



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

---

**Efecto de la simbiosis de *Rhizophagus irregularis* con  
plántulas de cacao (*Theobroma cacao* L.) en el tizón de  
plántulas (*Phytophthora palmivora* (Butler))**

**Néstor Julián Cárdenas Pardo**

**Alia Rodriguez Villate**

**Director**

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias Agrarias

Bogotá D.C., Colombia

2017



**Efecto de la simbiosis de *Rhizophagus irregularis* con plántulas de cacao (*Theobroma cacao* L.) en el tizón de plántulas (*Phytophthora palmivora* (Butler))**

**Néstor Julián Cárdenas Pardo**

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

**Magister en Ciencias Agrarias**

Directora:

Ph.D. Alia Rodriguez Villate

Línea de Investigación:

Fitopatología

Grupo de Investigación:

Microbiología Agrícola –Biotecnología de las Micorrizas Arbusculares en Colombia

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias Agrarias

Bogotá D.C., Colombia

2017

*“La respuesta a si las micorrizas pueden controlar o no las enfermedades requeriría de una bola de cristal”.*

**Schenck, 1981**

## **Agradecimientos**

A Dios, por hacer posible la realización de esta etapa de mi vida. A mi directora Alia Rodríguez Villate por todo su valioso apoyo académico y disposición para el planteamiento y realización de este trabajo. A Cristhian Fernández Lizarazo por su interminable ayuda, acompañamiento logístico y humano para la realización de los diferentes experimentos llevados a cabo. Al profesor Aquiles Darghan por su asesoramiento en toda la parte estadística. Sin ellos nada de esto hubiese sido posible.

Al proyecto Utopía de la Universidad de La Salle (Yopal- Casanare) y sus estudiantes del programa de Ingeniería Agronómica de segundo y tercer año en 2015, por su enorme apoyo en campo para el establecimiento, manejo agronómico, monitoreo y muestreos de los diferentes ensayos experimentales establecidos en el campus de su Universidad.

Al ingeniero Ricardo Bueno y los hermanos Lasallistas Gonzalo y Alberto por su vocación de servicio y hacer posible el uso de las instalaciones y laboratorios del campus Utopía de la Universidad de La Salle para la realización del proyecto.

A COLCIENCIAS en el marco del programa “Análisis de tecnologías novedosas para el cultivo del cacao en el departamento de Casanare-Colombia” por la financiación de esta tesis.

A mi familia, que siempre estuvieron apoyándome en este proceso de formación científica y humana.

# Prefacio

Esta disertación es un trabajo acumulado de diferentes manuscritos que serán sometidos a evaluación en revistas científicas indexadas y uno de ellos recientemente publicado:

**Capítulo II Cárdenas, N.J., Darghan A., Sosa M.D., Rodriguez A. 2017. Análisis espacial de la incidencia de enfermedades en diferentes genotipos de cacao (*Theobroma cacao* L.) en El Yopal (Casanare), Colombia. Acta Biológica Colombiana. 22(2): 209-220.**

## Resumen

El presente trabajo de investigación se propuso evaluar el efecto de la simbiosis del hongo formador de micorrizas arbúsculares (HFMA) *Rhizophagus irregularis* con plántulas de cacao (*Theobroma cacao* L.), sobre el “tizón de plántulas” (*Phytophthora palmivora* (Butler)) en condiciones de Yopal (Casanare), Colombia. La metodología empleada incluyó una caracterización previa de los HFMA locales presentes en la rizósfera de plantas adultas de cacao, donde se encontraron seis géneros representativos de HFMA, siendo *Rhizophagus* abundante entre ellos (Capítulo I). Adicionalmente, se realizó un análisis preliminar en la misma plantación sobre el comportamiento de la enfermedad “podrición negra del fruto” (PNF), causada por *Phytophthora* spp., en el contexto de enfermedades co-ocurrentes. Esto para tener aproximaciones sobre la funcionalidad del mejoramiento genético en la dinámica de *Phytophthora* spp. en la zona de estudio (Capítulo II). A nivel de vivero, se evaluó el efecto de la simbiosis de *Rhizophagus irregularis* con plántulas de cacao sobre la intensidad de la enfermedad “tizón de plántulas” (*P. palmivora*). Este análisis se compuso por dos experimentos principales, el primero se refiere a la prueba de inoculación del oomicete en las plántulas para garantizar el proceso de infección. El segundo experimento, estuvo dirigido al efecto que causa el establecimiento de la simbiosis de *Rhizophagus irregularis* con las plántulas sobre la incidencia y severidad de la enfermedad bajo análisis. La mayor intensidad de la enfermedad se logró con la infección de zoosporas de *P. palmivora* en hojas y la simbiosis con *R. irregularis* redujo significativamente el “tizón de plántulas” de cacao (Capítulo III). Adicionalmente, se hizo un seguimiento a la dinámica de dos variables respuesta indicadoras de resistencia a enfermedades, con el fin de tener una aproximación a la resistencia sistémica inducida (ISR). Para esto, se realizó el monitoreo de la actividad guayacol peroxidasa (GPX) y de deposición de calosa en los tejidos de plántulas de cacao, dónde se obtuvo mayor actividad de estas dos variables bajo el efecto de la simbiosis (Capítulo IV). Finalmente, se presenta un análisis integrado sobre la dinámica de colonización (%) de *R. irregularis* en las raíces de plántulas de cacao y el seguimiento a variables de crecimiento vegetal.

## Abstract

This research was aimed to evaluate the effect of the symbiosis of the arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) *Rhizophagus irregularis* with cocoa seedlings (*Theobroma cacao* L.) on the "seedling wilt" (*Phytophthora palmivora*) at Yopal (Casanare), Colombia conditions. The methodology involved included a previous characterization of AMF local present in the rhizosphere of cocoa plants where six representative genera of AMF were found, being *Rhizophagus* abundant among them (Chapter I). A preliminary analysis was carried out in the same plantation on the disease behavior "black pod rot", caused by *Phytophthora* spp., in the context of co-occurring diseases. This to have approximations on the functionality of the genetic improvement in the dynamics of *Phytophthora* spp. in the study area (Chapter II). At nursery stage, effect of the symbiosis of the AMF fungus *Rhizophagus irregularis* with cocoa seedlings on the intensity of the "seedling wilt" disease (*P. palmivora*) was evaluated. This analysis was composed by two main experiments, the first one refers to the test of oomycete inoculation in cocoa seedlings to guarantee the infection process. The second experiment was directed to the effect that causes the establishment of the symbiosis of *R. irregularis* with cocoa seedlings on the incidence and severity of the disease under analysis. The highest intensity of the disease was achieved with the infection of zoospores of *P. palmivora* in leaves and the symbiosis with *R. irregularis* significantly reduced the "cocoa seedling blight" (Chapter III). The dynamics of two response indicator variables of disease resistance were monitored, in order to have an approximation to induced systemic resistance (ISR). Thus, the analysis of the guayacol peroxidase (GPX) activity and callose deposition in cacao seedlings inoculated with *R. irregularis* was performed, where greater activity of these two variables was obtained under the effect of symbiosis (Chapter IV). Finally, an integrated analysis on the dynamics of colonization (%) of *R. irregularis* in the roots of cocoa seedlings and the follow-up to plant growth variables is presented.

## Tabla de Contenido

Introducción .....	1
Objetivos.....	3
Marco teórico.....	4
1.1 <i>Phytophthora</i> en plántulas de cacao en fase de vivero.....	4
1.2 <i>Phytophthora</i> en plantas de cacao en fase de campo .....	5
1.3 Funcionalidad de HFMA en la protección de plantas contra patógenos .....	5
1.4 <i>Rhizophagus irregularis</i> como HFMA modelo en estudios de interacción simbiótica con plantas de cultivo .....	9
Capítulo I .....	11
2. Caracterización de hongos micorrízicos arbusculares presentes en la rizósfera de plantas de cacao ( <i>Theobroma cacao</i> L.) en El Yopal (Casanare), Colombia.....	11
2.1 Introducción .....	11
2.2 Materiales y métodos .....	13
2.3 Resultados .....	17
2.4 Discusión .....	19
2.5 Conclusiones .....	24
2.7 Bibliografía .....	29
Capítulo II .....	33
3. Análisis espacial de la incidencia de enfermedades en diferentes genotipos de cacao ( <i>Theobroma cacao</i> L.) en El Yopal (Casanare), Colombia.....	33
3.1 Introducción .....	33
3.2 Materiales y métodos .....	35
3.3 Resultados .....	39
3.4 Discusión .....	44
3.5 Conclusiones .....	48
3.6 Bibliografía .....	50
Capítulo III .....	54
4. Impacto de la simbiosis de <i>Rhizophagus irregularis</i> con plántulas de cacao en la incidencia y severidad del tizón de plántulas.....	54
4.1 Introducción .....	54
4.2 Materiales y métodos .....	55
Experimento I: Prueba de inoculación de <i>P. palmivora</i> en plántulas de cacao .....	58
Métodos de inoculación.....	58
Diseño experimental.....	60

Experimento II: Efecto de la simbiosis de HFMA con plántulas de cacao sobre el tizón o muerte regresiva de plántulas.....	60
Método de inoculación .....	60
Diseño experimental.....	61
4.3 Resultados .....	61
4.3.1 Resultados caracterización y multiplicación de la cepa patogénica C9 de <i>P. palmivora</i> .....	61
4.3.2 Resultados experimento I: Prueba de inoculación de <i>P. palmivora</i> en plántulas de cacao. ....	62
4.3.3 Resultados experimento II: efecto de la simbiosis de HFMA con plántulas de cacao sobre el tizón o muerte regresiva de plántulas. ....	65
4.4 Discusión .....	68
4.4.1 Experimento I: Prueba de inoculación de <i>P. palmivora</i> en plántulas de cacao. ....	68
4.4.2 Experimento II: efecto de la simbiosis de HFMA con plántulas de cacao sobre el tizón o muerte regresiva de plántulas .....	72
4.5 Conclusiones .....	76
4.6 Bibliografía .....	83
Capítulo IV .....	88
5. Efecto de <i>Rhizophagus irregularis</i> sobre la actividad guayacol peroxidasa (GPX) y deposición de calosa en plántulas de cacao inoculadas con <i>Phytophthora palmivora</i>	88
5.1 Introduccion .....	88
5.2 Materiales y métodos .....	90
5.3 Resultados .....	92
5.4 Discusión .....	96
5.5 Conclusiones .....	101
5.7 Bibliografía .....	102
Capítulo V .....	113
5. Colonización de <i>Rhizophagus irregularis</i> e impacto de la simbiosis en parámetros de crecimiento de plántulas de cacao .....	113
6.1 Introducción .....	113
6.2 Materiales y métodos .....	114
6.3 Resultados .....	116
6.4 Discusión .....	120
6.5 Conclusiones .....	122
6.6 Bibliografía .....	123
7. Conclusiones Generales .....	124
8. Recomendaciones Generales .....	125
9. Bibliografía General .....	127

