

Capítulo V. CONTRIBUCION AL ESTUDIO DE LA VARIABILIDAD DE [*Crinipellis perniciosa* [(*Stahel*) Singer], AGENTE CAUSANTE DE LA ESCOBA DE BRUJA DEL CACAO.

Germán Tovar

Profesor Titular. Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de Colombia, A.A. 14490. Santa Fe de Bogotá, D.C.

RESUMEN

Varios aislamientos de *C. perniciosa* provenientes de Colombia, Brasil y Ecuador se compararon por sus espectros proteínicos totales y de alfa-esterasas, su crecimiento micelial sobre PDA-difco y a través de su sensibilidad al Triadimefón. La escasa heterogeneidad de los espectros proteínicos puso en evidencia una diversidad genética de los aislamientos poco marcada. Los primeros estudios sobre espectros enzimáticos revelaron un polimorfismo más acentuado de los aislamientos. La comparación de los aislamientos por su crecimiento micelial lineal sobre PDA mostró diferencias significativas ($P < 0,01$). Las pruebas de sensibilidad al triadimefón mostraron que no existen interacciones diferenciales entre el fungicida y los aislamientos. En general, todos los aislamientos fueron sensibles al Bayletón 25% a la dosis de $1\mu\text{g/ml}$ con una reducción promedia

del crecimiento micelial del 59% sin que se registraran diferencias significativas entre ellos.

INTRODUCCION

La variabilidad de *C. perniciosa* es un aspecto importante de la patogenicidad, estrechamente relacionada con la resistencia del cacao (*Theobroma cacao* L.). La caracterización de *C. perniciosa* de diferentes regiones geográficas suramericanas, a través de sus espectros proteínicos y enzimáticos, ofrece amplias posibilidades para el establecimiento de variantes y para determinar la variabilidad al interior de la especie.

La técnica de electroforesis permitió demostrar sobre la base de los espectros proteínicos totales la homogeneidad intraespecífica de *Glomerella cingulata* (Stipes, 1965); la variabilidad al interior de la espe-

cie fue dilucidada a través del análisis de ciertas actividades enzimáticas. La variabilidad del agente de la antracnosis de la yuca (*Colletotrichum gloeosporioides*, f. sp. *manihotis*) fue demostrada mediante sus espectros proteínicos totales y de α -esterasas, los cuales indicaron una amplia heterogeneidad fisiológica (Goffart, 1984). Los aislamientos de *Rhizoctonia solani*, agente causante del añublo de la vaina en arroz, fueron estudiados y comparados a través de sus espectros proteínicos y enzimáticos (Zuber y Manibhushanrao, 1982).

La interpretación de proteinogramas totales puede presentar algunas dificultades metodológicas relacionadas con el gran número de bandas y a sus migraciones relativas, frecuentemente muy cercanas (Geiger, Loury y Huguenin, 1980).

El hongo, además de *Theobroma cacao* L., ataca *T. grandiflorum*, *T. bicolor* Humb. y Bonpl., *T. obovatum* Klotz. ex Bern, *T. microcarpon* Mart., *T. subincatum* Mart. - *T. speciosum* Wild.; otros cacaos como *Herrania albiflora* Gudot, *H. nitida* (Poepp.) Shultes, *H. purpurea* (Pitter) y *Sterculia speciosa* Schum.

Los variantes morfológicos de *C. pernicioso* han sido registrados, desde la descripción de la especie, como el variante de basidiocarpos de color rojo-oscuro sobre escobas en el Ecuador (Stahel, 1919). Posteriormente se describieron basidiocarpos del Ecuador de color rojo-carmesí, que se aclaraban con la edad y basidiocarpos de color amarillo (Evans, 1978). Estos variantes se designaron como var. *pernicioso*, var. *ecuadoriensis* y var. *citriniceps*, respectivamente, (Pegler, 1978). La temperatura parece ser el factor que determina la variación en el color (Rocha, 1983).

La existencia de variantes patogénicos de *C. pernicioso* fue sugerido desde hace varios años. El patotipo de *T. cacao* es patogénico sobre *T. bicolor* y *H. nitida*; sin embargo, el patotipo de liana (*Entada gigas* (L.)

Falk y Rendle) es débilmente patogénico en cacao y especies relacionadas (Evans, 1978). Un patotipo de *Solanum* causó infección y escobas en otras especies relacionadas, pero no en plántulas de cacao del clon ICS-39 (Pegler, 1978. Bastos *et al.*, 1981; Bastos y Evans, 1985). Aislamientos de varias regiones de Suramérica y del Caribe difieren en su habilidad para producir síntomas sobre plántulas (Wheeler y Mepsted, 1982, 1984, 1988). La comparación de aislamientos de Suramérica planteó la existencia de dos poblaciones importantes de *C. pernicioso* en cacao: 1) Aislamientos de Bolivia, Colombia y Ecuador, y 2) aislamientos de Brasil, Trinidad y Venezuela, siendo los primeros más agresivos que los segundos (Wheeler y Mepsted, 1984).

