente causal de la enfermedad pertenece al género *Rosellinia*, asociado a *Rosellinia bunodes* (Berk. & Br.) Sacc. y *Rosellinia pepo* Pat. como los causantes de pudriciones radiculares en cacao (Nowell 1916, Aranzazu et al. 1999). En condiciones de cultivo, *R. pepo* ataca principalmente cacao y *R. bunodes* café; sin embargo, ambas especies pueden afectar simultáneamente la misma planta (Merchán 1990, Aranzazu et al. 1999). La enfermedad suele presentarse generalmente afectando plantas localizadas en pequeños parches (Merchán 1990) y se extiende en forma progresiva con el pasar del tiempo (Merchán 1993).

La propagación de la enfermedad suele darse por contacto entre raíces sanas con raíces enfermas portadoras del patógeno (Fernández y López 1964, Merchán 1993), hasta el punto de que estudios realizados por Salazar y Aranzazu (1987) demostraron que la principal fuente natural de inóculo son las raíces enfermas. Investigaciones realizadas en el pasado

atribuyen a *Rosellinia* spp. un carácter de parásito facultativo más que de parásito obligado. Aranzazu (1996) concluyó que *R. pepo* se comporta como un organismo con habilidades más saprofíticas que parasíticas, y que el parasitismo de *R. pepo* es incidental a su existencia saprofítica y que, por lo tanto, las especies de *Rosellinia* son consideradas como parásitos débiles (Aranzazu 1997). Es importante mencionar que Waterston (1941) y Aranzazu (1996), aunque concuerdan en el carácter saprofítico de *Rosellinia*, también advierten que una vez establecida la enfermedad es difícil de controlar.

En investigaciones anteriores varios autores coinciden en que la materia orgánica, la humedad del suelo y el pH son factores determinantes en el desarrollo del hongo. Cárdenas et al. (1998) mencionaron que contenidos elevados de materia orgánica y una alta humedad del suelo favorecen el desarrollo del patógeno. A su vez, Mendoza et al. (2003) mencionaron el alto contenido de materia orgánica y un pH relativamente bajo como los factores óptimos para el desarrollo del hongo. Contrario a lo descrito anteriormente, Cadavid (1995) y Waterston (1941) no demostraron relación entre la acidez y el desarrollo de la enfermedad, por lo que el pH no fue considerado como un factor relevante.

Desde hace ya varios años se han realizado experimentos con el propósito de determinar un método eficiente de control de la enfermedad, probando diferentes condiciones de manejo químico, agronómico, genético y biológico. El control químico ha demostra-

do no ser una herramienta viable para el control de la enfermedad en cacao, e investigaciones en el pasado así lo demuestran; Merchán (1993) y Restrepo (1997) mencionaron que el uso de productos químicos contra *Rosellinia* puede favorecer el desarrollo del patógeno mediante la reducción de la microflora antagonista del suelo. En general, el control químico dio resultados insatisfactorios, erráticos y antieconómicos (Cubillo 1988, Merchán 1989).

El control agronómico es otro método utilizado. Entre sus recomendaciones se describen la erradicación de árboles muertos, la poda de raíces laterales, el repique del suelo en una franja no menor a un metro de ancho y la quema de residuos infectados (Aranzazu 1997). La incorporación de enmiendas al suelo, como carbonato de calcio para elevar el pH (Fig. 1), también podría ayudar a controlar la enfer-

medad (Nowell 1916, Aranzazu et al. 1999, Mendoza et al. 2003). Es importante observar que, dadas las características propias de la enfermedad, donde los síntomas muchas veces no son visibles inmediatamente después de la infección, este procedimiento puede resultar ineficiente como método de control.

Un método en el cual están cifradas muchas esperanzas es el control genético, que consiste en la utilización de materiales (clones, híbridos) que tengan tolerancia o resistencia a la enfermedad. Las pocas investigaciones en control genético de *Rosellinia* fueron enfocadas hacia *Rosellinia necatrix* Prill., principalmente en los cultivos de manzana (*Pyrus malus*) (Sztejnberg et al. 1983, Johnson 2000, Lee et al. 2000), aguacate (*Persea americana*) (López et al. 1999), caqui (*Diospyros* spp.) (Sztejnberg y Jabareen 1985, Jabareen y Sztejnberg 1986), y morera (*Morus* spp.)

(A) Mal de machete (*Ceratocystis fimbriata*)

(B) Llagas estrelladas (*Rosellinia pepo*)



Figura 1. El mal de machete, causado por *Ceratocystis fimbriata*, muchas veces antecede las llagas causadas por *Rosellinia* spp. Con el mal de machete (A), las hojas secas quedan prendidas en el árbol y el sistema vascular demuestra una decoloración característica (flecha roja). Si *Rosellinia* spp. son la causa principal de la muerte de la planta, las hojas con amarillamiento se caen poco a poco (B). Debajo de la corteza, se nota la típica llaga estrellada de *R. pepo* (bolígrafo). Para su control se aplica carbonato de calcio.

(Philip et al. 1995). Compuestos fenólicos extraídos de raíces de pecana (*Carva illinoensis*), caqui, carambola (*Averroa carambola*) y un cultivar de manzana, todos resistentes a *R. necatrix*, mostraron inhibición del crecimiento del hongo, pero compuestos fenólicos extraídos de melocotón, almendra y otro cultivar diferente de manzana, todos susceptibles a *R. necatrix*, no mostraron inhibición en el crecimiento del hongo (Sztejnberg et al. 1983). Por lo tanto, los autores piensan que la resistencia natural puede deberse a las altas concentraciones de compuestos fenólicos y que ésta puede inducirse por medio del tratamiento con estos compuestos. El hongo contiene polifenoloxidasas que pueden oxidar fenoles hasta quinonas disminuyendo la inhibición en el crecimiento.