## Índice de figuras

### Capítulo I: Caracterización de hongos micorrízicos arbusculares presentes en la rizósfera de plantas de cacao (*Theobroma cacao* L.) en El Yopal (Casanare), Colombia

FIGURA 1. Géneros de hongos FMA encontrados en muestras de suelo rizosférico de un cultivo de cacao compuesto por tres clones en producción en Yopal (Casanare), Colombia. .... 18

### Capítulo II: Análisis espacial de la incidencia de enfermedades en diferentes genotipos de cacao (*Theobroma cacao* L.) en El Yopal (Casanare), Colombia

FIGURA 1. Semivariogramas empíricos obtenidos para incidencia de PNF con cambios en la semivarianza en función de la distancia de separación de las plantas monitoreadas para las semanas evaluadas. .... 39

FIGURA 2. Mapas de interpolación por *kriging* de incidencia de PNF para seis semanas representativas en un área de monitoreo de 1,4 ha. .... 42

FIGURA 3. Mapas de distribución espacial de incidencia de MS obtenidos por *Join Count* para seis semanas representativas en un área de monitoreo de 1,4 ha. .... 43

### Capítulo III: Impacto de la simbiosis de *Rhizophagus irregularis* con plántulas de cacao en la incidencia y severidad del tizón de plántulas

FIGURA 1. Intensidad de la enfermedad por efecto de los tratamientos de inoculación de *P. palmivora* en plántulas de cacao. .... 64

FIGURA 2. Área bajo la curva de progreso de la enfermedad (AUDPS). Prueba de infección. A, inoculación de  $3 \times 10^8$  zoosporas en hojas. B, inoculación de  $3 \times 10^5$  zoosporas en hojas. C, inoculación de  $3 \times 10^8$  zoosporas en suelo. D, inoculación de  $3 \times 10^5$  zoosporas en suelo. .... 65

FIGURA 3. Intensidad de la enfermedad por efecto de los tratamientos de inoculación de HFMA en plántulas de cacao. .... 66

FIGURA 4. Área bajo la curva de progreso de la enfermedad (AUDPS). Prueba de HFMA. .... 68

### Capítulo IV: Efecto de *Rhizophagus irregularis* sobre la actividad guayacol peroxidasa (GPX) y deposición de calosa en plántulas de cacao inoculadas con *Phytophthora palmivora*

FIGURA 1. Actividad guayacol peroxidasa (GPX) en hojas (A) y raíces (B) de plántulas de cacao. Actividad evaluada en ddi de *P. palmivora*. .... 94

FIGURA 2. Presencia de calosa en hojas (A) y raíces (B) de plántulas de cacao. La significancia estadística de tratamientos fue determinada por ANOVA. .... 95

### Capítulo V: Colonización de *Rhizophagus irregularis* e impacto de la simbiosis en parámetros de crecimiento de plántulas de cacao

FIGURA 1. Método de intersección de la grilla (Tennant, 1975) para la determinación de porcentaje de colonización de HFMA en raíces. .... 114

FIGURA 2. Colonización (%) de *R. irregularis* en plántulas de cacao a los 0 y 42 días después de inoculación (ddi) de *P. palmivora*. .... 117

FIGURA 3. Altura de plántulas de cacao (cm) bajo el efecto de inoculación (ddi) de *R. irregularis*. .... 118

FIGURA 4. Diámetro de tallos de plántulas de cacao (mm) bajo el efecto de inoculación (ddi) de *R. irregularis*. .... 119

FIGURA 5. Peso seco de plántulas de cacao (g) bajo el efecto de inoculación (ddi) de *R. irregularis*. .... 119

# Índice de tablas

## Capítulo I: Caracterización de hongos micorrízicos arbusculares presentes en la rizósfera de plantas de cacao (*Theobroma cacao* L.) en El Yopal (Casanare), Colombia

TABLA 1. Análisis de varianza para el modelo logístico (Loglineal) de independencia. Variables evaluadas en el análisis de relación correspondieron a morfotipos asociados a géneros de HFMA y clones de cacao.....	19
---	----

## Capítulo II: Análisis espacial de la incidencia de enfermedades en diferentes genotipos de cacao (*Theobroma cacao* L.) en El Yopal (Casanare), Colombia

TABLA 1. Parámetros estructurales de semivariogramas ajustados (Modelo, Rango, Umbral) y estadístico de dependencia espacial (SDDI) de incidencia de PNF para 13 semanas de monitoreo. ....	40
TABLA 2. Valores estimados <i>p value</i> por <i>Índice de moran</i> en la determinación de autocorrelación espacial para 13 semanas de monitoreo. ....	44

## Capítulo III: Impacto de la simbiosis de *Rhizophagus irregularis* con plántulas de cacao en la incidencia y severidad del tizón de plántulas

TABLA 1. Tratamientos experimentales para prueba de inoculación <i>P. palmivora</i> .....	60
TABLA 2. Tratamientos experimentales para evaluación del impacto de la simbiosis de <i>R. irregularis</i> y plántulas de cacao sobre el tizón de plántulas. ....	61
TABLA 3. Caracterización macroscópica de la cepa C9 de <i>P. palmivora</i> (CENIPALMA). Valores medios para 20 réplicas (platos) del aislamiento +/- error estándar de la media.....	62
TABLA 4. Caracterización microscópica de la cepa C9 de <i>P. palmivora</i> (CENIPALMA). Valores medios para 10 réplicas (platos) del aislamiento +/- error estándar de la media. ....	62
TABLA 5.1. Criterio de test MANOVA y estadísticos F exactos para la hipótesis de efecto no Response. ....	78
TABLA 5.2. Criterio de test MANOVA y aproximaciones para la hipótesis de efecto no Response*Treatment.....	78
TABLA 5.3. Criterio de test MANOVA y estadísticos F exactos para la hipótesis de efecto no Response*Time.....	78
TABLA 5.4. Criterio de test MANOVA y aproximaciones para la hipótesis de efecto no Respuesta*Tiempo*Tratamiento. ....	79
TABLA 5.5. Análisis de medidas repetidas de la varianza. Tests de hipótesis para efectos Between Subjects.....	79
TABLA 5.6. Criterio de test MANOVA y estadísticos F exactos para la hipótesis de efecto no Response.....	79
TABLA 5.7. Criterio de test MANOVA y aproximaciones para la hipótesis de efecto no Respuesta*Tratamiento.....	80
TABLA 5.8. Criterio de test MANOVA y estadísticos F exactos para la hipótesis de efecto no Respuesta*Tiempo.....	80
TABLA 5.9. Criterio de test MANOVA y aproximaciones para la hipótesis de efecto no Respuesta*Tiempo*Tratamiento.....	80
TABLA 5.10. Análisis de medidas repetidas de la varianza. Tests de hipótesis para efectos Between Subjects.....	81

## Capítulo V: Colonización de *Rhizophagus irregularis* e impacto de la simbiosis en parámetros de crecimiento de plántulas de cacao

TABLA 1. Tratamientos experimentales para evaluación del impacto de la simbiosis de <i>R. irregularis</i> sobre el tizón de plántulas en plántulas de cacao. ....	115
TABLA 2. Parámetros de crecimiento de plántulas de cacao bajo los tratamientos experimentales.....	118

# Índice de Anexos

## Capítulo I: Caracterización de hongos micorrízicos arbusculares presentes en la rizósfera de plantas de cacao (*Theobroma cacao* L.) en El Yopal (Casanare), Colombia

ANEXO 1. Toma de muestras de suelo rizosférico en cultivo de cacao compuesto por tres clones genéticos. ....	25
ANEXO 2. Resultados análisis físico-químico de suelo proveniente de un cultivo de cacao compuesto por tres clones genéticos.....	25
ANEXO 3. Cultivo trampa experimental de cebolla ( <i>Allium cepa</i> ). ....	26
ANEXO 4. Procedimiento de aislamiento de esporas en laboratorio. ....	26
ANEXO 5. Análisis estadísticos. ....	27

## Capítulo II: Análisis espacial de la incidencia de enfermedades en diferentes genotipos de cacao (*Theobroma cacao* L.) en El Yopal (Casanare), Colombia

ANEXO 1. Lote experimental del cultivo productivo de cacao monitoreado en campo.....	49
--	----

## Capítulo III: Impacto de la simbiosis de *Rhizophagus irregularis* con plántulas de cacao en la incidencia y severidad del tizón de plántulas

ANEXO 1. Procedimiento para la propagación y multiplicación <i>in vitro</i> de <i>P. palmivora</i> .....	75
ANEXO 2. Procedimiento para la activación de virulencia de <i>P. palmivora</i> . ....	76
ANEXO 3. Manejo agronómico de plántulas de cacao en vivero.....	77
ANEXO 4. Estadística experimento I: Prueba de inoculación de <i>P. palmivora</i> en plántulas de cacao.....	78
ANEXO 5. Estadística experimento II: efecto de la simbiosis de HFMA con plántulas de cacao sobre el tizón o muerte regresiva de plántulas.....	79
ANEXO 6. Material fotográfico experimental.....	81

## Capítulo IV: Efecto de *Rhizophagus irregularis* sobre la actividad guayacol peroxidasa (GPX) y deposición de calosa en plántulas de cacao inoculadas con *Phytophthora palmivora*

ANEXO 1. Protocolo de estimación de la actividad peroxidasa en tejidos de plántulas de cacao.....	102
ANEXO 2. Protocolo de estimación de depósitos de calosa en tejidos de plántulas de cacao. ....	103
ANEXO 3. Determinación de concentración de calosa en las raíces de las plántulas.....	103

## Abreviaciones

<b>AUDPS</b>	Área bajo la curva de progreso de la enfermedad
<b>dds</b>	Días después de siembra
<b>ddi</b>	Días después de inoculación
<b>gr</b>	Gramos
<b>HFMA</b>	Hongos Formadores de Micorrizas Arbúsculares
<b>ISR</b>	Resistencia sistémica inducida
<b>MS</b>	Moniliasis
<b>PNF</b>	Pudrición Negra del Fruto

# Introducción

En Colombia, el cultivo del cacao representa una actividad productiva importante en el presente y futuro de las zonas rurales. Tiene una participación aproximada de 30.000 mil familias cacaoteras y se proyecta como una apuesta productiva clave en el posconflicto del país (FEDECACAO, 2011). En la Orinoquía Colombiana por ejemplo, se contempla convertir al cultivo de cacao en la principal fuente de ingresos de los productores agrícolas, con el mayor acompañamiento institucional, una vez cese la producción de petróleo y su economía en la región (Garzón, 2013). La productividad actual en Colombia no es competitiva a nivel global, ni regional, esto a pesar de ser insuficiente la oferta mundial ante una demanda en aumento. Según reportes en AGRONET, existen en el país aproximadamente unas 160 mil hectáreas de cacao tradicionales, el 50 % produce menos de 300 kilos por hectárea, y las otras 80 mil que han sido sembradas en la última década, aunque más productivas, tampoco llegan siquiera a una tonelada por hectárea.