Los estudios sobre variantes de compatibilidad somática sobre agar han mostrado la incompatibilidad (no hay mezcla) entre aislamientos de liana (*E. gigas*) y cacao (Hedger *et al.*, 1987); también se han encontrado diferencias en compatibilidad entre aislamientos de cacao de la región amazónica brasileña (Andebrhan, 1987). La comparación de 64 aislamientos monospóricos de cacao provenientes de diferentes localidades de Suramérica permitió la clasificación en seis grupos, basados sobre pruebas de crecimiento y reacciones de compatibilidad (McGeary y Wheeler, 1988), a saber, 1) Pichilingue y Río Palenque en el Ecuador; 2) Chigorodó y Manizales en Colombia; 3) Sucua en Ecuador; Manaos en Brasil; 4) Ouro Preto en Brasil; 5) Castanhal en Brasil y 6) Trinidad.

Para Colombia se han determinado tres grupos de aislamientos de diferentes regiones: 1) Llanos Orientales; 2) Garzón y Florencia; 3) Apartadó, Padilla, Puerto Tejada, Quindío, Risaralda y Caldas. Los aislamientos de los Llanos Orientales fueron compatibles entre ellos y mostraron antagonismo con los otros dos grupos; los del grupo 2

mostraron una incompatibilidad variable entre ellos y los del grupo 3; los del grupo 3 muestran compatibilidad entre ellos. También se registró incompatibilidad entre el grupo 1 y el grupo 2 y otros aislamientos de Suramérica (Castanhal, Manaus, Ouro Preto, Pichilingue y Sucua). Sin embargo, las pruebas de patogenicidad (hipocótilo) muestran que no hay diferencias entre los aislamientos. Los aislamientos del grupo 2 que presentaron antagonismo con los del grupo 3 indujeron el mismo hinchamiento sobre diferentes híbridos (Mayorga, 1988).

Los aspectos genéticos de la patogenicidad de *C. pernicioso* no han sido totalmente definidos, lo cual es muy importante para el desarrollo de un programa de resistencia a la enfermedad (Almeida y Andebrhan, 1984).

Con este estudio se buscó contribuir al conocimiento de la variabilidad de *C. pernicioso* mediante la comparación de los espectros proteínicos totales y de α -esterasas de aislamientos provenientes de Colombia, Brasil y Ecuador.

MATERIALES Y METODOS

Aislamientos de *C. pernicioso*

Se analizaron cinco (5) aislamientos de *C. pernicioso* provenientes de Manizales - Colombia (CPM-1), Pichilingue - Ecuador (CPP-2), Sucua - Ecuador (CPZ-3), Castanhal - Brasil (CPC-4), Manaus - Brasil (CPM-5).

Condiciones de cultivo

Las cepas puras se repicaron en cajas de Petri con papa-dextrosa-agar (PDA-Difco) y se incubaron a $26^{\circ} \pm 1^{\circ} \text{C}$, a la oscuridad durante diez días.

Los cultivos en medio líquido se realizaron en jugo V-8 1,5% (Campbell's V-8 vege-

table juice). Para cada aislamiento se hizo una suspensión micelial tomando 14 discos de 4 mm de diámetro del borde de la colonia sobre PDA y colocándolos en un erlenmeyer de 50 ml, con 25 ml de V-8 líquido. Para obtener la suspensión de fragmentos miceliales se agitó con esferas de vidrio durante 15 minutos.

Los cultivos líquidos se iniciaron por inoculación de 4 ml de suspensión micelial en erlenmeyers de 250 ml, dispensados con 96 ml de medio líquido V-8. Los cultivos fueron incubados durante 12 días con agitación permanente (100 rpm) a $26^{\circ} \pm 1^{\circ} \text{C}$ en semi-oscuridad. Se efectuaron tres repeticiones por aislamiento y se ejerció un estricto control para evitar contaminaciones.

Proceso de extracción de proteínas solubles

El micelio fue separado del medio líquido por filtración y tres enjuagues sucesivos con agua bidestilada, sobre papel de filtro Whatman 1. Luego, se determinó el peso fresco del micelio y se colocó en un tampón fosfato 0,1 M, pH 7,2 (P/V: 3/1; 3/2) y se congeló a -30°C , durante 24 horas. El contenido celular se obtuvo pasando el micelio congelado tres veces consecutivas por una prensa hidráulica, (LKB 1608X - Press Cell desintegrator). Se dejó licuar el extracto y se centrifugó a 13.000 rpm (14.000 g) a 4°C , durante 15 minutos. Se retuvo el sobrenadante y se determinó el contenido de proteínas solubles mediante la prueba de Folin de Lowry (1951), utilizando como proteína de referencia la albúmina de suero bovino (BSA). Los extractos proteínicos fueron analizados mediante la técnica de electroforesis sobre placas verticales de poliacrilamida. El equipo utilizado fue el *Bio-Rad Protean Dual Gel Electrophoresis Cell*.

Electroforesis

Preparación de geles: La técnica utilizada estuvo basada en la de Ornstein-Davis (1964).