Wellman (1954) mencionó que en El Salvador *C. arabica* era muy susceptible a *R. bunodes*, pero *Coffea robusta*, híbridos entre *C. robusta* y *C. arabica* y *C. arabica* injertado sobre *C. robusta* mostraron cierta resistencia. En cacao, tras analizar investigaciones de otros autores, Simmonds (1994) concluyó que hay evidencia sobre la existencia de resistencia genética horizontal de clones de cacao hacia cualquier enfermedad para la cual se realizó una búsqueda sistemática, como escoba de bruja (*Crinipellis perniciosus* (Stahel) Singer), mal de machete (*Ceratocystis fimbriata* Ellis y Halsted) y mazorca negra (*Phytophthora* spp.). Sustancias polifenólicas (Capriles de Reys y Reys 1968) y ácido clorogénico (Capriles de Reys et al. 1964) se consideran responsables de la resistencia del cacao al mal de machete, por ejemplo en el clon IMC67. La resistencia a *Verticillium dahliae* Kleb. en el clon Pound 7 se atribuye a azufre elemental en forma octocíclica (S₈), el cual actúa directamente como fungicida e indirectamente como fitoalexina (Cooper et al. 1996).

Prácticamente no existe información sobre materiales genéticos en cacao que presenten tolerancia o resistencia a *Rosellinia*, con excepción de lo que menciona Merchán (1990), quién recomendó la siembra de nuevas plantaciones de cacao con los materiales IMC67, Pound 7 y UF613, los cuales describe como más tolerantes hacia *R. pepo* y con la característica adicional de ser altamente resistentes a la enfermedad del mal del machete, la cual muchas veces antecede a *Rosellinia*. El hecho de que se pueden encontrar ambos patógenos en un árbol muerto causa cierta confusión diagnóstica, aunque sí se pueden distinguir en el campo (Fig. 1).

Otro método prometedor para el combate de *Rosellinia* spp. es el control biológico. Se presentan enfoques con una clara tendencia hacia el uso de antagonistas, principalmente de los géneros *Trichoderma* y *Pseudomonas* (Burbano 1992, Castro 1995, Aranzazu 1996, Cárdenas 1997, Mendoza et al. 2003). Estudios anteriores revelaron que *R. pepo* es susceptible a la acción de organismos antagonistas, ya sea por micoparasitismo o por competencia sobre la base alimenticia (Aranzazu 1996). Recientemente, Mendoza et al. (2003) mostraron que la eficiencia de los micoparásitos *Clonostachys* spp. y *Trichoderma* spp. en el control biológico de *Rosellinia* spp. depende del pH del suelo y su contenido de materia orgánica, pero no del contenido de fósforo. Por otro lado, no se sabe qué influencia tendrá el germoplasma de cacao sobre el antagonismo.

Las poblaciones de micoparásitos epifíticos encontrados en la superficie de mazorcas de cacao fueron independientes de la reacción genética del cacao a la moniliasis, causada por *Moniliophthora roreri* (Cif.) Evans y la mazorca negra (ten Hoopen et al. 2003). Blaha y Paris (1987) sugirieron que bacterias epifíticas están involucradas en la resistencia del cacao a *Phytophthora megakarya* Bra. & Grif. Aún no se investigó este efecto en la rizosfera del cacao, pero en otros cultivos, en el hábitat suelo, el fenómeno es controversial. En algodón (*Gossypium* spp.), la resistencia a *Fusarium oxysporum* Schlecht fue negativamente correlacionada con la producción de antibióticos por el antagonista *Aspergillus terreus* Thom. (Chadova et al. 1980). Atkinson et al. (1974) sospecharon que cultivares de trigo (*Triticum aestivum*) resistentes a *Cochliobolus sativus* (Ito & Kurib.) Drechs. albergaban poblaciones mayores de antagonistas en sus rizosferas que los cultivares susceptibles. Sin embargo, después de un estudio genético profundo, los autores rechazaron su hipótesis inicial.

Dada la necesidad creciente de lograr el control, tanto en Costa Rica como en el resto de los países productores de cacao, este trabajo se llevó a cabo con el objetivo de comprobar la existencia de tolerancia en los clones IMC67, Pound 7 y UF613 a *Rosellinia*, comparándolos con tres clones cuya susceptibilidad al patógeno está comprobada y así incorporar dichos materiales en futuras investigaciones y planes de manejo de la enfermedad. Se comparó además, en términos cualitativos y cuantitativos, las poblaciones de micoparásitos en las rizosferas de cacao supuestamente tolerante o susceptible a *R. pepo*.

Materiales y métodos

Este estudio se realizó en las instalaciones del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE) entre los meses de mayo y diciembre del 2003, siguiendo la metodología de Mendoza et al. (2003).

Evaluación de la tolerancia del germoplasma

Cuatro semanas antes de instalar el ensayo se preparó el inóculo de *R. bunodes* (RB1) utilizando semillas de trigo como sustrato. Se llenaron botellas de vidrio de 1 l de capacidad con 100 g de semillas de trigo y 100 ml de agua destilada. Las botellas fueron autoclavadas una vez al día durante dos días consecutivos. Posteriormente, el contenido de las botellas fue inoculado con las diferentes cepas de *Rosellinia* e incubado a 26 °C en oscuridad durante tres semanas.

Se eligieron seis clones para la realización de este experimento, tres supuestamente tolerantes y tres susceptibles, de los cuales —según estudios preliminares de Merchán (1990)— IMC67, Pound 7 y UF613 fueron tolerantes a *Rosellinia*. En el caso de los clones susceptibles, se quiso utilizar los descritos como tales por ese autor (EET8, ICS1, ICS40, ICS95, Pueblo Quemado, R30, SC6, TSH565 y TSH792), pero ya habían muerto en el banco de germoplasma del CATIE debido a una infección producida por *Rosellinia* sp. o no se encontraron disponibles en la colección. Por lo tanto, se procedió a localizar aquellos clones del banco que tuvieran antecedentes de muerte por *Rosellinia*, los cuales fueron UF667, PA121 y CC222.

Se recogieron mazorcas maduras de cacao, producidas por polinización abierta, pertenecientes a los clones descritos anteriormente. Se sembraron en bandejas plásticas 15 semillas por cada uno de los clones, cuatro semanas antes del inicio del experimento. El suelo utilizado fue obtenido de un área no infectada del banco de germoplasma de cacao en Cabiria, CATIE (para un análisis de este suelo, ver Mendoza et al. 2003). Utilizando el mismo suelo, se llenaron las macetas (2 kg por maceta).