Sumado a lo anterior, las pérdidas anuales mundiales para la industria del cacao se estiman en alrededor de 450.000 toneladas, valoradas en más de 1.000 millones de dólares, causadas por *Phytophthora* spp. (Drent y Guest, 2013). Varias enfermedades causadas por *Phytophthora* son de difícil control, esto determina que la prevención de la enfermedad sea un componente importante dentro de las diferentes estrategias de manejo (Drenth *et al.* 2006). Así mismo, este agente puede desarrollar infección en múltiples partes de la planta, lo que hace que la detección de la resistencia a las enfermedades sea un reto enorme (Drent y Guest, 2013). En estado de plántula, el cacao presenta susceptibilidad al tizón provocado por *Phytophthora* spp. en viveros (Drenth y Guest, 2004; Tchameni *et al.*, 2011; ICA, 2013; CABI, 2016). En plantas adultas en campo, varias especies de *Phytophthora* afectan el fruto principalmente causando la enfermedad “Pudrición Negra del Fruto” (PNF) (Drent y Guest, 2013; Ramírez *et al.*, 2016).

Por lo anterior, es prioritario profundizar desde las interacciones que surgen en el patosistema plantas de cacao - *Phytophthora* sp. para contemplar y generar estrategias de manejo efectivas e innovadoras. Por esto, en el marco del programa

“Análisis de tecnologías novedosas para el cultivo del cacao en el departamento de Casanare - Colombia”, “Innovación, ciencia y tecnología” de COLCIENCIAS, se sigue que los Hongos Formadores de Micorrizas Arbusculares (HFMA) son una innovación *per se*, que puede aportar elementos que otorgan resistencia a *Phytophthora palmivora* Butler en plántulas de cacao. Para esto, se propone el uso del hongo FMA *Rizhophagus irregularis* como opción para explorar la resistencia inducida en plántulas de cacao debido a la amplia e importante disponibilidad de su información biológica, su impacto significativo en sistemas agrícolas a nivel de invernadero y campo en varios estudios, y su importante característica generalista al pertenecer a un género ubicuo, presente en la zona de estudio también.

En este trabajo se combina la identificación de información base referida a los hongos simbiotes HFMA asociados a plantas de cacao adultas en un sistema productivo en la zona de estudio. En el mismo cultivo comercial se analiza la dinámica espacial de enfermedades co-ocurrentes en la zona como información epidemiológica base y como aproximación a entender el papel del mejoramiento genético en el manejo de enfermedades en cacao. En la misma especie de cultivo se estudia el efecto de la inoculación de *R. irregularis* en etapa de vivero, sobre el patosistema plántulas de cacao - *P. palmivora* a nivel fisiológico y morfológico. Todo esto con el fin de tener una aproximación holística sobre el papel de tecnologías novedosas como el uso de HFMA en el manejo de una enfermedad limitante, en un cultivo de enorme importancia para el país como el cacao.

## Objetivo general

Evaluar el efecto de la simbiosis de *Rhizophagus irregularis* con plántulas de cacao (*Theobroma cacao* L.) en el tizón de plántulas (*Phytophthora palmivora*) en El Yopal, (Casanare)

## Objetivos específicos

Caracterizar hongos micorrízicos arbusculares, a nivel de género, en la rizósfera de plantas adultas de cacao en un cultivo de Yopal, Casanare.

Evaluar el impacto de la simbiosis de *R. irregularis* con plántulas de cacao en la incidencia y severidad del tizón de plántulas.

Estimar la actividad peroxidasa (GPX) y de depósitos de calosa en los tejidos de plántulas de cacao inoculadas con *R. irregularis* bajo la presencia de *P. palmivora*.

## 1. Marco teórico

### 1.1 *Phytophthora* en plántulas de cacao en fase de vivero

Especies de *Phytophthora* causan la enfermedad “marchitez o tizón de plántulas” de cacao en fase de vivero (Anderson y Guest, 1990; Bowers *et al.*, 2001; McMahon y Purwantara, 2004; Richards *et al.*, 2011; Tchameni *et al.*, 2011; Prabha y ChandraMohanán, 2014; Rodríguez y Vera, 2015; Sriwati *et al.*, 2015). Prabha y ChandraMohanán (2014) afirman que la enfermedad causada por *P. palmivora* específicamente, es la principal restricción en la producción de plántulas de cacao en todas las áreas con altas precipitaciones (>2000 mm/año) y humedad relativa (60-80%). Bajo estas condiciones, los propágulos de infección son dispersados fácilmente por el salpique de agua lluvia y el agua de escorrentía que se mueve sobre la superficie del suelo (Bowers y Baily, 2001; McMahon y Purwantara, 2004). En India, la infección del tizón causa una alta mortalidad en plántulas de cacao y es el mayor problema en todos los viveros durante la temporada de lluvias (Prabha y ChandraMohanán, 2014). En Colombia, la enfermedad se presenta en zonas cacaoteras del país y ha sido caracterizada como un problema fitosanitario frecuente en viveros productivos (ICA, 2012).

La infección en raíces, tallos y hojas puede ser causada por esporangios, que germinan para producir zoosporas móviles infectivas también (Bowers y Baily, 2001; McMahon y Purwantara, 2004). Estas últimas, como se mencionó, se dispersan a través del suelo y agua de escorrentía o por contacto hoja a hoja entre plántulas. Se ha reportado que las zoosporas son atraídas por exudados de las raíces y heridas de las plantas (Richards *et al.*, 2011; Tchameni *et al.*, 2012).

El manejo convencional del “tizón o marchitez de plántulas” de cacao en vivero, se basa en el uso de productos fungicidas de síntesis química, exclusión de plántulas sintomáticas y medidas preventivas como la ventilación y establecimiento de buen drenaje en los viveros (Richards *et al.*, 2011). Por otra parte, la resistencia genética es

de difícil implementación por el tiempo prolongado y los altos costos que implica el desarrollo de nuevos materiales de cacao (Luz y Silva, 2001). Por esto, nuevas opciones para su manejo son requeridas debido a que las aplicaciones de fungicidas impactan ambientalmente y, junto a la pérdida de plántulas por exclusión, implican pérdidas económicas a los agricultores.

## **1.2 *Phytophthora* en plantas de cacao en fase de campo**

Especies de *Phytophthora* causan la PNF en plantas adultas de cacao en campo (Drent y Guest, 2013; Ramírez *et al.*, 2016). Ocho de estas especies se han aislado en frutos, con las mayores pérdidas en producción mundial causadas por *P. palmivora*, *P. megakarya* y *P. citrophthora* (McMahon y Purwantara, 2004). En Antioquia (Colombia), Ramírez (2016) reporta a *P. palmivora* y otra especie de *Phytophthora* sp. no identificada con incidencias en frutos de cacao de 92 y 7,5 % respectivamente, en zona de vida de bosque húmedo tropical. La dispersión de esta enfermedad y el desarrollo de la epidemia ocurre al salpicar agua lluvia sobre los esporangios, encontrados en el suelo o en plantas infectadas, y por insectos vectores (McMahon y Purwantara, 2004).

La expresión y dispersión de epidemias en campo causadas por *Phytophthora* depende también de las características intrínsecas de susceptibilidad del hospedante (Cárdenas *et al.*, 2017). Así, en plantaciones de cacao en Colombia, se ha reportado al clon ICS95 y CCN51 como susceptible y altamente susceptible a *Phytophthora* spp. respectivamente, donde el uso de este último clon se incrementa cada vez más en el establecimiento de nuevas plantaciones a nivel nacional (Rodríguez y Vera 2015).

## **1.3 Funcionalidad de HFMA en la protección de plantas contra patógenos**

Los HFMA por su parte, hacen parte de la comunidad microbiana del suelo y se asocian con las raíces de aproximadamente el 80 % de las plantas terrestres (Smith y Read, 2008). Dentro de los principales efectos observados en plantas asociadas a HFMA, se encuentra el aumento de la eficiencia en la absorción de nutrientes y el

incremento en la producción de biomasa (Van der Heijden *et al.*, 1998; Roger *et al.*, 2004; Herre *et al.*, 2005; Tchameni *et al.*, 2011). También, interacciones entre HFMA y patógenos se han identificado como relevantes por su importante efecto en la protección de la planta hospedante (Bever, 2003; Pozo y Azcón-Aguilar, 2007; Wehner *et al.* 2009), y varios estudios sugieren que diferentes taxas de HFMA inducen defensa en plantas contra patógenos (Pozo y Azcón-Aguilar, 2007; Martínez-Medina, 2011; Plenchette *et al.*, 2005 citado por Tchameni *et al.*, 2011). Así, los HFMA se constituyen en un grupo de hongos simbiosomas promisorios que pueden conferir resistencia a enfermedades en plantas (Yedidia *et al.*, 2000; Plenchette *et al.*, 2005; Pozo y Azcón-Aguilar, 2007).

En varias especies vegetales de uso agrícola inoculadas con HFMA, se ha reportado la reducción de incidencia y severidad por hongos patógenos de los géneros *Fusarium* en tomate, pimienta y berenjena (Al-Hmoud y Al-Momany, 2015), *Pythium* en plántulas de papaya (Olawuyi *et al.*, 2013), *Rhizoctonia* en plántulas de tomate (Amer y Abou, 2008) y papa (Yao *et al.*, 2002), *Verticillium* en algodón (Norouzi *et al.*, 2009), *Thielaviopsis* en plantas ornamentales (Soukayna, 2012), *Gaeumannomyces* en trigo (Khaosaad *et al.*, 2007), control de algunos nemátodos parásitos en plantas de banano (Elsen *et al.*, 2008), *Phytophthora* en plántulas de pimienta (Ozgonen y Erkilic, 2007), tomate (Vigo *et al.*, 2000, Pozo *et al.*, 2002; Zhu y Yao, 2004), fresa (Nikhat *et al.*, 2004; Norman y Hooker, 2000) y plántulas de cacao (Tchameni *et al.*, 2012) entre otros.

La reducción de “tizón o marchitez de plántulas” en cacao por el uso de hongos benéficos se ha reportado recientemente. Sriwati *et al.* (2015) evidenciaron una reducción de hasta un 59% de la infección por *Phytophthora palmivora* en plántulas de cacao inoculadas con el antagonista *Trichoderma virens*. Tchameni *et al.* (2012) por su parte, reportaron una reducción significativa de *Phytophthora megakarya* en plántulas de cacao que presentaron una alta síntesis de aminoácidos y compuestos fenólicos bajo el efecto de la inoculación separada de *Trichoderma asperellum* y dos especies de HFMA: *Gigaspora margarita* y *Acaulospora tuberculata*. Otras evidencias en la reducción de enfermedades agrícolas empleando HFMA han sido ampliamente reportadas (Whipps, 2004; Pozo *et al.*, 2009; Pozo *et al.*, 2011; Gallou *et al.*, 2011).