Gel de espaciamiento

- 4% de poliacrilamida.
- Tampón Tris (hidroximetil aminometano) - HCl 0,125 M; pH 6,8.
- Composición de la solución:
Agua bidestilada: 61,5% (V/V).
0,5 M Tris - HCl pH 6,8: 25% (V/V).
Acrilamida - Bis (30%: 2,67%) 13% (V/V).

Gel de separación:

- 7,5% de poliacrilamida.
- Tampón Tris - HCl 0,375 M; pH 6,8.
- Composición de la solución:
Agua bidestilada: 50%
1,5 M Tris - HCl pH 8,8: 25% (V/V).
Acrilamida - Bis (30%: 2,67%) 25% (V/V).

Por solución de gel se añadió $5 \times 10^{-3}\%$ (V/V) de persulfato de amonio 10% (V/V) recién preparado y $5 \times 10^{-5}\%$ (V/V) de Temed (N,N,N',N' - tetrametilendiamina), catalizador e iniciador de la polimerización de la mezcla acrilamina-bis acrilamida, respectivamente. Después de la polimerización (dos horas), el conjunto se coloca en un tampón de electrodo tris - glicina pH 8,3.

Procedimiento: Se marcan los agujeros y se colocan muestras de 10 - 20 μ l de extracto adicionado de 5 μ l de tampón de muestra con la ayuda de una jeringa. El tampón de muestra Tris - HCl pH 6,8 contiene el azul de bromofenol, marcador del frente de migración que llega hasta 1 cm del borde inferior del gel de separación, bajo una tensión constante de 150 V y una intensidad de corriente de 10 mA, en el gel de espaciamiento, y de 30 mA en el gel de

separación. La duración de la separación es de, aproximadamente, cuatro horas.

Las proteínas migran del electrodo negativo hacia el positivo. Los valores Ef son calculados expresando la distancia de desplazamiento de cada banda en relación con la distancia que alcanza el frente de migración (azul de bromofenol).

Decoloración y coloración de geles: La decoloración se realizó en un baño de metanol (250 ml), ácido acético (100 ml) y agua bidestilada hasta completar 1 litro. Luego se revelaron las proteínas en un baño de solución colorante con azul de Coomassie.

Los geles son analizados directamente bajo la luz o en el densitómetro, y pueden conservarse en bolsas de polietileno agregando unas gotas de ácido acético.

Para la determinación de α - esterases los geles se colocaron en una solución recién preparada según la fórmula siguiente:

- 20 mg α - naftilacetato disuelto en 2 ml de acetona 50% (V/V) en agua.
- 75 mg de Fast Red TRN.
- 100 ml de tampón fosfato 0,1 M pH 6,5.

Comparación de aislamientos por su crecimiento micelial.

Se tomaron discos de 5 mm de diámetro de colonias jóvenes en activo crecimiento y se colocaron en el centro de cajas de Petri, dispensadas con papa-dextrosa-agar (PDA difco). Las cajas se inocularon en la oscuridad a una temperatura de $26^{\circ} \pm 1^{\circ}$ C. El crecimiento de la colonia fue medido periódicamente, determinando su diámetro.

Comparación de aislamientos a través de su sensibilidad al Triadimefón:

Se realizó una prueba preliminar con el aislamiento de Manizales y tres dosis de Triadimefón (Bayletón, 25%), a saber: 0,5; 5 y 50 µg/ml de material activo. El fungicida (200 mg) se disolvió en 10 ml de ETOH y las diluciones requeridas también se realizaron en etanol. Luego, las diluciones fueron añadidas al medio en erlenmeyers de 150 ml con PDA a 50°C. La mezcla se agitó para obtener una buena distribución de la dilución fungicida y se dispensó en cajas de Petri (12 ml) con la ayuda de una jeringa calibrada. Para el tratamiento testigo se añadió 1,5 ml de ETOH. Se realizaron cinco repeticiones por tratamiento. Después de la solidificación del medio se inocularon las cajas en el centro con discos de 4 mm, sacados del borde de la colonia. La incubación se hizo bajo condiciones de oscuridad y a una temperatura de $26^{\circ} \pm 1^{\circ}$ C. La comparación de los cinco aislamientos se hizo con la dosis de 1 µg/ml.

RESULTADOS

Técnica de electroforesis

La evaluación de geles de separación de 7,5% y 12%, mostró que en las dos concentraciones hubo migración; sin embargo, la mejor separación de bandas se obtuvo sobre el gel de 7,5%.

Espectros proteínicos.

La calibración de la técnica se trabajó con el aislamiento colombiano (Manizales, Caldas). Se evaluaron diferentes relaciones peso del micelio/ Tampón fosfato (3:1; 3:2 y 3:3). La relación 3:3 permitió una mejor diferenciación de bandas en toda la superficie de la placa. Sin embargo, cuando el micelio es abundante (6-7g) una relación 3:2 puede ser más adecuada.

Las bandas presentaron una nitidez adecuada cuando la concentración de proteína

fue de, aproximadamente, 100 mg/ml; con concentraciones bajas de proteína (30-40 mg/ml) las bandas observadas eran tenues. El tiempo de almacenamiento afecta la nitidez de las bandas, determinándose que éste no debe ser mayor de 15 - 20 días.