Aproximadamente cuatro semanas después de la inoculación de las botellas, cuando las semillas de trigo fueron completamente cubiertas por el patógeno, se inoculó el suelo de cada maceta con la cepa RB1, utilizando una proporción de 100 g de semillas de trigo inoculado por cada kg de suelo. Los testigos no se inocularon. Se transplantaron las plántulas a sus respectivas macetas inmediatamente después de la inoculación del suelo y éstas fueron ubicadas en el invernadero, tomando este momento como el inicio

del experimento. Se utilizaron plántulas de cuatro semanas de edad que fueron similares en cuanto a altura y número de hojas.

Cuando no se observó ningún síntoma seis semanas después de la inoculación con RB1, se procedió a preparar un nuevo inóculo, como el anteriormente descrito, pero con *R. pepo* (RB3, RB4 y RB5). A los 70 días después del inicio del ensayo se realizó una segunda inoculación en cada una de las macetas utilizando una mezcla de las cepas RB3, RB4 y RB5 en proporciones iguales. Para ésta, se incorporó una porción de 100 g de semilla colonizada por cada kg de suelo alrededor del sistema radicular. Se tapó el inóculo con aproximadamente 100 g de suelo. También se agregaron 100 g de suelo a los testigos.

Las plantas de cacao permanecieron en el invernadero, donde fueron regadas con agua dos veces por semana. Allí se evaluaron los siguientes aspectos para cada una de las plantas 180 días después del inicio del ensayo (es decir, 110 días después de la segunda inoculación): número de hojas, área foliar en centímetros cuadrados; peso seco de hojas en gramos (secado de hojas a 60 °C por 24 horas); y longitud del tallo en centímetros desde su base hasta el extremo superior.

Las raíces de cada planta se separaron del tallo y se eliminó cuidadosamente gran parte del suelo. Luego fueron colocadas en recipientes plásticos bien rotulados, con etanol al 70% para su conservación. En el laboratorio se lavaron las raíces con agua destilada, eliminando el resto del suelo y otras impurezas para la posterior medida de la longitud total de las raíces en centímetros, utilizando el programa de cómputo WinRHIZO (WinRHIZO v. 3.9a, Regent Instruments, Quebec, Canada) y un equipo Hewlett Packard ScanJet 6100C/T. La medida del peso seco de las raíces se perdió debido a una falla técnica.

Micoflora de las raíces

Para el análisis de la micoflora de las rizosferas de los clones, se usaron los clones establecidos en el banco de germoplasma del CATIE, en Turrialba, Costa Rica. Se recolectaron muestras de cinco árboles como repeticiones, excepto para CC222, para el cual solamente fueron disponibles tres árboles. Las muestras de suelo (aproximadamente 50 g por árbol) se secaron al aire a temperatura ambiente durante tres días.

El objetivo del primer aislamiento fue obtener una vista amplia del espectro de micoparásitos presentes en la rizosfera del cacao. Para este propósito, se utilizó el método de tortas mixtas de hongos

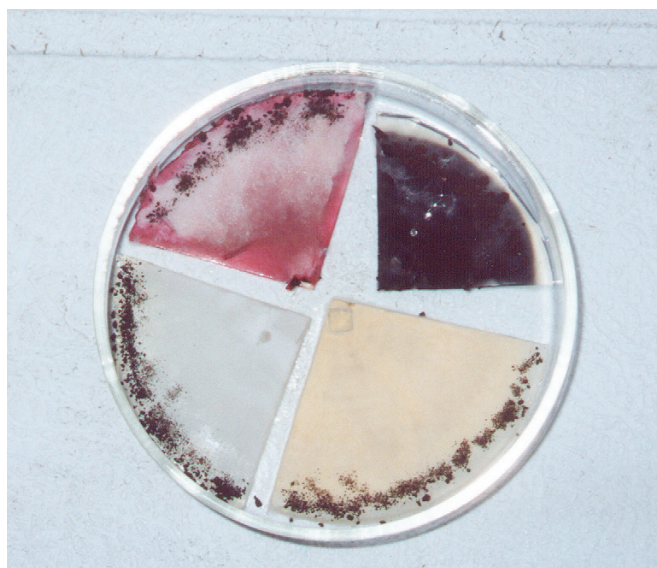


Figura 2. Torta mixta de hongos cebos inoculada con suelo rizosférico para la detección de micoparásitos.

cebos (Mulligan y Deacon 1992), con las siguientes modificaciones: (i) se usó agar papa dextrosa (apd) a concentración media (20 g apd y 10 g agar granulado por litro); (ii) los hongos hospedantes (cebos) fueron *Phytophthora palmivora* (Butl.) Butl. (Straminipile), *Moniliophthora roreri* (Basidiomicete), *Rosellinia* sp. (Ascomicete) y *Fusarium* sp. (Ascomicete), todos aislados originalmente de cacao; (iii) se sembraron 0,05 g de suelo secado al aire en cada sector (Fig. 2). Las placas (tres repeticiones) se incubaron a temperatura ambiente.

El objetivo del segundo aislamiento fue hacer una evaluación cuantitativa de micoparásitos de *R. bunodes*. Se juntaron las muestras de suelo de todos los árboles de un clon; las seis muestras de suelo resultantes fueron diluidas en forma serial, mezclándolas con el mismo volumen de arena estéril, de 1:1 hasta 1:512 (Mulligan et al. 1995). Se prepararon cinco series de diluciones independientes como repeticiones; se sembraron 0,25 g de cada mezcla en una placa cebo completamente precolonizada por *R. bunodes*, y se incubaron a 26 °C en oscuridad.

Diseño experimental, toma de datos y análisis estadístico

La evaluación de la tolerancia y el espectro de micoparásitos tuvieron un diseño jerárquico con arreglo factorial. En la evaluación de tolerancia, el factor A correspondió a la inoculación (con inóculo y sin inóculo), el factor B (=grupo) a la supuesta reacción genética (tolerante o susceptible) y el factor C (=subgrupo)

al clon (IMC67, Pound 7, UF613, UF667, PA121 y CC222), el cual fue anidado dentro de la interacción de inoculación por reacción genética. Por lo general se hicieron cinco repeticiones, pero debido a la muerte de algunas plántulas por otras causas, este número pudo disminuirse hasta un mínimo de tres. Los datos de la variable número de hojas se normalizaron transformándolos a logaritmo en base 10. Todos los datos obtenidos se examinaron por medio de un análisis de varianza en el programa estadístico SAS, y las diferencias significativas se separaron por medio de la prueba de Tukey al 5% de significancia.