Frente a las enfermedades, casi todas las partes de la planta son influenciadas por la

simbiosis de HFMA pero no de la misma manera (Dugassa *et al.*, 1996; Pozo *et al.*, 2004). Estos hongos, inducen modificaciones en la composición del exudado de raíces provocando la inhibición de patógenos (Norman y Hooker, 2000). Pueden incrementar la actividad de fitoalexinas (Morandi, 1996; Yao *et al.*, 2003), aumentar la cantidad de auxinas y giberelinas en hojas y de etileno en raíces, así como, alterar el contenido y composición de esteroides libres en hojas (Dugassa *et al.*, 1996; Zamioudis y Pieterse, 2012; Pozo *et al.*, 2015).

De igual forma, se mencionan mecanismos en diferentes niveles mediante los cuales se ha dado explicación al efecto de reducción de patógenos por HFMA en plantas. Mecanismos como competencia (por sitios de colonización o fotosintatos), donde la relación biotrófica obligada de los HFMA en la corteza de la raíz sugiere que estos hongos interactúan directamente con patógenos que tienen requerimientos tróficos similares (Cordier *et al.*, 1998; Graham, 2001) o, activación de los mecanismos propios de defensa sistémica y localizada del hospedero (Cordier *et al.*, 1998; Dugassa *et al.*, 1996; Pozo *et al.*, 2002; Nikhat *et al.*, 2004; Whipps, 2004; Lioussane *et al.*, 2008; Pozo *et al.*, 2009; Gallou *et al.*, 2011).

Respecto a este último mecanismo, las respuestas de defensa tempranas son de carácter rápido y transitorio a nivel de la superficie de la célula y son basadas en la activación de componentes preexistentes más que en la implicación de maquinaria biosintética de la célula. Las respuestas de defensa inducidas o resistencia sistémica inducida (ISR) por su parte, es el resultante de un mecanismo de señalización a larga distancia que deriva en respuestas como síntesis de calosa y/o actividad de peroxidasas por ejemplo, como respuesta de las plantas a estrés biótico (Quiroga *et al.*, 2000; Sasaki *et al.*, 2004).

McInnis *et al.* (2006) reportan la participación de peroxidasas en la respuesta al estrés oxidativo, en el metabolismo de auxinas, en la suberización, polimerización y lignificación (Quiroga *et al.*, 2000) de los constituyentes de la pared celular, en la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Bakalovic *et al.*, 2006; Wojtaszek, 1997) y defensa en general contra el ataque por patógenos (Bakalovic *et al.*, 2006; Caruso *et al.* 2001; Kawano, 2003). Se considera que las peroxidasas excretadas extracelularmente catalizan la generación de ROS, acoplado a la oxidación de la hormona ácido indol-3-acético (IAA) y componentes relacionados con defensa

como ácido salicílico (SA) y quitooligosacáridos (COSs) en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Kawano, 2003).

Varios estudios han mostrado que ROS como H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, pueden actuar como moléculas señal para la inducción de respuestas de defensa en plantas cuando son producidas moderadamente. Múltiples roles de ROS confirmados a la fecha han sido reportados: i) activación de la resistencia sistémica adquirida (SAR) asociada con propagación sistémica de la explosión oxidativa, ii) inducción de vías de señalización celular tales como síntesis y liberación de SA y activación de cascada de proteínas MAPK, iii) fortalecimiento de la pared celular a través de glicoproteínas y iv) acciones microbicidas directas (Chen *et al.*, 1993). Sin embargo, la comprensión de la función peroxidasa en las plantas ha sido compleja debido a su amplio rango de preferencias de sustrato y la falta de especificidad de tejido (McInnis *et al.*, 2006; Sasaki *et al.*, 2004).

Por su parte, aunque la deposición de calosa es una respuesta de defensa inducida casi ubicua de la planta al ataque de patógenos, su importancia sigue siendo controversial debido a que las papilas fueron descubiertas en las paredes celulares en los sitios de penetración del patógeno por deBary (1863) y, Mangin (1895) por su parte, reportó que la calosa ocurría comúnmente en las papilas. Desde entonces, la calosa ha sido identificada como el constituyente más común en papilas, que puede incluir también proteínas, constituyentes fenólicos y otros (Voigt y Somerville, 2009).

La eficacia de HFMA contra un rango diverso de patógenos, en diferentes hospederos agrícolas, infiere un amplio espectro de resistencia conferida en las plantas por la simbiosis (Pozo *et al.* 2009). Así, en plantas micorrizadas, se ha observado un incremento de resistencia a patógenos con estilo de vida necrótrofo como *Fusarium* sp. y/o hemibiótrofo como *Phytophthora* sp. (Gernns *et al.*, 2001; Whipps 2004). Aunque existen tendencias generales sobre resistencia inducida por HFMA en diferentes patosistemas a partir de múltiples estudios, se ha señalado que la habilidad de estos hongos para mejorar defensa en plantas difiere entre aislamientos y puede ser modulada por condiciones ambientales (Whipps, 2004; Walder *et al.*, 2012). Existe también una “diversidad funcional” intra-específica (entre aislamientos) e inter-específica (entre especies), que opera según genotipos de HFMA y sus hospederos, en los beneficios de la simbiosis establecida (Munkvold *et al.*, 2004; Feddermann *et*

*al.*, 2010; Mensah, 2015, Koch *et al.*, 2017). Al respecto, Rodríguez y Sanders (2015) reportan la diversidad genética intra-específica de estos hongos como más importante que la diversidad inter-específica.

#### **1.4 *Rhizophagus irregularis* como HFMA modelo en estudios de interacción simbiótica con plantas de cultivo**

*Rhizophagus irregularis* es una de las especies de HFMA más estudiadas, empleada como organismo modelo de análisis en investigación agrícola e inoculantes comerciales. Pertenece al filo Glomeromycota y se caracteriza por su crecimiento rápido y significativo de su micelio (Maherali y Klironomos, 2007), así como también por su abundancia y naturaleza ubicua en ecosistemas y agroecosistemas alrededor del mundo (Öpik *et al.*, 2006; Oehl *et al.*, 2010).

Es la única especie con información disponible de su genoma secuenciado (Tisserant *et al.*, 2013), coloniza de manera eficiente las raíces de la mayoría de las plantas (Jansa *et al.*, 2008; Pellegrino *et al.*, 2011), es resiliente a prácticas de manejo agronómico (Oehl *et al.*, 2010) y su crecimiento es posible usando cultivo *in vitro* en condiciones monoxénicas (Declerck *et al.*, 2005). Esto ha permitido lograr recientemente un sistema biotecnológico eficiente de producción masiva de inóculo de *R. irregularis* para emplear en cultivos agrícolas, que concentra gran número de propágulos de este hongo FMA en un volumen pequeño de medio estéril, donde se ha demostrado que su uso es eficiente y se establece exitosamente en las raíces de las plantas inoculadas (Alkan *et al.*, 2006; Janoušková *et al.*, 2013; Köhl *et al.*, 2016) así como en suelos ácidos del trópico colombiano (Ceballos *et al.*, 2013). El producto comercial obtenido denominado Glomygel® (<http://www.mycovitro.com>), empleado previamente en la zona de estudio (Ceballos *et al.*, 2013) y en este trabajo, fue producido en condiciones de laboratorio usando técnicas de cultivo *in-vitro*.

El efecto de la simbiosis de *R. irregularis* con plantas cultivadas ha sido analizado en estudios experimentales de crecimiento y producción a nivel de invernadero y de campo. Angelard *et al.* (2010) demostraron que este hongo FMA provoca efectos en el crecimiento y la transcripción de genes específicos de la simbiosis en plantas de arroz en invernadero. A nivel de campo, Ceballos *et al.* (2016) por su parte demostraron que *R. irregularis* generó diferencias significativas en el aumento de la producción de yuca en suelos ácidos de Colombia dónde se llevó a cabo este estudio.

Sin embargo, aunque *R. irregularis* es comúnmente usado en investigaciones científicas por sus características mencionadas, sus efectos en interacciones con patógenos en sistemas de cultivo han sido poco analizados en comparación con estudios acerca de su influencia en la nutrición y crecimiento de plantas de cultivo. En el sistema productivo de cacao específicamente, a nivel de invernadero y campo, no existen hasta ahora estudios de interacción con esta especie de hongo FMA modelo y patógenos tan agresivos como *Phytophthora* spp.

Evaluar el efecto de *R. irregularis* sobre *Phytophthora palmivora* en plántulas de cacao, midiendo indicadores de defensa inducidos importantes como la actividad guayacol peroxidasa y la deposición de calosa, se constituye en un primer acercamiento de análisis experimental para establecer información base respecto al impacto que puede tener esta tecnología novedosa sobre enfermedades agrícolas en este sistema productivo. Además, aún es mínima la información sobre los mecanismos que operan en la respuesta de defensa inducida por estos hongos mutualistas en el patosistema plántulas de cacao – *Phytophthora palmivora* y, sobre el impacto que puede generarse estableciendo simbiosis en plántulas de cacao con *R. irregularis*.

Por lo anterior, en este estudio se planteó una hipótesis nula y una alterna respecto a los posibles efectos de la simbiosis de *R. irregularis* – plántulas de cacao sobre *P. palmivora*:

Hipótesis nula: La simbiosis establecida entre *R. irregularis* y plántulas de cacao no afecta el desarrollo de la enfermedad causada por *P. palmivora*.

Hipótesis alterna: El desarrollo de la enfermedad causada por *P. palmivora* en plántulas de cacao, se ve afectada por la simbiosis establecida entre las plántulas y el hongo FMA *R. irregularis*.

# Capítulo I

## 2. Caracterización de hongos micorrízicos arbusculares presentes en la rizósfera de plantas de cacao (*Theobroma cacao* L.) en El Yopal (Casanare), Colombia

Palabras clave: hongos formadores de micorrizas arbusculares, morfotipos, esporas, cacao, Orinoquía.

### 2.1 Introducción

Los factores que influyen en la distribución de HFMA (micelio externo y esporas) son diversos. Entre ellos, puede mencionarse la especie vegetal predominante, el pH, la conductividad y la humedad del suelo (Oehl *et al.*, 2010), el contenido de fósforo, nutrientes y de metales pesados (Posada *et al.*, 2012) en él. Además, la abundancia y composición específica de la comunidad de HFMA depende fuertemente del tipo de suelo y su uso intensivo (Oehl *et al.*, 2010).

En la Orinoquía Colombiana solo el 8,3% de los suelos son aptos para la agricultura comercial (Riveros, 2003). Esto debido a que, en su mayoría, se caracterizan como suelos extremadamente ácidos que dificultan la disponibilidad de algunos elementos nutrientes y limitan el desarrollo y productividad de las plantas de cultivo (Koyama *et al.*, 1995). Condición que lleva a la utilización de grandes cantidades de fertilizantes y correctivos de síntesis química que influyen directamente en la biología de los suelos (Corpes Orinoquía, 2004). Dentro de los recursos bióticos del suelo, los microorganismos cumplen un papel muy importante en los sistemas productivos agrícolas debido a su intervención en procesos de descomposición de la materia

orgánica, mineralización y reciclaje de nutrientes, así como facilitar su disponibilidad para las plantas (Rojas, 2010).