Para los diferentes aislamientos se obtuvieron proteinogramas bastante similares, aunque la intensidad de las bandas varía considerablemente, debido posiblemente a la concentración de proteínas.

Las electroforesis realizadas con muestras de proteínas provenientes de cultivos diferentes dieron espectros proteínicos, sensiblemente iguales.

Espectros enzimáticos

En contraposición a los espectros proteínicos se presentó una mayor heterogeneidad en los espectros de las α -esterasas.

Comparación de aislamientos por su crecimiento.

Los aislamientos presentaron entre sí diferencias altamente significativas ($P < 0,01$) en su crecimiento micelial sobre agar (Fig. 1). El aislamiento de Castanhal presentó el crecimiento más rápido ($b = 0,59$) en contraposición al aislamiento de Pichilingue que exhibió el crecimiento más lento ($b = 0,18$).

Comparación de aislamientos por su sensibilidad al Triadimefón

La prueba preliminar con el aislamiento de Manizales (Fig. 2) mostró diferencias altamente significativas entre el testigo y los tratamientos a las diferentes dosis y entre las dosis. El crecimiento fue completamente inhibido a las dosis de 5 y 50 µg/ml. Con base en este resultado se decidió utilizar la dosis de 1 µg/ml para la comparación de los cinco aislamientos.

Los efectos del Triadimefón sobre el crecimiento micelial lineal (Tabla 1 y Fig. 3)

presentaron diferencias significativas a la dosis de 1 $\mu\text{g/ml}$. Si se compara el testigo de esta prueba (Fig. 4) con los datos de crecimiento micelial lineal sobre PDA (Fig. 1) no se reproducen exactamente los mismos resultados, debido a la adición de etanol al primero, que ocasiona un efecto inhibitorio del crecimiento, especialmente sobre el aislamiento proveniente de Sucua. En los aislamientos de Sucua, Pichilingue y Manaus se observaron sectores que sobresalían ampliamente del borde de la colonia, tratándose, posiblemente, de sectores mutantes hacia la resistencia al fungicida. Los aislamientos de Castanhal y Colombia no presentaron sectores.

DISCUSION

La escasa heterogeneidad de los espectros proteínicos pone en evidencia una di-

versidad genética de los aislamientos relativamente poco compleja. Es posible que el bajo polimorfismo encontrado esté relacionado con la morfología, muy similar, de los aislamientos, y además, haya contribuido a la reproductibilidad de los resultados a partir de muestras de cultivos diferentes.

La escasa heterogeneidad encontrada también puede estar relacionada con una dispersión geográfica discreta, restringida al trópico suramericano, entre 10°S y 15°N .

Aunque el *C. pernicioso* es un parásito facultativo, en la naturaleza está asociado permanentemente a su hospedante (*T. cacao*, cacaos silvestres, *Herrania*, lianas, solanáceas), lo que puede significar que el hongo sufre presiones de selección fuertes de parte de sus hospedantes, evitando una