Para la evaluación cualitativa de la micoflora, el factor A correspondió a la supuesta reacción genética, el factor B fue el hongo hospedante (cebo) y el factor C correspondió a clones de cacao y fue anidado en factores A y B. En ambos experimentos, los factores A y B fueron fijos, mientras que el factor C se seleccionó al azar (modelo mixto).

Cada placa de la torta de hongos cebo fue evaluada dos veces para detectar micoparásitos de crecimiento rápido o lento. Por las susceptibilidades diferentes de los hospedantes, se seleccionaron los siguientes intervalos: *P. palmivora*, 4 días después de la inoculación (ddi) y 7 ddi; *M. roreri*, 21 ddi y 29 ddi; *Rosellinia* sp. y *Fusarium* sp., 18 ddi y 21 ddi. Cada micoparásito se analizó en forma individual. El porcentaje de cebos positivos se transformó mediante la función arcoseno antes del análisis de varianza.

Las evaluaciones cuantitativas de micoparásitos de *Rosellinia* sp. se realizaron a los 24 y 27-28 ddi. Se determinó el número de formadores de colonia (nfc) y su intervalo de confianza al 95% con la técnica de números más probables (NMP) (Fisher y Yates 1963). Se compararon las dos clases de reacción genética usando el nivel promedio de fertilidad, como lo recomendaron dichos autores.

Resultados

Evaluación de la tolerancia del germoplasma

De las variables evaluadas en este ensayo, la longitud de raíces fue la única en donde se encontraron diferencias significativas en el factor inoculación ($p = 0,002$), en donde las plantas con inóculo tuvieron una longitud de raíces significativamente menor a las plantas sin inóculo (Cuadro 1). No se detectaron diferencias entre los grupos supuestamente tolerantes y susceptibles ($p = 0,378$), ni una interacción de inoculación con la reacción genética ($p = 0,885$). Por otro lado, el factor clon dentro de la interacción fue significativo

Cuadro 1. Longitud radicular (cm) de seis clones con supuestamente diferentes reacciones genéticas a *Rosellinia*

Clon	Tratamiento	
	Con inoculación de <i>Rosellinia</i>	Sin inoculación de <i>Rosellinia</i>
Supuesta reacción genética susceptible		
CC222	734,7 ^a	908,0 ^c
PA121	722,4 ^a	1064,7 ^{bc}
UF667	997,8 ^a	2874,1 ^a
Promedio	818,3	1615,6
Supuesta reacción genética tolerante		
IMC67	1105,4 ^a	1637,0 ^{bc}
P7	1128,8 ^a	2050,3 ^{ab}
UF613	772,2 ^a	1924,9 ^{abc}
Promedio	1002,1	1870,8
Promedio general	946,9^B	1729,1^A

A, B Tratamientos con diferentes letras en mayúscula difieren significativamente ($p = 0,002$).

a, b, c Clones dentro de una columna (comparación de seis valores) seguidos por la misma letra en minúsculas no difieren a $p < 0,05$ según prueba de Tukey.

($p = 0,041$). No se encontraron diferencias significativas entre clones con inóculo, independientemente de que fueran clasificados como tolerantes o susceptibles a la enfermedad, mientras que los clones sin inóculo sí mostraron diferencias significativas entre ellos: el clon UF667 presentó una longitud de raíces significativamente mayor que los clones CC222 ($p < 0,001$), PA121 ($p = 0,003$) y IMC67 ($p = 0,026$). El clon Pound 7 presentó una longitud de raíces significativamente mayor que el clon CC222 ($p = 0,025$).

Cuadro 2. Micoparásitos asociados con las raíces de clones de cacao supuestamente tolerantes y susceptibles a *Rosellinia bunodes*, detectados por tortas mixtas de hongos cebos (porcentajes de cebos positivos)

Micoparásitos	Hospedante cebo							
	<i>Phytophthora palmivora</i>		<i>Moniliophthora roreri</i>		<i>Rosellinia bunodes</i>		<i>Fusarium sp.</i>	
	Tolerante	Susceptible	Tolerante	Susceptible	Tolerante	Susceptible	Tolerante	Susceptible
<i>Clonostachys</i> spp.	71,1 ab	75,6 abc	68,9 ab	85,2 abc	91,1 bc	97,8 c	62,2 a	77,0 abc
<i>Trichoderma harzianum</i>	88,9 c	50,4 ab	40,0 a	41,5 a	91,1 c	79,3 bc	22,2 a	46,7 ab
<i>Trichoderma piluliferum</i>	86,7 b	82,2 b	26,7 a	28,1 a	24,2 a	28,1 a	2,2 a	8,9 a
<i>Trichoderma hamatum</i>	31,1 bc	48,9 c	2,2 a	5,9 ab	11,1 ab	2,2 a	0,0 a	0,0 a
<i>Penicillium</i> spp.	15,6 ab	20,0 b	2,2 ab	0,0 a	8,9 ab	11,9 ab	6,7 ab	18,5 b
No identificado Csw	42,2 abc	54,8 abcd	37,8 ab	78,5 cd	88,9 d	73,3 abcd	22,2 a	19,3 a
No identificado Chn	28,9 bc	55,6 d	0,0 a	5,9 ab	22,2 abc	43,0 cd	2,2 a	0,0 a
No identificado Pel	22,2 ab	33,3 b	22,2 ab	32,6 b	26,7 ab	34,8 b	8,9 a	12,6 ab
No identificado Sms	17,8 b	4,4 ab	0,0 a	0,0 a	11,1 ab	0,0 a	0,0 a	2,2 a
Otros	0,0 a	3,7 ab	2,2 ab	0,0 a	6,7 ab	13,3 b	4,4 ab	0,0 a

a, b, c, d: valores seguidos por la misma letra no difieren a $p = 0,05$ (ANDEVA de porcentajes transformados por el arco seno, seguido por la prueba de Fisher; comparación válida dentro de un mismo micoparásito solamente).

Espectro de micoparásitos

Se detectaron varios micoparásitos en todas las muestras de todos los clones. Nueve aislamientos diferentes fueron comunes (Cuadro 2): *Clonostachys* spp. (78,6% de todos los cebos), *Trichoderma harzianum* (57,5%), *Trichoderma piluliferum* (35,2%), *Trichoderma hamatum* (12,7%), *Penicillium* spp. (10,5%) y cuatro hongos no identificados: “Csw” (52,1%), “Chn” (19,7%), “Pel” (24,2%) y “Sms” (4,4%). Las demás cepas conjuntas contribuyeron solamente un 3,8% de cebos colonizados.