De acuerdo a lo anterior, se ha reportado ampliamente que los HFMA proporcionan efectos benéficos como: 1) aumento en la capacidad de absorción de las raíces y estimulación del crecimiento vegetal 2) aumento en la movilización y transferencia de elementos (P, N, S, Cu, Zn) del suelo a la planta, 3) mejor desarrollo de microorganismos solubilizadores de P en la micorrizósfera (Ordoñez *et al.*, 2016), interactuando con otros microorganismos del suelo e incrementando la fijación del nitrógeno, aunque por sí solos no sean capaces de hacerlo (Pérez *et al.*, 2011), 4) mejoramiento en la eficiencia del uso del agua (Augé, 2001), 5) incremento de tolerancia a estrés (Feng *et al.*, 2002) y 6) contribuyen a la defensa en plantas contra distintos microorganismos fitopatógenos en múltiples hospedantes (Wehner *et al.*, 2010; Cano, 2011; Lewandowski *et al.*, 2013).

Estos efectos benéficos, sin embargo, pueden ser altamente variables entre géneros de HFMA, aislados dentro de una misma especie de hongo FMA y entre plantas hospedantes (Koch *et al.*, 2017). La magnitud y dirección de la interacción simbiótica también es altamente variable dentro de taxas de HFMA y entre plantas hospedantes (Antunes *et al.*, 2011), lo que explica por ejemplo, que especies de *Gigaspora* muestren mayor crecimiento extraradical mientras que especies de *Glomus* un mayor crecimiento a nivel intraradical (Koch *et al.*, 2017). Además, las diferentes condiciones ambientales en las que se realizan diversos estudios del beneficio y costo de la simbiosis, dificultan las comparaciones entre ellos. Esta aparente impredecible variación entre taxas, se ha constituido en un gran reto en el estudio de hongos FMA y sus efectos sobre plantas hospederas. En este contexto, el trabajo inicial en los estudios de interacción simbiótica con plantas de cultivo, debe centrarse en el reconocimiento de los HFMA presentes en el sistema productivo local de interés.

En cultivos de cacao (*Theobroma cacao* L.) de la Orinoquía Colombiana, los inventarios de HFMA son escasos y el conocimiento de la diversidad de estos hongos es limitado. No obstante, trabajos de caracterización morfológica y molecular importantes como el realizado por Ordoñez *et al.* (2016), han contribuido al conocimiento de HFMA de la zona de este estudio a partir del sistema productivo de

yuca (*Manihot esculenta*). Aún así, en el país es poca o nula la investigación sobre estos hongos asociados a sistemas agrícolas como el cacao, teniendo en cuenta que esta es una especie altamente dependiente de HFMA (Miyakasa y Habte, 2001; Suparno *et al.*, 2015) en suelos poco fértiles como los de la Orinoquia Colombiana (Corpes Orinoquia, 2004). Además, es un sistema productivo considerado como promisorio y rentable con mayor potencial de crecimiento en la región (Garzón, 2013; ICA, 2013).

La identificación básica de HFMA se basa en el estudio de la morfología y estructura de sus esporas como el empleado aquí. Sin embargo, técnicas moleculares para el análisis taxonómico han contribuido a una clasificación más precisa (Schüßler *et al.*, 2001) y en algunos casos, a la reclasificación de algunas especies como el hongo FMA utilizado en este estudio, *Rhizophagus irregularis*, antes denominado *Glomus intraradices*.

Por todo lo anterior, el presente trabajo tuvo como objetivo caracterizar HFMA asociados a tres clones de cacao sembrados intercaladamente en un cultivo productivo en El Yopal (Casanare), Colombia.

## 2.2 Materiales y métodos

### 2.2.1 Lugar de estudio

Las muestras de suelo rizosférico fueron colectadas en un cultivo de cacao ubicado en la finca "Mate Pantano" de la Universidad de La Salle, en zona rural del municipio de El Yopal (Casanare). La temperatura y precipitación promedio en la zona correspondió a 26°C y 2000 mm respectivamente, con coordenadas geográficas de 5°19'31"N y 72°17'48" W. El cultivo estuvo compuesto por tres clones genéticos (CCN51, ICS95 y FSA12) como copa, de cuatro años de edad, con características definidas de resistencia a *Phytophthora* spp. (Cárdenas *et al.*, 2017). Plantas del clon CCN51 son reportadas como susceptibles a especies del patógeno (Arciniegas y Phillips, 2006; Cárdenas *et al.*, 2007) y del clon ICS95 como resistentes (Arciniegas y Phillips, 2006; Cárdenas *et al.*, 2007). Estas fueron establecidas intercaladamente en el lote, cada dos surcos por clon (Anexo 1 Cap. II), a una distancia de 3 x 3 metros entre plantas. El

material genético patrón para todos los árboles muestreados en su rizósfera correspondió al clon IMC67, producido ampliamente en viveros y analizado en este estudio (ver Cap. III, IV e información suplementaria).

El procesamiento de las muestras, los diferentes procedimientos y análisis de laboratorio se realizaron en las instalaciones del laboratorio de Micorrizas, el laboratorio de Microbiología y un invernadero de campo ubicados en el departamento de Biología en la Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá.

### **2.2.2 Toma de muestras**

El muestreo se realizó en mayo de 2016, época de altas y frecuentes precipitaciones en la zona de estudio. Se colectaron muestras de suelo rizosférico de las plantas de cacao en los tres clones. 24 muestras fueron colectadas en total en un área correspondiente a 1.5 ha, equivalente a ocho muestras por cada clon presente en el lote. Las plantas se seleccionaron aleatoriamente teniendo en cuenta una distancia mínima de 50 metros entre puntos de muestreo. Cada muestra se tomó a una profundidad entre 10 y 30 cm, en el punto de proyección de la copa de la planta sobre la superficie del suelo (Anexo 1), en las direcciones norte, sur, este y oeste respectivamente. Se colectó aproximadamente, 1 Kg de muestra entre suelo y raíces en cada planta. Posteriormente las muestras se almacenaron a 4°C hasta su procesamiento.

La toma de muestras para el análisis físico-químico de suelo se realizó tomando 10 submuestras bajo un patrón de muestreo diagonal, conformando una muestra compuesta final para el análisis de laboratorio (USDA, 2014). Este análisis se realizó a través del laboratorio Agroanálisis S.A.S., el cuál comprendió: Textura por Bouyoucos; pH 1:1 en agua potenciométrico; Aluminio (acidez) extracción con Cloruro de Potasio 1N; Carbono orgánico digestión en vía húmeda (Walkley-Black); Nitrógeno total Kjeldahl modificado; Fósforo Bray II; Bases intercambiables Ca, Mg, K y Na absorción atómica; Capacidad de intercambio catiónico acetato de amonio 1N. Los resultados del análisis de suelo se relacionan en el Anexo 2.

### 2.2.3 Cultivos trampa

Se estableció un cultivo trampa en el invernadero del departamento de Biología de la Universidad Nacional de Colombia, con el fin de propagar y multiplicar esporas de HFMA presentes en las muestras de suelo rizosférico colectadas. Para esto, se emplearon plantas de cebolla bulbo (*Allium cepa*) como hospedantes de los HFMA, sembradas en macetas de 3 kg de capacidad. Cada maceta se ensambló usando una capa de sustrato específico como base, una capa intermedia de inóculo correspondiente a la muestra de campo de suelo rizosférico de cacao y una última capa superficial delgada del sustrato inicial, siendo esta última donde se sembraron las plántulas de cebolla, según la metodología utilizada por Sieverding (1991). El sustrato específico consistió de una mezcla suelo – arena en proporción 1:1, esterilizado previamente mediante autoclave durante cuatro ciclos con intermitencia de 24 horas. Se establecieron 24 macetas en total, compuestas por la mezcla descrita, para la siembra de las plantas trampa (Anexo 3).

### 2.2.4 Aislamiento de esporas

El aislamiento de esporas de HFMA se realizó mediante el método de tamizado y centrifugación con sacarosa propuesto por Genrderman y Nicolson (1963) con modificaciones del INVAM (2014), descrito en el protocolo del Anexo 4. Así, se colectó y pesó 10 g de muestra de suelo rizosférico por cada maceta proveniente del cultivo trampa. Las muestras se licuaron con agua destilada por 15 segundos a máxima velocidad, vertiendo la solución sobre el juego de tamices de mayor a menor tamaño de poro (400, 250 y 30  $\mu\text{m}$ ). Se colectó la fracción obtenida del tamiz de menor tamaño (30  $\mu\text{m}$ ) en tubos Falcon de 50 ml y se adicionó solución Twen + sacarosa en el fondo del tubo con la ayuda de una jeringa y con movimientos circulares (Anexo 4). Se centrifugó a 3000 rpm durante 10 minutos y se vertió el sobrenadante sobre el tamiz más fino para luego lavar con abundante agua con el fin de retirar la sacarosa. Se puso lo colectado del tamiz correspondiente en un plato Petri con cuadrícula de 1  $\text{cm}^2$  para la posterior identificación preliminar y recuento de esporas obtenidas.

## 2.2.5 Identificación de esporas de morfotipos de HFMA

Esporas jóvenes de HFMA obtenidas a partir del cultivo trampa, se agruparon con base en características morfológicas generales de color y tamaño empleando microscopía. Para la identificación de géneros de HFMA se siguieron las metodologías propuestas por Schemck y Perez, (1990), el Catálogo ilustrado de Micorrizas Arbusculares de la Amazonia Colombiana (Peña *et al.*, 2006), Oehl *et al.* (2011), Blaszkowsky (2012) y las descripciones del International Culture Collection of Vesicular Arbuscular Mycorrhizal Fungi (INVAM, <http://invam.caf.wvu.edu>). Las características morfológicas específicas tomadas en cuenta fueron: tamaño (diámetro de la espora), forma, estructura citoplasmática, estructura superficial, número de paredes, tipo de hifa soporte y reacción de Melzer.

Las esporas de HFMA no representaron individuos sino unidades discretas que fueron asignadas a morfotipos y empleadas para cuantificar la composición y abundancia de la comunidad de HFMA presente (Smith y Read, 2008). Así, se cuantificó el número de morfotipos y la abundancia de cada morfotipo por muestra. Esporas de cada morfotipo se montaron en láminas portaobjetos utilizando el reactivo de Melzer y PVLG (Polyvinyl alcohol-lacto-glycerol) de acuerdo a Koske y Tessier (1983). Se adicionó 1 gota de cada reactivo por lámina, agregando 10 esporas de cada morfotipo a estas para observar en microscopio bajo un aumento de 400x y 1000x. El color de las esporas fue determinado utilizando la tabla de color para suelos de Munsell, tal y como se señala en la metodología para identificación morfológica de esporas de HFMA por Schemck y Pérez (1990).