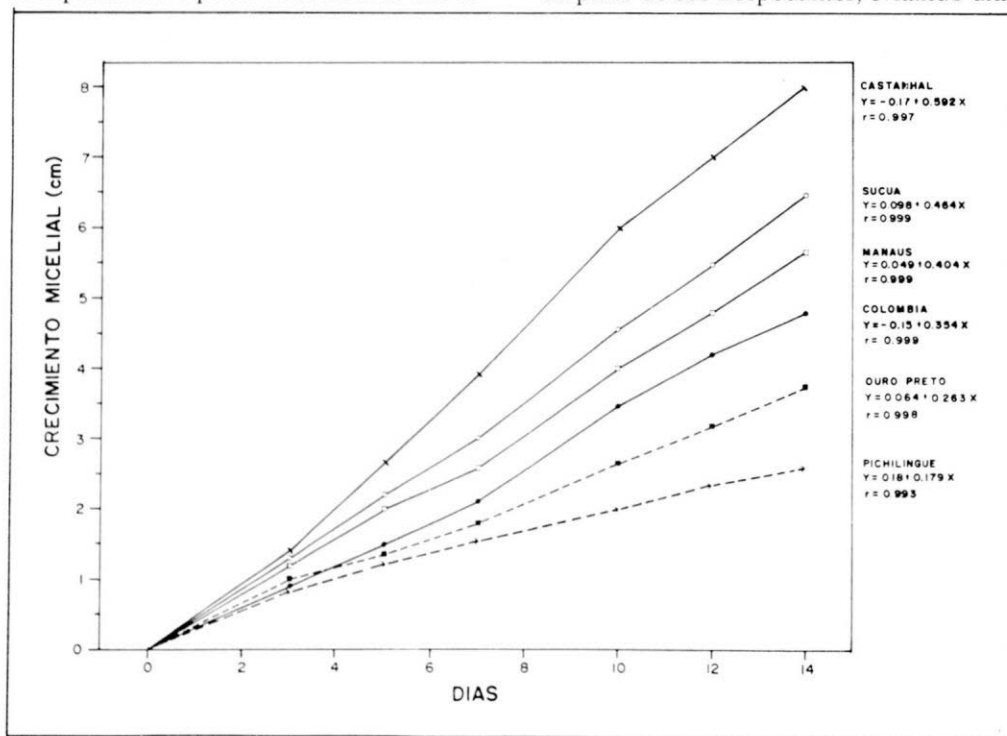


Fig. 1. Crecimiento micelial Papa-dextrosa-agar (PDA difco) de seis aislamientos de *C. pernicioso*: Castanhal-Brasil, Sucua-Ecuador, Manaus-Brasil, Manizales-Colombia, Ouro-Preto-Brasil y Pichilingue-Ecuador.

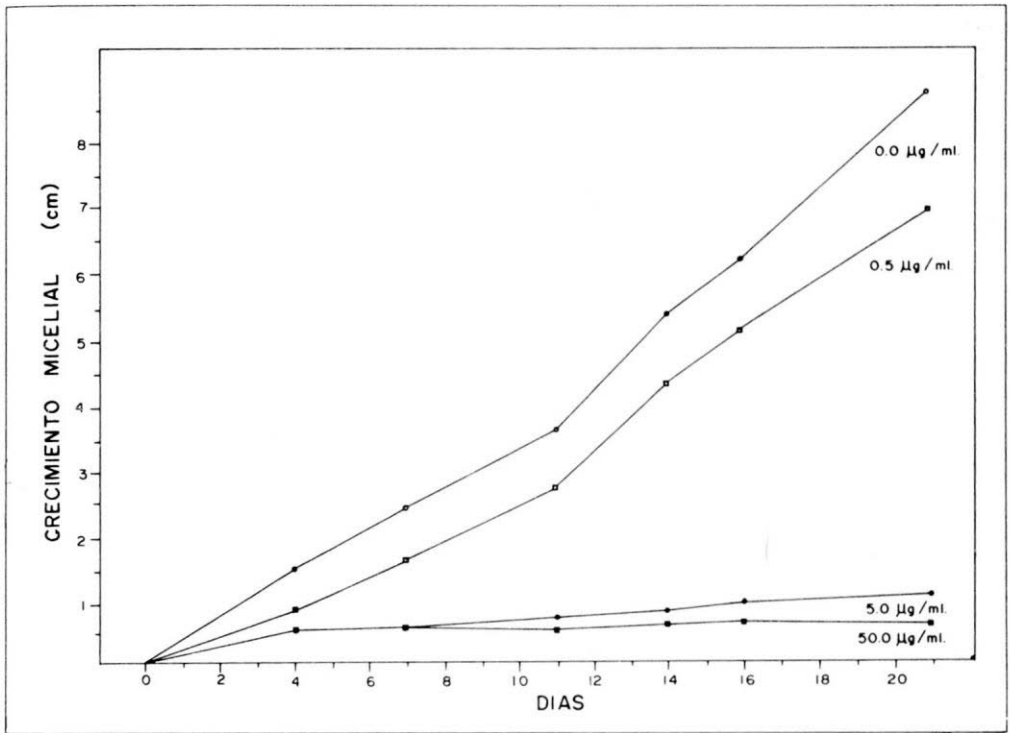


Fig. 2. Sensibilidad del aislamiento de *C. pernicioso* proveniente de Manizales-Colombia a tres dosis de Triadimefón (Bayletón 25%), expresada a través del crecimiento micelial lineal.

deriva acentuada del genoma de los individuos (Geiger, Lourd, Huguenin, 1980).

Los espectros enzimáticos presentaron un poliformismo mayor; sin embargo, su estudio no fue lo suficientemente profundo, lo cual amerita seguir con las investigaciones con el fin de precisar la magnitud de dicho polimorfismo y de definir si las diferencias en agresividad de los grupos establecidos por Wheeler y Mepsted (1984), para los aislamientos suramericanos, reside en diferencias a nivel de las α -esterasas y/o de otras isoenzimas.

La comparación de los cinco aislamientos por su crecimiento micelial lineal sobre PDA muestra amplias diferencias ($P < 0,01$) pudiéndose clasificarlos de mayor a menor, de la siguiente manera: 1) Castanhal (b

$= 0,6$); 2) Sucua ($b = 0,46$); 3) Manaos ($b = 0,4$); 4) Colombia ($b = 0,35$); 5) Ouro Preto ($b = 0,26$) y 6) Pichilingue ($b = 0,18$).

La agrupación de los aislamientos por su agresividad, efectuada por Wheeler y Mepsted (1984), sitúa los aislamientos de Ecuador y Colombia en un grupo y los de Brasil en otro, siendo más agresivos los primeros que los segundos. En los grupos de compatibilidad establecidos por McGeary y Wheeler (1988), los aislamientos de Pichilingue y Manizales corresponden al mismo grupo, mientras que los de Sucua, Manaos y Castanhal se sitúan en grupos diferentes. Mayorga (1988) estableció para Colombia tres grupos de compatibilidad: 1) Llanos Orientales (Zona oriental-Orinoquia), 2) Huila - Caquetá (Zona centro - sur) y 3) Urabá, Antioquia, Valle y Cauca (Zona occi-

Tabla 1. Efectos del Triadimefón sobre el crecimiento micelial lineal de cinco aislamientos de *Crinipellis pernicioso* sobre PDA-Difco, después de 15 días de incubación.