Se detectaron diferencias significativas entre las reacciones genéticas en siete de los nueve micoparásitos (factor A): *Clonostachys* spp. ($p < 0,001$), *T. hamatum* ($p < 0,05$), *Penicillium* ($p < 0,05$), Csw ($p < 0,01$), Chn ($p < 0,001$), Pel ($p < 0,001$) y Sms ($p < 0,001$). Con excepción de Sms, se observó una mayor cantidad de cebos positivos en clones susceptibles que en clones supuestamente tolerantes. Además, los cuatro hongos cebos (factor B) difirieron significativamente en todos los casos ($p < 0,001$). *P. palmivora* fue el hospedante más susceptible, seguido por *R. bunodes*, *M. roreri* y *Fusarium* sp. Para todos los micoparásitos, incluso el grupo “otros”, hubo una interacción significativa entre reacción genética y especie cebo ($p < 0,001$) (Cuadro 2). Vale destacar que los micoparásitos detectados encima de *R. bunodes* fueron igualmente comunes para las dos clases de reacción, sin excepción. En ningún caso se detectó una diferencia entre clones dentro de una clase de reacción genética (factor C; $p > 0,5$).

Clonostachys spp. se detectaron más frecuentemente (97,8%) en suelo de clones susceptibles sembrados con *R. bunodes* (Cuadro 2). Este valor fue semejante en los demás hospedantes para clones susceptibles. En suelo obtenido de clones supuestamente tolerantes, se detectaron significativamente menos *Clonostachys* spp. en todos los demás hospedantes, pero en *R. bunodes* el éxito de detección se mantuvo alto (91,1%).

T. harzianum se manifestó más frecuentemente en suelo rizosférico de clones supuestamente tolerantes, sembrado encima de *P. palmivora* y *R. bunodes*. De nuevo, el único cebo con un valor semejante para suelo proveniente de clones susceptibles fue *R. bunodes*. *T. piluliferum* y *T. hamatum* se detectaron mejor con *P. palmivora* como cebo, con pocas diferencias entre clases de reacción genética.

Penicillium sp. en suelo de clones susceptibles se detectó mejor con *P. palmivora* y *Fusarium* sp. que con *M. roreri*. Los demás valores no difirieron significativamente. De los micoparásitos no identificados, Csw se encontró repetidamente en *R. bunodes*, independiente de la procedencia del suelo. Por otro lado, suelo de clones susceptibles albergó también grandes números de Csw, invasor de *P. palmivora* y *M. roreri*.

Chn y Pel se detectaron preferentemente en clones susceptibles cuyo suelo fue sembrado en *P. palmivora* y *R. bunodes* y, en el caso de Pel, también en *M. roreri*. Sms se descubrió mejor en clones supuestamente tolerantes usando el cebo *P. palmivora*, seguido por *R. bunodes* y clones susceptibles con *P. palmivora*. Todos los demás micoparásitos (“otros” en Cuadro 2) se manifestaron mejor en clones susceptibles con *R. bunodes* como hospedante de detección.

A pesar de las diferencias complejas entre genoplasmata susceptible y supuestamente tolerante a *Rosellinia* spp., en relación con el espectro total de micoparásitos detectados en cebos pertenecientes a cuatro grupos de hongos distintos, en ningún caso se observó frecuencias diferentes encima de *Rosellinia*, el patógeno de interés (Cuadro 2, $p > 0,05$). Esta observación motivó el estudio cuantitativo sobre micoparásitos de *R. bunodes* que se presenta a continuación.

Poblaciones de micoparásitos de *Rosellinia bunodes*
Clonostachys fue el género más común que invadió a *R. bunodes*, con algunas NMP encima de 1000 ufc g⁻¹ de suelo, con pocas diferencias entre clones de cacao (Cuadro 3).

Cuadro 3. Números más probables de unidades formadoras de colonias por gramo de suelo rizosférico (intervalo de confianza al 95% en paréntesis) de micoparásitos de *Rosellinia bunodes* asociados con clones de cacao con una reacción genética supuestamente diferente a *R. bunodes*

Clon	Supuesta reacción genética					
	Tolerante			Susceptible		
	UF 613	Pound 7	IMC 67	UF 667	PA 121	CC222
<i>Clonostachys</i> spp.	1,186,4 (598,9-2,576,9)	862,6 (445,6-1,777,0)	471,0 (249,0-918,1)	635,9 (332,3-1,262,6)	1,980,9 (952,8-5,149,0)	862,6 (445,6-1,777,0)
<i>Trichoderma harzianum</i>	407,2 (216,2-782,8)	48,4 (26,2-89,4)	129,2 (69,9-241,0)	112,2 (60,8-208,8)	198,0 (106,4-372,1)	36,6 (19,6-67,6)
<i>Trichoderma piluliferum</i>	84,8 (45,9-157,2)	74 (40-137)	20,8 (10,3-38,7)	55,7 (30,2-103,0)	84,8 (45,9-157,2)	73,7 (39,9-136,5)
<i>Trichoderma hamatum</i>	7,6 (5,0-16,3)	6,0 (4,3-13,9)	3,3 (3,3-9,9)	4,6 (2,5-6,6)	6,0 (4,3-13,9)	4,6 (2,5-6,6)
<i>Penicillium</i> spp.	4,6 (2,5-6,6)	9,2 (2,8-18,9)	6,0 (4,3-14,0)	4,0 (2,2-5,1)	4,6 (2,5-6,6)	4,0 (2,2-5,1)
No identificado Csw	546,0 (288,0-1,076,6)	546,0 (288,0-1,076,6)	546,0 (288,0-1,076,6)	739,0 (384,4-1,494,5)	4,067,2 (3,322,3-7,467,3)	352,0 (187,4-673,7)
No identificado Chn	15,4 (6,9-29,2)	2,1 (<8,2)	7,6 (5,0-16,3)	7,6 (5,0-16,3)	7,6 (5,0-16,3)	17,9 (8,6-33,6)
No identificado Pel	9,2 (2,8-18,9)	263,1 (141,0-489,9)	20,8 (10,3-38,7)	20,8 (10,3-38,7)	407,2 (216,2-782,8)	48,4 (26,2-89,4)
No identificado Sms	4,0 (2,2-5,1)	4,0 (2,2-5,1)	4,0 (2,2-5,1)	4,0 (2,2-5,1)	4,0 (2,2-5,1)	4,0 (2,2-5,1)