## 2.2.6 Análisis estadístico

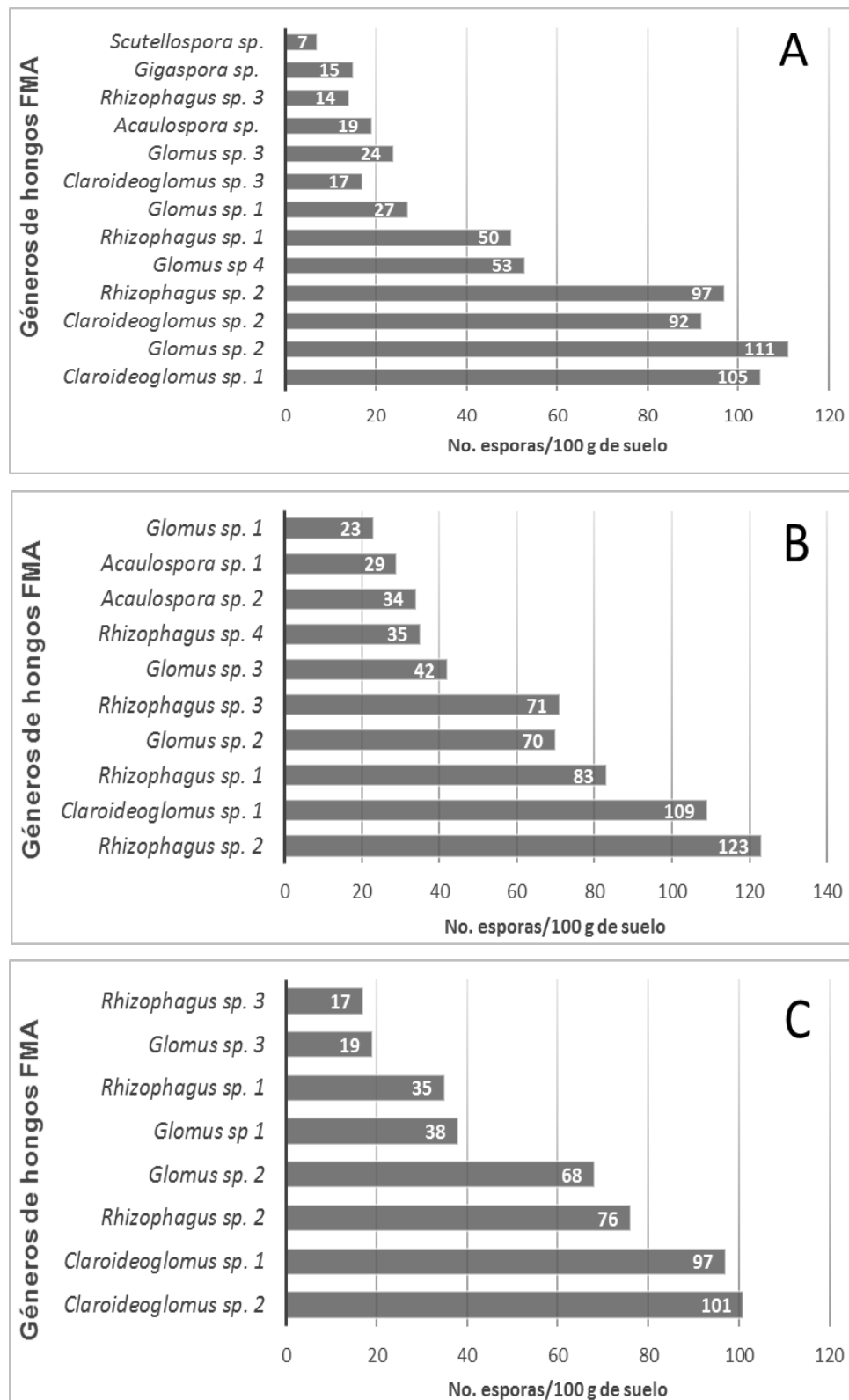
Se realizó el análisis a través de un modelo “Loglinear” para el procesamiento de datos categóricos. Esta metodología de análisis es apropiada cuando no hay una clara distinción entre variables explicatorias y variables respuesta, y cuando todas las variables son observadas simultáneamente, como en este caso. El modelo “Loglinear” trata todas las variables como variables respuesta y la atención se centra en la dependencia o independencia estadística entre ellas. Esta metodología de análisis de datos categóricos es análoga al análisis de correlación para variables respuesta de

distribución normal (Stokes *et al.*, 2000) y fue útil aquí en la evaluación de patrones de dependencia estadística entre los subconjuntos de variables géneros de HFMA asociados a los morfotipos identificados y los tres clones de cacao evaluados.

## 2.3 Resultados

El aislamiento de esporas a partir de cultivos trampa establecidos con muestras de suelo rizosférico procedentes de los clones de cacao, permitió identificar 16 morfotipos en total que fueron asignados a nivel de género. De esta forma, a partir de los morfotipos se asociaron seis géneros de HFMA en general: *Rhizophagus*, *Glomus*, *Claroideoglossum*, *Acaulospora*, *Gigaspora* y *Scutellospora*. Los morfotipos predominantes se asociaron a los géneros *Rhizophagus*, *Claroideoglossum* y *Glomus*, con la mayor proporción (frecuencia) de morfotipos de los géneros *Rhizophagus* y *Glomus*. La mayor densidad promedio de esporas encontradas en las muestras de suelo rizosférico de 100 g correspondió al género *Glomus* (Fig. 1).

En total, en este estudio se encontraron cuatro especies diferentes no identificadas de *Rhizophagus*, cuatro especies de *Glomus*, tres de *Claroideoglossum*, dos asociadas a *Acaulospora*, una a *Gigaspora* y una a *Scutellospora*. El número de esporas halladas en muestras de 100 g de suelo rizosférico no fue mayor a 123 para todos los morfotipos analizados en los tres clones. La mayor densidad de esporas correspondió a *Rhizophagus* sp. 2 en el clon FSA12, *Glomus* sp. 2 en el clon CCN51 y *Claroideoglossum* en el clon ICS95 con 123, 111 y 101 esporas/100 gr suelo respectivamente. Por su parte, la menor frecuencia y abundancia de esporas se encontró en los morfotipos asociados a los géneros *Acaulospora*, *Gigaspora* y *Scutellospora* con 34, 15 y siete esporas/100 g suelo respectivamente (Fig. 1).



**Figura 1.** Géneros de hongos FMA encontrados en muestras de suelo rizosférico de un cultivo de cacao compuesto por tres clones en producción en Yopal (Casanare), Colombia. A, clon CCN51. B, clon FSA12. C, clon ICS95. Los valores de Número de esporas en 100 g de suelo corresponden a valores promedio de todas las muestras analizadas.

El análisis de varianza realizado proporcionó evidencia respecto a que los morfotipos de esporas encontrados (asociados a los géneros identificados de HFMA) y los clones de cacao muestreados no son independientes ( $G^2 = 166.21$ , gl 5,  $p < 0.0001$ ) (Tabla 1), por lo tanto, existió una relación entre estas dos variables. Los morfotipos asociados a los géneros de hongos FMA *Scutellospora* sp. y *Gigaspora* sp. por ejemplo, se relacionaron con el clon CCN51 y otros morfotipos del género *Acaulospora* sp. 1 y sp. 2 al clon FSA 12, dónde se les encontró casi exclusivamente y en mayor proporción en estos clones (Fig. 1, A y B).

**Tabla 1.** Análisis de varianza para el modelo logístico (Loglineal) de independencia. Las variables evaluadas en el análisis de relación correspondieron a morfotipos asociados a géneros de HFMA encontrados y clones de cacao evaluados.

<b>Análisis de varianza de verosimilitud máxima</b>			
<b>Fuente</b>	<b>GL</b>	<b>Chi-cuadrado</b>	<b>Pr &gt; ChiSq</b>
<b>Género</b>	5	352.92	<.0001
<b>Clon</b>	2	18.64	<.0001
<b>Ratio de verosimilitud</b>	5	166.21	<.0001

Por su parte, las características químicas del suelo de la plantación de cacao bajo estudio, de acuerdo al análisis de laboratorio (Anexo 2), presentaron un pH caracterizado como “muy fuertemente ácido” de 4,4, niveles óptimos de fósforo con 46 ppm (por Bray II), aluminio con 3,0 m.e./100g y contenidos de 2,88% de materia orgánica considerados como “altos” (Horneck *et al.*, 2011). El suelo presentó textura franco-arcillosa, lo que pudo haber afectado la disponibilidad de fósforo debido a que las arcillas tienden a fijar o retener este elemento (Bussetti *et al.* 1999).

## 2.4 Discusión

Parte de nuestro entendimiento sobre el papel que juegan los hongos FMA se ha derivado de experimentos con plantas individuales bajo condiciones simplificadas controladas o semicontroladas (Brundrett y Abbott; 2002), donde se inocula un simbionte foráneo determinado. Este enfoque implica un análisis reducido ya que no se tienen en cuenta condiciones reales existentes de los sistemas agrícolas

productivos respecto a HFMA, como la diversidad de géneros y/o especies de hongos FMA asociadas a cultivos. Además, la relación simbiótica de HFMA con plantas cultivadas se ha estudiado más bajo el énfasis de los efectos que estos hongos generan en sus hospedantes comparado con el análisis de la potencial influencia que estos últimos pueden generar sobre los HFMA, sin considerar detalladamente a los hongos FMA implicados y asumiendo una igualdad funcional entre ellos (Rodríguez y Sanders, 2015).

Por lo anterior, en este trabajo se decidió realizar primero un estudio de campo sobre identificación de HFMA locales, a nivel de género, presentes en muestras de suelo rizosférico de un cultivo productivo policlonal de cacao en la zona de estudio. Esto como análisis base sobre la comunidad de HFMA asociados a cacao en El Yopal (Casanare), Colombia. Así, se pudo establecer información preliminar sobre los diferentes géneros encontrados a partir de las muestras analizadas (Fig. 1). Los resultados nos muestran que el cultivo muestreado, compuesto por tres materiales clonales, condicionó la abundancia y frecuencia de los hongos simbioses locales presentes. Es decir, el factor genético diferencial existente del hospedero tamizó de forma importante las comunidades de HFMA presentes. Además, el hecho de que el cultivo analizado se encontró establecido bajo las mismas condiciones agroclimáticas en las que se realizaron los experimentos posteriores en vivero, permitió conocer la ocurrencia y/o afinidad de simbiosis en cacao por hongos emparentados con *R. irregularis*, especie simbiote de interés inoculada en vivero en esta investigación.