Aislamiento	Testigo Promedio diámetro de la colonia (mm) (1)	Triadimefón (1µg/ml) % de reducción del crecimiento (2)
Castanhal.	90A	49.3A
Colombia	60B	52.2A
Manaos	58BC	67.2C
Pichilingue	55C	62.4B
Sucua	48D	66.3C

1) Promedio de tres repeticiones. promedios con la misma letra no son significativamente diferentes ($P=0,05$), para la prueba de comparación múltiple de Duncan.

2) $P = 0,05$.

dental - Costa pacífica), lo que corresponde con una dispersión geográfica nacional de zonas de producción de cacao.

El grupo 1 (zona oriental) y el grupo 2 (zona centro - sur) fueron incompatibles con aislamientos de Castanhal, Manaos, Ouro Preto, Pichilingue y Sucua, excepto el grupo 3 (zona occidental) donde se encuentra Manizales. Además, entre los tres grupos de compatibilidad colombianos no hubo diferencias a nivel de su patogenicidad (hipocótilo).

Algunas deducciones interesantes pueden ser derivadas. La compatibilidad parece estar asociada y distribuida por zonas geográficas relativamente pequeñas, así por ejemplo tres grupos en Colombia (zona occidental, zona central - sur y zona sur oriental), varios grupos en Brasil (Castanhal, Manaos, Amazonia, etc.), dos grupos en Ecuador (Pichilingue, Sucua), y un grupo en Trinidad. La deriva fisiológica por zonas

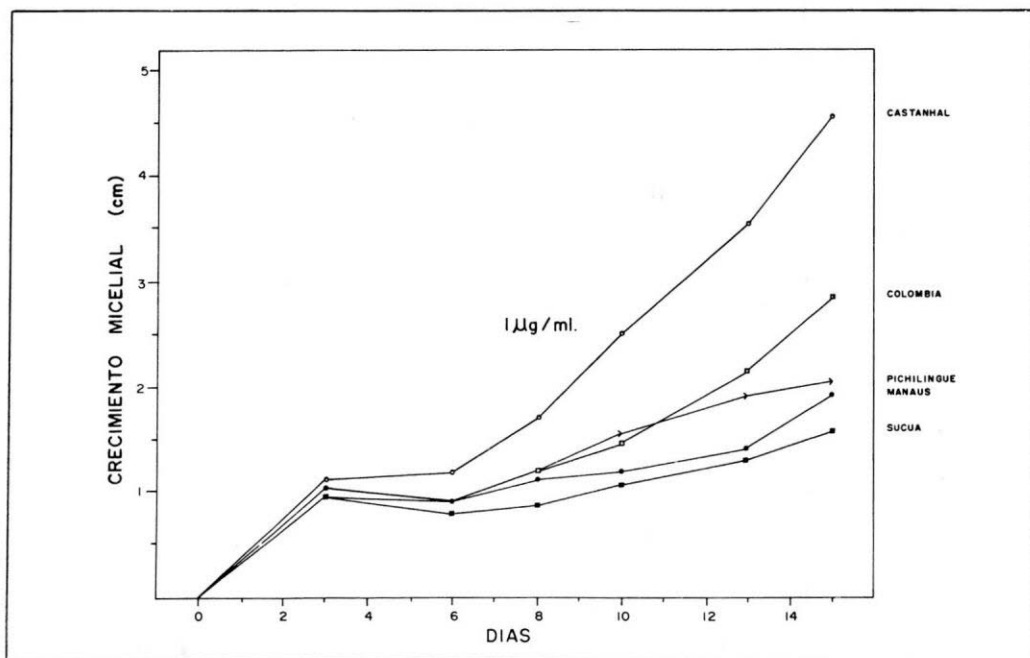


Fig. 3. Efecto del Triadimefón (Bayletón 25%) a la dosis de 1µg/ml sobre el crecimiento micelial lineal de cinco aislamientos de *C. pernicioso* sobre para-dextrosa-agar (PDA Difco).