Las tres especies de *Trichoderma* que atacaron a *R. bunodes* fueron más abundantes en el clon UF613. Para *T. harzianum*, las poblaciones de 407 ufc g⁻¹ difirieron significativamente de otro clon supuestamente tolerante: Pound 7, con 48 ufc g⁻¹, y los clones susceptibles UF667 (112 ufc g⁻¹) y CC222 (37 ufc g⁻¹). Para *T. piluliferum*, poblaciones de 84,8 ufc g⁻¹ de un clon supuestamente tolerante (UF613) y un clon supuestamente susceptible (PA121), y 73,7 ufc g⁻¹ de otro clon supuestamente susceptible (CC222), difirieron solamente con un clon supuestamente tolerante: IMC67 (20,8 ufc g⁻¹). Para *T. hamatum*, la tendencia no alcanzó un nivel significativo (Cuadro 3).

De los micoparásitos no identificados, Csw fue más numeroso en el clon susceptible PA121 (4067 ufc g⁻¹) que en cualquier otra variedad. Este clon (407 ufc g⁻¹) y Pound 7 (263 ufc g⁻¹) tuvieron las poblaciones más altas de Pel, el cual fue más escaso en UF613 (9,2 ufc g⁻¹). Para los demás micoparásitos, los NMP no difirieron entre clones (Cuadro 3).

A pesar de diferencias entre clones (Cuadro 3), no existió ninguna relación con la supuesta reacción genética: *Clonostachys* spp., $p = 0,574$; *T. harzianum*, $p = 0,658$; *T. piluliferum*, $p = 0,519$; *T. hamatum*, $p = 0,494$; *Penicillium* spp., $p = 0,090$; Csw, $p = 0,433$; Chn, $p = 0,590$ y Pel, $p = 0,645$.

Discusión

En clones susceptibles, el inóculo de *R. bunodes* no produjo síntomas en seis semanas, mientras Mendoza et al. (2003) observaron síntomas pronunciados y muerte siguiendo la misma metodología y usando el mismo aislamiento RB1. Eso indica que la cepa había perdido su patogenicidad, un fenómeno común con patógenos cultivados en el laboratorio por períodos prolongados (Aranzazu 1996). Por lo tanto, se logró evaluar si existe tolerancia hacia este patógeno común en Costa Rica. Vale destacar que casi no existen metodologías estandarizadas para la inoculación de suelo y/o plantas con patógenos de suelo para cuantificar su resistencia (Resende et al. 1995, Purdy 1999). Este problema se ve agravado para *Rosellinia* spp. porque, en la ausencia de esporas, no se puede cuantificar con exactitud el inóculo. El método desarrollado por Mendoza et al. (2003) es un primer paso hacia esta meta.

Utilizando una mezcla de tres cepas de *R. pepo* hubo una respuesta, expresada como una disminución significativa en la longitud de raíces de los clones inoculados en comparación con los clones que no fueron inoculados (Cuadro 1). A partir de este resultado,

los clones considerados por Merchán (1990) como tolerantes a *R. pepo* tuvieron, al igual que los clones susceptibles, un desarrollo radical menor ante la presencia del patógeno, sin mostrar alguna característica que sugiera algún grado de tolerancia hacia la enfermedad por parte de uno de estos materiales.

Por otra parte, los resultados obtenidos al analizar el factor clon dentro de la interacción inoculación por la reacción genética evidencian que todos los clones con inóculo se comportan de una manera similar, independientemente de si se trata de los clones clasificados en el ensayo como tolerantes o susceptibles al patógeno, no observándose nuevamente alguna característica que haga suponer que algunos de los clones descritos por Merchán (1990) presentan algún grado de tolerancia. En el caso de los clones que no fueron inoculados, el material UF667, denominado como susceptible, y Pound 7, denominado como tolerante, obtuvieron la mayor longitud de raíces. Aparentemente, cada clon tiene características anatómicas diferentes, las cuales se expresan mejor en ausencia del patógeno.

Los resultados obtenidos en esta investigación no respaldaron lo descrito por Merchán (1990) en cuanto a la tolerancia de los clones IMC67, Pound 7 y UF613, ya que no hubo diferencias entre el germoplasma anterior y los materiales que se utilizaron en este estudio como susceptibles. Cabe mencionar que, en este ensayo, se trabajó con progenitores F₁, resultados de polinizaciones abiertas, los cuales deberían mostrar cierta segregación para las características maternas, algo que puede reducir los efectos promedio de la reacción genética. También es posible que la supuesta tolerancia sea eficaz solamente contra la raza de *R. pepo* usada por Merchán (1990) en Colombia, mientras que en el presente trabajo se inoculó con una mezcla de tres aislamientos costarricenses para detectar solamente tolerancia general. Estudios futuros deberán considerar el uso de materiales clonales, así como la inoculación con aislamientos agresivos de *R. bunodes*.

Las placas precolonizadas con hongos cebos son una metodología sencilla para la detección y el aislamiento de micoparásitos de suelo (Foley y Deacon 1985). Como los hongos cebos difieren en su susceptibilidad al micoparasitismo, el espectro de micoparásitos encontrados es una función de los hospedantes seleccionados. Por lo tanto, Mulligan y Deacon (1992) recomendaron el uso de tortas mixtas de hongos cebos para ampliar el rango de micoparásitos detectados. En el presente trabajo se utilizaron cuatro especies de hospedantes disparejos y así se encontraron

micoparásitos en todas las muestras de suelo rizosférico, representados por un mínimo de nueve taxones distintos. De estos nueve taxones, seis se detectaron con más frecuencia en clones susceptibles que en clones supuestamente tolerantes (Cuadro 2), refutando la hipótesis de que una tolerancia hacia *R. bunodes*, si existiera, sería mediada por estos antagonistas. Dos taxones de micoparásitos no mostraron ninguna preferencia por el germoplasma de cacao con una reacción genética definida. Una sola especie, Sms, prevaleció en clones supuestamente tolerantes pero, en términos cuantitativos, Sms contribuyó las menores poblaciones de todos los micoparásitos (Cuadro 3) y no es una especie conocida como biocontrolador. Por lo tanto, Sms tampoco parece proveer tolerancia a *R. bunodes*. Estos resultados coinciden con los de Atkinson et al. (1974) en otro patosistema.