La identidad del hongo FMA es determinante para entender un poco más la relación de simbiosis establecida entre estos hongos y comunidades de plantas de cultivo (Van Geel *et al.*, 2016). La importancia de conocer detalladamente esta relación de identidad entre los agentes implicados viene dada por la significancia e impacto de esta simbiosis en la productividad de cultivos (van der Heijden *et al.*, 2008; Van Geel *et al.*, 2016). Van Geel *et al.* (2016), haciendo un meta-análisis para evaluar el efecto de la identidad del cultivo, de la identidad del hongo FMA y de la diversidad micorrízica sobre el incremento de biomasa de cultivos, encontraron que combinaciones específicas de géneros de HFMA y familias de plantas hospederas determinadas fueron mas benéficas para la promoción del crecimiento vegetal comparado con otras combinaciones. Corroborando además que la selección de taxones específicos de

HFMA para cultivos específicos es el enfoque más promisorio para aumentar el crecimiento de los cultivos, lo cual ha sido discutido previamente por otros autores (Rodríguez y Sanders, 2015).

Así, *R. irregularis* por ejemplo (el hongo FMA utilizado en esta investigación), mostró efectos altamente significativos en términos de aumento en producción de yuca en un cultivo comercial cuando fue inoculado recientemente en la zona de este estudio (Ceballos *et al.*, 2016). Sin embargo, conocer los diferentes HFMA asociados de manera natural al cultivo de cacao en la zona de estudio, su abundancia y frecuencia así como los HFMA dominantes en la comunidad, se constituye en una información base fundamental para identificar hongos simbiotes con afinidad de simbiosis, que podrían ser adecuados o de alto impacto en este sistema productivo al ser inoculados. Esto debido a que se ha evidenciado que la inoculación de un solo taxón de HFMA en plantas cultivadas es más efectivo que la inoculación de una mezcla de diferentes taxones de ellos, de manera que resulta conveniente mantener una alta dominancia de un solo taxón de HFMA en sistemas agrícolas (Van Geel *et al.*, 2016; Ceballos *et al.*, 2013).

Por otro lado, el número de esporas promedio de HFMA encontrados en este trabajo, fue relativamente menor comparado con otros estudios en cultivos de cacao en el mundo. Soumaila *et al.* (2012) por ejemplo, reportan un conteo de 162 esporas/10 gr de suelo en una plantación de cacao en Costa de Marfil, país identificado como el mayor productor mundial de cacao. Por su parte, Rojas (2010) encontró un número significativamente alto de esporas asociadas a muestras de suelo rizosférico en Perú, colectadas a partir de dos de los mismos clones analizados en este estudio, dónde reporta entre 5200 a 315,5 esporas/100 gr de suelo para el clon CCN51 y 6342 a 331,1 en ICS95, en época húmeda y seca respectivamente. También, Prieto *et al.* (2012) reportaron mayor número de esporas, comparado con este trabajo, en 100 gr de muestra de suelo rizosférico en sistemas agroforestales de cacao en Ecuador.

Sin embargo, el número de esporas promedio encontrado en esta investigación fue mayor comparado con el reportado por Cuenca y Meneses (1996) en plantaciones de cacao en Venezuela. Esto último puede explicarse porque el suelo rizosférico muestreado en El Yopal (Casanare) correspondió a una plantación de cacao joven, de

4 años de edad, en contraste con los suelos cacaoteros cultivados por más de 40 años en Venezuela que mostraron menor número de esporas (38 esporas/100 gr de suelo) (Cuenca y Meneses, 1996).

Contrario a lo anterior, el número de géneros de HFMA encontrado en este trabajo fue mayor comparado con el estudio mencionado de Soumaila *et al.* (2012), donde se reportan los géneros *Acaulospora*, *Gigaspora* y *Glomus* asociados a cacao en Costa de Marfil. También, el número de géneros encontrado en El Yopal fue mayor comparado con lo reportado por Rojas (2010), con una diversidad de HFMA compuesta por morfotipos asociados a los géneros *Glomus* y *Acaulospora* en sistemas de cacao en Perú. En un estudio realizado por Prieto *et al.* (2012) en sistemas agroforestales de cacao en Ecuador, se reportan géneros en común encontrados en este estudio (*Acaulospora*, *Gigaspora* y *Glomus*).

De acuerdo a los resultados obtenidos, la mayor frecuencia y abundancia encontrada de morfotipos asociados a los géneros *Rhizophagus* y *Glomus* en los tres clones de cacao, infiere la importancia de este primer género conocido por su distribución ubicua y su amplio número de hospederos en el mundo (Öpik *et al.*, 2006; Davison *et al.*, 2015). El género *Glomus* por su parte, ha sido reconocido en asociaciones simbióticas entre plantas de cacao y HFMA (Ballesteros *et al.*, 2004; Prieto *et al.*, 2012; Soumaila *et al.*, 2012). Esto puede explicarse, en parte, debido a que *Glomus* es el género más grande de HFMA (Tsvetkov *et al.*, 2014). Varios estudios reportan su presencia predominante en este sistema productivo en países como Ecuador, Perú, Costa de Marfil (Soumaila *et al.*, 2012) y Colombia (Ballesteros *et al.*, 2004). Los resultados de este estudio son una confirmación puntual de su robusta y significativa presencia en el sistema agrícola de cacao en Colombia, corroborando lo reportado por Ballesteros *et al.* (2004) en el país.

También, la mayor frecuencia y abundancia obtenida de morfotipos de *Rhizophagus* fue determinante dentro del marco global de esta investigación ya que, su mayor presencia en los tres clones de cacao, significó su alta afinidad con este hospedante y a su vez, la micotrofia de cacao con miembros de este género de HFMA.

Por su parte, el resultado de menor proporción de hongos FMA de *Gigaspora* encontrado en este estudio, correspondió con lo reportado por Prieto *et al.* (2012) en sistemas agroforestales ecuatorianos donde este género se halló en menor cantidad de esporas. Este resultado similar es interesante teniendo en cuenta la diferencia entre el sistema de producción a libre exposición muestreado en este trabajo y los sistemas agroforestales de cacao analizados en Ecuador, los diferentes tipos de suelos y condiciones agroclimáticas experimentales. También, la información encontrada aquí corrobora lo reportado en agroecosistemas del trópico ácido colombiano (Ordoñez, 2016) donde se ha identificado claramente el efecto del hospedero sobre las comunidades de HFMA asociadas, inclusive a nivel intraespecífico como en el caso de Ordoñez (2016), quién encontró diferencias significativas en la abundancia de HFMA asociados a diferentes variedades de yuca en la misma zona en la que se realizó esta investigación.

Es relevante señalar que hongos pertenecientes a *Glomus*, encontrados con mayor frecuencia y abundancia en este estudio, han sido ampliamente reportados como mejoradores de la resistencia en plantas contra estrés biótico, reduciendo la incidencia de síntomas causados por hongos patógenos de los géneros *Fusarium*, *Pythium*, *Rhizoctonia*, *Verticillium*, *Aphanomyces* y *Phytophthora* (Berta *et al.*, 2005; Kobra *et al.*, 2009; Pozo *et al.*, 2009; Ismail *et al.*, 2013; Olawuyi *et al.*, 2014). En contraste, HFMA del género *Rhizophagus* han sido menos referenciados en este campo de estudio. Por esto, y por la alta frecuencia y abundancia de morfotipos asociados a este género encontradas en cacao en este trabajo, es necesario realizar ensayos experimentales al respecto.

Por último, aunque se ha reportado no encontrar diferencias significativas en cuanto al número de esporas contenidas en muestras colectadas de suelos rizosféricos de cacao para dos épocas climáticas (húmeda y seca) (Morales y Durango, 2008), se ha reconocido que ciertos HFMA esporulan en épocas determinadas del año y la composición de la comunidad de HFMA también varía con la presencia determinada de factores abióticos (Mangan *et al.*, 2002; Mangan *et al.*, 2004). De acuerdo a esto, se recomienda realizar muestreos en diferentes épocas del año (húmeda y seca) en futuros estudios con cultivos de cacao policlonales y HFMA. Esto debido a que esporas de algunos morfotipos pueden no presentarse en época seca.

## 2.5 Conclusiones

El conocimiento de la composición de la comunidad extraradical de HFMA local a nivel de género, proporcionó información base importante sobre los recursos presentes de estos hongos simbiotes asociados a la rizósfera de cacao en la zona de estudio. Así, estos resultados contribuyeron con los inventarios de HFMA en suelos ácidos del trópico colombiano, identificando géneros representativos en este sistema productivo a través de evaluación morfológica de esporas.

Los diferentes clones de cacao muestreados en su rizósfera constituyeron un factor de variación significativo que determinó la presencia de géneros de HFMA identificados, presentando una tendencia heterogénea de éstos particularmente en el material clonal CCN51. Así, se identificaron dos géneros distintos asociados particularmente a este clon y, aunque los géneros fueron los mismos entre los clones restantes, variaron en algunas especies no identificadas.

La presencia significativa del género *Rhizophagus* sp. en la rizósfera de los tres clones de cacao sugirió que es un género importante para el desarrollo de esta especie vegetal en la zona de estudio. Esto fue determinante en el contexto general de esta disertación que tiene como objetivo principal evaluar el desempeño de la interacción de *Rhizophagus irregularis* con el patosistema plántulas de cacao - *Phytophthora palmivora*.

## 2.6 Anexos capítulo I

Anexo 1. Toma de muestras de suelo rizosférico en cultivo de cacao compuesto por tres clones genéticos.



Clon CCN51





Clon FSA12



Clon ICS95

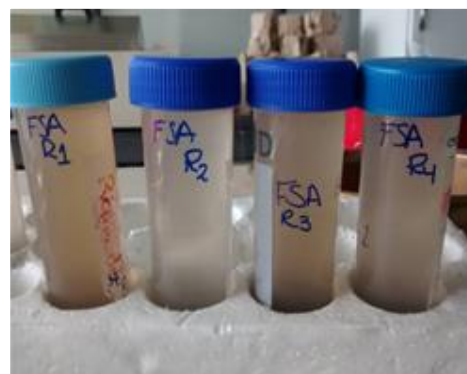
Anexo 2. Resultados análisis físico-químico de suelo proveniente de un cultivo de cacao compuesto por tres clones genéticos.