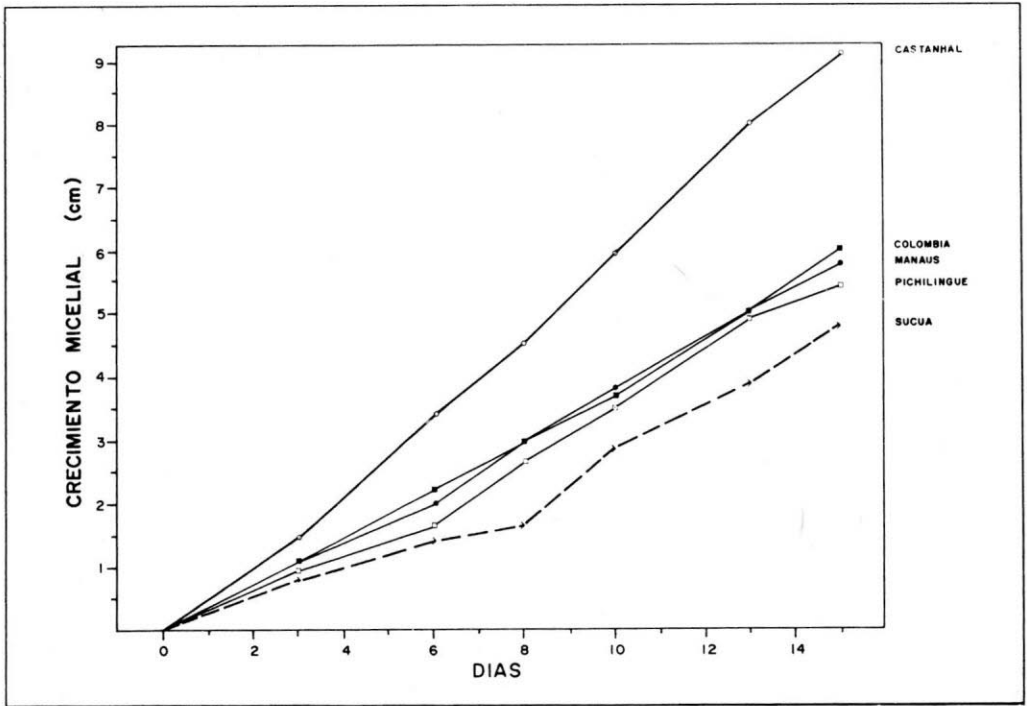


Fig. 4. Crecimiento micelial lineal de cinco aislamientos de *C. pernicioso* sobre PDA + ETOH, correspondiente al testigo de la prueba de sensibilidad al Triaméfón (Bayletón 25%).

debe ser bastante restringida y comienza a ser más amplia en función del alejamiento y dispersión geográfica.

La incompatibilidad entre grupos no está asociada, en general, a diferencias en la patogenicidad vertical (puesto que en *T. cacao* no se ha registrado interacción diferencial entre variedades de cacao y aislamientos del patógeno), por ejemplo, los grupos colombianos. Las diferencias en agresividad (patogenicidad horizontal) se han referido a dos grupos: 1) Colombia-Ecuador y 2) Brasil-Venezuela, Trinidad, que corresponden a dos grandes polos de producción de cacao. Entre los dos puntos debe existir una amplia variabilidad de la agresividad (sistema poligénico de herencia cuantitativa), la cual posiblemente no se ha registrado, dadas las características tan variadas de la infección que hacen difícil apreciar diferencias cuantitativas peque-

ñas. Hasta el presente no se ha demostrado la existencia de interacciones diferenciales entre aislamientos de *C. pernicioso* y sus especies hospedantes (cacao cultivado, cacaos silvestres, lianas o solanáceas) que signifiquen resistencia vertical. Pero, en cambio, sí ha sido registrada una patogenicidad débil de los patotipos de liana sobre cacao y especies relacionadas (Evans, 1978) y una patogenicidad nula de un patotipo de *Solanum* sobre plántulas de cacao (Pegler, 1978; Bastos *et al.*, 1981; Bastos y Evans, 1985). En estos dos últimos casos la interacción diferencial puede significar inmunidad, pero no resistencia vertical. Si las observaciones sobre la patogenicidad son correctas se podrían establecer formas especiales al interior de la especie *C. pernicioso*.

La comparación de aislamientos a través de su sensibilidad al Triadimefón muestra que no existen interacciones diferenciales

entre el fungicida y las cepas, en el sentido de que se haya encontrado efectividad del producto contra algunos aislamientos y no contra otros. Todos los aislamientos fueron sensibles al Bayletón 25, que es un producto sistémico de acción selectiva (fungicida vertical que puede bloquear una o pocas reacciones enzimáticas del ciclo de Krebs). Sobre esta base se puede sugerir que no existen diferencias en cuanto a vías metabólicas del fungicida sobre los seis aislamientos estudiados.

El fungicida (1 µg/ml) redujo el crecimiento de los seis aislamientos (promedio 59%) sin que existieran diferencias marcadas entre ellos. En el testigo el aislamiento de Sucua disminuyó drásticamente su tasa de crecimiento (0,31), en comparación con la prueba sobre agar (0,46), debido al efecto del ETOH.

En pruebas de sensibilidad a hexaconazole y a triadimenol realizadas con aislamientos provenientes de Castanhal, Manizales y Trinidad no se encontraron diferencias amplias entre aislamientos; la dosis más alta para la inhibición del crecimiento micelial al 50% fue para el aislamiento de Castanhal (0,39 y 0,59 mg/l), las intermedias para el aislamiento de Manizales -F2 (0,23 y 0,24 mg/l) y la más baja para Trinidad (0,06 y 0,16 mg/l). Las sensibilidades de los aislamientos no fueron relacionadas con la patogenicidad (McQuilken, Supriadi y Rudgard, 1988).