Entre los micoparásitos que invadieron *R. bunodes*, el más abundante fue *Clonostachys*, un género conocido por su potencial como biocontrolador de *Rosellinia* (Mendoza et al. 2003). Este género fue igualmente común en todos los clones, independiente de su supuesta reacción genética. Para *Trichoderma* spp., otro género promisorio en el control biológico de *Rosellinia* (Mendoza et al. 2003), y varios micoparásitos no-identificados, se detectaron algunas diferencias en abundancia entre clones, pero no se observó ningún patrón respecto a la supuesta reacción genética (Cuadro 3). Por lo tanto, los antagonistas propios de *R. bunodes* no parecen responsables de una reacción diferenciada del germoplasma hacia este patógeno, si es que existe, algo que aún falta demostrar.

Conclusiones

Para los clones de cacao IMC67, Pound 7 y UF613, no se encontró evidencia de tolerancia hacia tres cepas costarricenses de *R. pepo*. Un amplio espectro de micoparásitos en la rizosfera de cacao no mostró relación con la reacción supuesta del germoplasma hacia *R. pepo*. Respecto a *R. bunodes*, no se logró juzgar el comportamiento del germoplasma. Las poblaciones de micoparásitos propios de este patógeno no siguieron ningún patrón sistemático en relación con el germoplasma del cacao.

Se requieren más estudios detallados sobre la tolerancia y resistencia del cacao a patógenos de suelo. Para detectar niveles moderados de resistencia horizontal, hay que afinar las metodologías existentes. Recomendamos trabajar con cacao clonal y mezclas diversas de patógenos.

El hecho de que varios clones soportaron poblaciones semejantes de antagonistas, entre ellos altos niveles de biocontroladores reconocidos, como *Clonostachys* spp. y *Trichoderma* spp., ofrece esperanza al control biológico de *Rosellinia* spp. en el campo, donde generalmente se siembran mezclas de clones y/o híbridos debido a la autoincompatibilidad de la mayoría de las variedades del cacao.

Agradecimientos

Esta investigación fue financiada por Cocoa Research UK, DGIS y USDA-ARS, y manejada por CABI Bioscience y CATIE. Los autores agradecen el apoyo de la Universidad de Bath, Inglaterra; de la Universidad de Costa Rica, Sede del Atlántico; de estudiantes de pasantía y de nuestros colegas Tony Álvaro, Richard Cooper, Julie Flood, Tom Harrington, Gustavo López, Victor Marchán y Hank Purdy por compartir sus amplios conocimientos con nosotros.

Literatura citada

- Aranzazu, HF. 1996. Comportamiento de la llaga estrellada *Rosellinia pepo* Pat. sobre raíces de cacao. *Fitopatología Colombiana* 20:7-10.
- _____. 1997. Control de la llaga estrellada en cacao causada por *Rosellinia pepo* Pat. *Fitopatología Colombiana* 21:5-9.
- _____; Cárdenas, LJ; Mujica, JJ; Gómez, QR. 1999. Manejo de las llagas radicales (*Rosellinia* sp.). Instituto Colombiano Agropecuario (ICA) y Corpoica, Santafé de Bogotá, CO. *Boletín de Sanidad Vegetal* 23. 35 p.
- Atkinson, TG; Neal, JJJr; Larson, RI. 1974. Root rot reaction in wheat: resistance not mediated by rhizosphere or laimosphere antagonists. *Phytopathology* 64:97-101.
- Bautista, F; Magdiel, M. 2000. Evaluación de daños económicos causados por *Rosellinia* sp. en un área afectada por el patógeno. In Echevarri, J; Zamora, L. eds. Simposio Latinoamericano de Caficultura (19, 2000, CR). San José, CR. p. 514.
- Blaha, G; Paris, N. 1987. Examen en microscopie électronique de l'aspect externe des carbosés du cacaoyer saines ou infectées par *Phytophthora megakarya*. *Café Cacao Thé* 31:23-33.
- Burbano, V. 1992. Influencia de las micorrizas vesículo arbusculares (MVA) sobre *Rosellinia bunodes*, agente causal de la llaga negra del café. Congreso Ascolfi. (Colombia) *Memorias*. p. 61.
- Cadavid, S. 1995. *Rosellinia* in cocoa. *Cocoa Growers' Bulletin* 49:52-59.
- Capriles de Reys, L; Reys, HE. 1968. Contenido de polifenoles en dos variedades de *Theobroma cacao* L. y su relación con la resistencia a *Ceratocystis fimbriata*. *Agronomía Tropical* 18:339-355.
- _____; Schulz, MS; Muñoz, A. 1964. El contenido de ácido clorogénico con diferentes variedades de cacao y su relación con la resistencia contra el hongo *Ceratocystis fimbriata*. *Agronomía Tropical* 16:273-284.
- Cárdenas, J. 1997. Efecto de *Pseudomonas fluorescentes* sobre *Rosellinia bunodes* en plantas de café. Tesis Mag. Sc. Turrialba, CR, CATIE. 87 p.

- Cárdenas, S; Bustamante, E; Rivas, G; Rivillas, C; Pérez, C. 1998. Aislamiento de *Pseudomonas fluorescens* antagonista potencial de *Rosellinia bunodes* en raíces de café en Colombia. *Manejo Integrado de Plagas* 49:35-41.
- Castro, AM. 2001. Efecto de *Entrophospora colombiana*, *Glomus manihotis* y *Burkholderia cepacia* en el control de *Rosellinia bunodes* Berk. y Br. agente causante de la llaga negra del cafeto. Thesis M.Sc. Manizales, CO, Universidad de Caldas.
- Castro, BL. 1995. Antagonismo de algunos aislamientos de *Trichoderma koningii*, originados en suelo Colombiano contra *Rosellinia bunodes*, *Sclerotinia sclerotiorum* y *Pythium ultimum*. *Fitopatología Colombiana* 19:7-18.
- Chadova, ZS; Sedova, SA; Kurakova, TI. 1980. [Efecto de la planta en la interrelación entre el hongo causante de la marchitez de *Fusarium* y sus antagonistas] *Turkmenistan SSR Ylymlar Akademijasynyn Habarlary, Biologik Ylymlaryn* 4: 75-77 (en Ruso), solamente se consultó el resumen en inglés (CABDirect 2003).
- Cooper, RM; Resende, MLV; Flood, J; Rowan, MG; Beale, MH; Potter, U. 1996. Detection and cellular localization of elemental sulphur in disease-resistant genotypes of *Theobroma cacao*. *Nature* 379:159-162.
- Cubillos, G. 1988. Eficiencia de campo del fungicida sistémico tridemorph en el control de la *Rosellinia* del cacao. *El Cacaotero Colomb.* 11, 27-33.
- Fernández, O; López, S. 1964. Las llagas radiculares negra (*Rosellinia bunodes*) y estrellada (*Rosellinia pepo*) del cafeto. I. Patogenicidad e influencias de la clase de inóculo en la infección. *Cenicafé (Colombia)* 15(3):126-144.
- Fisher, RA; Yates, F. 1963. *Statistical Tables for Biological, Agricultural and Medical Research*. 6 ed. Edinburgh, UK, Oliver Boyd. p. 8-10; 66.
- Foley, MF; Deacon, JW. 1985. Isolation of *Pythium oligandrum* and other necrotrophic mycoparasites from soil. *Transactions of the British Mycological Society* 85:631-639.
- Jabareen, H; Szejnberg, A. 1986. Germination trials and structure of microsclerotia of *Dematophora necatrix*. *Phytoparasitica* 14:3.
- Johnson, WC. 2000. Methods and results of screening for disease- and insect-resistant apple rootstocks. *The Compact Fruit Tree* 33:108-111.
- Lee, SB; Ko, K; Aldwinckle, HS. 2000. Resistance of selected *Malus* germplasm to *Rosellinia necatrix*. *Journal of the American Pomological Society* 54:219-228.
- López, CJ; Pérez, RM; Barceló, A; Zea, T. 1999. Evaluación de patrones de aguacate por su tolerancia a la podredumbre blanca. *Revista Chapingo (Serie Horticultura)* 5:267-270.
- López, G; Pérez, J; Kleinn, C. 2001. SAS: Aplicaciones en el campo agropecuario y de los recursos naturales. Turrialba, CR, CATIE. p. 2-153.
- Mendoza, RA; Ten Hoopen, GM; Kass, DCJ; Sánchez, GVA; Krauss, U. 2003. Evaluation of mycoparasites as biocontrol agents of *Rosellinia* root rot in cocoa. *Biological Control* 27:210-227.
- Merchán, VM. 1989. Evaluación de fungicidas para el control de la llaga estrellada (*Rosellinia pepo*) del cacao. *In Congreso de la Asociación Latinoamericana de Fitopatólogos, División APS-Caribe, y la Asociación Colombiana de Fitopatólogos y Ciencias Afines. Resúmenes*. Cali, CO, CIAT. p. 44.
- _____. 1990. La *Rosellinia* del cacao. *El Cacaotero Colombiano* 13:13-19.
- _____. 1993. Experiencias en el manejo de *Rosellinia*. *Ascolfi Informa* 19:23-24.
- Mulligan, DFC; Deacon, JW. 1992. Detection of presumptive mycoparasites in soil placed on host-colonized agar plates. *Mycological Research* 96:605-608.
- _____; Jones, EE; Deacon, JW. 1995. Monitoring and manipulation of populations of *Pythium oligandrum*, *Pythium mycoparasiticum* and a *Papulaspora species* in soil. *Soil Biology and Biochemistry* 27: 1333-1343.
- Nowell, W. 1916. *Rosellinia* root diseases in the Lesser Antilles. *West Indian Bulletin* 16:31-77.
- Philip, T; Bajpai, AK; Govindaiah. 1995. Disease resistance breeding in mulberry. *International Journal of Tropical Plant Diseases* 13:183-192.
- Purdy, H. 1999. Root diseases of cocoa. *In Krauss, U; Hebbbar, P. eds. Research Methodology in Biocontrol of Plant Diseases with Special Reference to Fungal Diseases of Cocoa*. Disponible en www.dropdata.net/Coco_files/Costa Rica_WorkShop.htm.
- Resende, MLV; Flood, J; Cooper, RM. 1995. Effect of method of inoculation, inoculum density and seedling age at inoculation on the expression of resistance of cocoa (*Theobroma cacao* L.) to *Verticillium dahliae* Kleb. *Plant Pathology* 44:374-383.
- Restrepo, F. 1997. Efecto de los hongos micorrizógenos *Entrophospora colombiana* y *Glomus fistulosum* en el control de la llaga negra del cafeto *Rosellinia bunodes*. M. Sc. Thesis. Manizales, CO, Universidad Católica Manizales.
- Salazar, M; Aranzazu, H. 1987. Estudios preliminares sobre la llaga estrellada (*Rosellinia pepo*) en cacao (*Theobroma cacao*). *Cacaotero Colombiano* 10(34):40-42.
- Simmonds, N. 1994. Horizontal resistance to cocoa disease. *Cocoa Growers' Bulletin* 47:42-53.
- Szejnberg, A; Azaizia, H; Chet, I. 1983. The possible role of phenolic compounds in resistance of horticultural crops to *Dematophora necatrix* Hartig. *Phytopathologische Zeitschrift* 107:318-326.
- _____; Jabareen, H. 1985. *Dematophora* root rot disease in persimmon and studies on resistance of rootstocks to the disease. *Alon Hanotea* 39:757-762.
- Ten Hoopen, GM; Aisa, P; Stirrup, T; Krauss, U. 2003. Independence of genetic disease reaction towards *Phytophthora palmivora* and *Moniliophthora roreri*, and populations of epiphytic, antagonistic fungi in cocoa (*Theobroma cacao*). *International Cocoa Research Conference (14, 2003, Accra, GH)*. Proceedings. p. 1061-1066.
- Waterston, JM. 1941. Observations on the parasitism of *Rosellinia pepo* Pat. *Tropical Agriculture* 18:174-184.
- Wellman, FL. 1954. Evidencia de resistencia a las enfermedades en los cafetos. *Turrialba* 4:52-57.