BIBLIOGRAFIA

- Almeida, L. C. y Andebrhan, T. 1984. Investigações sobre vassoura-de-bruxa do cacauero (*C. pernicioso* (Stahel) Singer) na Amazonia brasileira, Comissão executiva do plano de lavoura cacauera Departamento especial de Amazonia. Divisão de Fitopatologia, Brasil. 39 pp.
- Andebrhan, T. 1987. Cultural characteristics and biochemical reactions of isolates of *Crinipellis pernicioso* causative agent of witches' broom disease of cocoa. *Proceedings of the 10th. International cocoa research conference*. 17-23 May 1987. Santo Domingo, Dominican Republic.
- Bastos, N.C. y Evans, H.C. 1985. A new pathotype of *Crinipellis pernicioso* (witches' broom disease) on solanaceous hosts. *Plant Pathology*, 34, 306 - 312.
- Bastos, N.C.; Evans, H.C. y Samson, R.A. 1981. A new hyperparasitic fungus, *Cladobotryum amazonense* with potencial for control of fungal pathogens of cocoa. *Transactions of the British Mycological Society*, 77, 273 - 278.
- Evans, H.C. 1978. Witches' broom disease of cocoa *Crinipellis pernicioso* in Ecuador. I. The fungus *Annals of Applied Biology*, 89, 185 - 192.
- Gieger, J.P.; Lourd, M. et Huguenin, B. 1980. Les *Colletotrichum* agents d'antracnose en Côte d'Ivoire II. Polymorphisme enzymatique dans une collection d'isolats de *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. *Ann. Phytopathol*, 12(3), 177 - 191.
- Goffart, J.P. 1984. Contribution à l'étude de la variabilité de *Colletotrichum gloeosporioides*, Penz f. sp. *manihotis*, agent de l'antracnose du Manioc. Mémoire Ingenieur Agronome. Université Catholique de Louvain, Belgique. 98 pp.
- Hedger, J.N.; Pickering, V. and Aragundi, J. 1987. Variability of populations of the witches' broom disease of cocoa (*Crinipellis pernicioso*). *Transactions of the British Mycological Society*, 88, 533 - 546.
- Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Far, A.L. and Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of biological chemistry* 193, 265-275.
- Mayorga, M.H. 1988. Host-parasite relationships between isolates of *Crinipellis pernicioso* and cocoa hybrids from Colombia. *M. Phil. Thesis*. University of London.
- McGeary, F.M. and Wheeler, B.E.J. 1988. Growth rates of, and mycelial interactions between, isolates of *Crinipellis pernicioso* from cocoa. *Plant Pathology*, 37, 489 - 498.
- McQuilken, M.P.; Supriadi and Rudgard, S.A. 1988. Sensitivity of *Crinipellis pernicioso* to two triazole fungicides "in vitro" and their effect on development of the fungus in cocoa. *Plant Pathology*, 37, 499 - 506.
- Ornstein, L. 1964. Disc-electrophoresis. I. Background and theory *Ann., N.Y. Acad. Sci.*, 121, 321 - 349.

Pegler, D.N. 1983. *Crinipellis pernicioso* (Agaricales). *Kew Bulletin*, 32, 731 - 736.

Rocha, H.M. 1983. The ecology of *Crinipellis pernicioso* (Stahel) Singer in witches' broom on cocoa (*Theobroma cacao* L.). Ph. D. Thesis. University of London.

Stahel, G. 1919. Bijdrage tot de kennis der Krullontenziekte. Paramaribo, Suriname. Bull. Van der Landbouw in Suriname, 39. (English Translation by B.G. Montserin). *Tropical Agriculture, Trinidad*, 9, 167 - 176.

Stipes, R.J. 1965. Comparative morphology, pathogenicity, physiology and biochemistry of perithecial isolates of *Glomerella cingulata* obtained from different hosts. Ph. D. Thesis. North Carolina State University, Raleigh. 82 pp.

Wheeler, B.E.J. and Mepsted, R. 1982. Pathogenic races of *Crinipellis pernicioso*. *Proceedings of the*

8th. International Cocoa Research Conference, October 1981, Cartagena, Colombia. pp. 365 - 370.

Wheeler, B.E.J. and Mepsted, R. 1984. Pathogenic races of *Crinipellis pernicioso* (Stahel) Singer, the causal fungus of witches' broom of cocoa (*Theobroma cacao* L.). *Final Report to the Cocoa, Chocolate and Confectionery Alliance*. London: Imperial College. 164 pp.

Wheeler, B.E.J. and Mepsted, R. 1988. Pathogenic variability amongst isolates of *Crinipellis pernicioso* from cocoa (*Theobroma cacao*). *Plant Pathology*, 37, 475 - 488.

Zuber, M. and Manibhushanrao, K. 1982. Studies on comparative gel electrophoretic patterns of proteins and enzymes from isolates of *Rhizoctonia solani* causing sheath blight disease in rice. *Can. J. Microbiol.*, 28, 762 - 771.