 <i>Laboratorio Agroanálisis S.A.S.</i>		REMITENTE	DANIELA HERNANDEZ	REMISION	FECHA INGRESO	7/7/2016
PROCEDENCIA		FINCA LA SALLE YOPAL-CASANARE			FECHA DE ENTREGA	19/7/2016
DIRECCION DEL CLIENTE		TELÉFONO			TIPO	1.25.0
RESULTADOS DE ANALISIS DE SUELOS						
Numero de laboratorio	55623					
Identificación						
Lote	N.L.					
Perfil						
Profundidad (cm)						
Textura	FA					
Arenas-A (%)	55					
Limos-L (%)	32					
Arcillos-Cl (%)	14					
pH 1:1	4.40					
Al (ácidos) m.e./100g	3.00					
C. Química micro biológica µg/cm <sup>2</sup>	-					
Carbonatos cuantitativos	-					
Materia Orgánica M.O. (%)	2.89					
Nitrógeno total N.T. (%)	0.14					
Fósforo Bray II, 2° p.p.m.	46					
Calcio - Ca p.p.m.	972					
Magnesio - Mg p.p.m.	242					
Potasio - K p.p.m.	279					
Hierro - Fe p.p.m.	-					
Cobre - Cu p.p.m.	-					
Manganeso - Mn p.p.m.	-					
Zinc - Zn p.p.m.	-					
Boro - B p.p.m.	-					
Capacidad - C.I.C. m.e./100g	30.16					
Calcio - Ca m.e./100g	4.86					
Magnesio - Mg m.e./100g	2.02					
Potasio - K m.e./100g	0.93					
Sodio - Na m.e./100g	0.93					
Suma de bases m.e./100g	8.50					
Porcentaje saturación						
Saturación total (%)	28.18					
Saturación Os - Ca (%)	16.11					
Saturación de Mg (%)	6.70					
Saturación de K (%)	2.29					
Relación - Ca/Mg (%)	2.41					
METODOLOGIA	Textura por Bouyoucos; pH 1:1 en agua potenciométrica; Aluminio [ácidos] extracción con Cloruro de Potasio 1N; Carbono orgánico digestión en vía húmeda [Walkley-Black]; Nitrógeno total Kjeldahl modificado; Fósforo Bray II; Bases intercambiables Ca, Mg, K y Na absorción atómica; Capacidad de intercambio catiónico acetato de amonio 1N.					
OBSERVACIONES						
APROBADO POR: GERENTE GENERAL AGROANALISIS S.A.S.	 FOLIO 0001 DEL 0001					

Anexo 3. Cultivo trampa experimental de cebolla (*Allium cepa*).



Anexo 4. Procedimiento de aislamiento de esporas en laboratorio.



## Anexo 5. Análisis estadísticos

## Sistema SAS

## Procedimiento CATMOD

**Resumen de datos**

<b>Respuesta</b>	genero*clon	<b>Niveles de respuesta</b>	13
<b>Variable de peso</b>	Esporas	<b>Poblaciones</b>	1
<b>Conjunto de datos</b>	MORFOTIPOS	<b>Frecuencia total</b>	1701
<b>Frecuencia de valores ausentes</b>	0	<b>Observaciones</b>	31

**Perfiles de población**

<b>Muestra</b>	<b>Tamaño muestral</b>
1	1701

**Perfiles de respuesta**

<b>Respuesta</b>	<b>genero</b>	<b>Clon</b>
1	Acaulosp	CCN51
2	Acaulosp	FSA12
3	Claroide	CCN51
4	Claroide	FSA12
5	Claroide	ICS95
6	Gigaspor	CCN51
7	Glomussp	CCN51
8	Glomussp	FSA12
9	Glomussp	ICS95
10	Rhizophya	CCN51
11	Rhizophya	FSA12
12	Rhizophya	ICS95
13	Scutello	CCN51

**Análisis de máxima verosimilitud**

Cálculos de verosimilitud máxima con convergencia.

**Análisis de varianza de verosimilitud máxima**

<b>Fuente</b>	<b>DF</b>	<b>Chi-cuadrado</b>	<b>Pr &gt; ChiSq</b>
<b>Genero</b>	5	352.92	<.0001
<b>Clon</b>	2	18.64	<.0001
<b>Ratio de verosimilitud</b>	5	166.21	<.0001

## Bibliografía

- Augé R.M. 2001. Water relations, drought and vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Mycorrhiza* 11: 3–42
- Ballesteros W., A. Unigarro, S. Rosero, A. Solarte. 2004. Determinación de hongos formadores de micorrizas (hma) en *Theobroma cacao* L., *Musa* sp., *Simmonds*, *Borojoa patinoi*. Cuatr y *Bactris gasipaes* HBK en el municipio de Tumaco, Nariño. *Rev de Cien Agrícolas*. 21(1): 11-23
- Berta G., S. Sampo, E. Gamalero, N. Massa y P. Lemanceau. 2005. Suppression of *Rhizoctonia* root-rot of tomato by *Glomus mossae* BEG12 and *Pseudomonas fluorescens* A6RI is associated with their effect on the pathogen growth and on the root morphogenesis. *Euro Jour of Plant Pathol*. 111(3):279-288
- Blaszkowsky J. 2012. *Glomeromycota*. W. Szafer Institute of Botany, Polish Academy of Sciences. Kraków.
- Brundrett M.C. y L. K. Abbott. 2002 *Arbuscular Mycorrhizas in Plant Communities*. K. Sivasithamparam, K.W. Dixon & R.L.Barrett (eds.). *Micro in Plant Conserv and Biodiversity*. pp. 151
- Bussetti S.G., E.A. Ferreira, I.M. Natale, M.E. Mandolesi. 1999. Fosforo retenido por suelos y por sus fracciones granulométricas en relación con la materia orgánica. *Cien del Suel*. 17(2): 35-46
- Cano M. A. 2011. Interacción de microorganismos benéficos en plantas: Micorrizas, *Trichoderma* spp. y *Pseudomonas* spp. Una revisión. *Revista U.D.C.A Actualidad & amp, Divulgación Científica* 14 (2): 15 - 31
- Cárdenas N.J., A. Darghan, M.D. Sosa, A. Rodriguez. 2017. Análisis espacial de la incidencia de enfermedades en diferentes genotipos de cacao (*Theobroma cacao* L.) en el Yopal (Casanare), Colombia. *Act Biol Colombiana*. 22(2): 209-220
- Davison M., M. Moora, A. Öpik. L. Adholeya, A. Ainsaar, S. Bâ, A.G. Burla, Diedhiou, I.Hiiesalu, T.Jairus, N.C. Johnson, A. Kane, K. Koorem, M. Kochar, C. Ndiaye, M. Pärtel, Ü. Reier, Ü. Saks, R. Singh, M. Vasar, M. Zobel. 2015. Global assessment of arbuscular mycorrhizal fungus diversity reveals very low endemism. *Science*. 349(6251): 970-973

- Feng G., F. Zhang, X. Li, C. Tian, C. Tang, Z. Rengel. 2002. Improved tolerance of maize plants to salt stress by arbuscular mycorrhiza is related to higher accumulation of soluble sugars in roots. *Mycorrhiza* 12: 185-190
- Horneck D.A., D.M. Sullivan, J.S. Owen y J.M. Hart. 2011. Soil Test Interpretation Guide. Oregon State University, Extensión Service.
- Ismail Y, S. McCormick, M. Hijri. 2013. The arbuscular mycorrhizal fungus, *Glomus irregulare*, controls the mycotoxin production of *Fusarium sambucinum* in the pathogenesis of potato. *FEMS Microbiol.* 348(1): 46-51. doi: 10.1111/1574-6968.12236
- Kobra N, K. Jalil, G. Youbert. 2009. Effects of Three *Glomus* Species as Biocontrol Agents Against *Verticillium*-Induced Wilt in Cotton. *Jour of Plant Protec Research.* 49(2).
- Koch, A.M., P.M. Antunes, H. Maherali, M.M. Hart y J.N. Klironomos. 2017. Evolutionary asymmetry in the arbuscular mycorrhizal symbiosis: conservatism in fungal morphology does not predict host plant growth. DOI: 10.1111/nph.14465
- Koske RE, B. Tessier. 1983. A convenient, permanent slide mounting medium. *Mycological Society of Amer Newsletter* 34: 59.
- Koyama H, T. Toda, S. Yokota, Z. Dawair, T. Hara. 1995. Effects of Aluminum and pH on Root Growth and Cell Viability in *Arabidopsis thaliana* Strain Landsberg in Hydroponic Culture. *Plant and Cell Physiology* 36: 201–205.
- Lewandowski T.J., K.E. Dunfield, P.M. Antunes. 2003. Isolate identity determines plant tolerance to pathogen attack in assembled mycorrhizal communities. *PLoS ONE* 8: e61329
- Mangan S.A y G.H Adler. 2002. Seasonal dispersal of arbuscular mycorrhizal fungi by spiny rats in a neotropical forest. *O ecologia* 131:587–597
- Mangan S.A., A.H. Eom, G.H. Adler, J.B. Yavitt y E.A. Herre. 2004. Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi across a fragmented forest in Panama: insular spore communities differ from mainland communities. *Oecologia* 141:687–700
- Miyakasa S.C. y M. Habte. 2001. Plant mechanisms and mycorrhizal symbioses to increase phosphorus uptake efficiency. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.*, 32: 1101-1147. <http://dx.doi.org/10.1081/CSS-100104105>
- Morales R. y W. Durango. 2008. Resultados en la obtencion de inoculos nativos de hongos micorrizicos en cultivos de cacao (*Theobroma cacao*) y soya

- (*Glycine max*). XI Congreso Ecuatoriano de la Ciencia del Suelo.
- Oehl F, E. Laczko, A. Bogenrieder, K. Stahr, R. Bösch, M. van der Heijden, E. Sieverding. 2010. Soil type and land use intensity determine the composition of arbuscular mycorrhizal fungal communities. *Soil Biol & Bioch.* 42: 724-738
  - Oehl F, A. Alves, G. Silva, B.T. Goto, L. Costa Maia, E. Sieverding. 2011. Glomeromycota: two new classes and a new order. *Mycotaxon* 116: 365–379
  - Olawuyi O.J., A.C. Odebode, I.O. Oyewole, A.O. Akanmu y O. Afolabi. Effect of arbuscular mycorrhizal fungi on *Pythium aphanidermatum* causing foot rot disease on pawpaw (*Carica papaya* L.) seedlings. *Arch of Phytopathol and Plant Protection.* 2(47): 185-193
  - Öpik M., M. Moora, J. Liira, M. Zobel. 2006. Composition of root-colonizing arbuscular mycorrhizal fungal communities in different ecosystems around the globe. *Jour of Ecology* 94: 778–790.
  - Ordoñez Y.M. 2016. Dinámica de la comunidad de Hongos Formadores de Micorrizas Arbusculares después de inocular *Rhizophagus irregularis* en un sistema agrícola en el trópico. Tesis de doctorado. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.
  - Peña-Vanegas C.P., G.I. Cardona, J.H. Argelles y A. L. Arcos 2006. Micorrizas arbusculares de la Amazônia colombiana. Catalogo ilustrado. Instituto Amazónico de investigaciones científicas SINCHI (En prensa)
  - Pozo M.J., A. Verhage, J. Garcia-Andrade, M.J. Garcia y C. Azcon-Aguilar, 2009. Priming plant defence against pathogens by arbuscular mycorrhizal fungi. In: *Mycorrhizas- Functional Processes and Ecological Impact*, Azcon-Aguilar, A.J.M., S. Gianinazzi, and V. Gianinazzi- Pearson (eds.), Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, pp. 123- 135
  - Prieto O.O., C. Belezaca, W. Mora, F. Garcés, F. Sabando y P. Cedeño. 2012. Identificación de hongos micorrízicos arbusculares en sistemas agroforestales con cacao en el trópico húmedo ecuatoriano. *Agronom Mesoamericana* 23(2): 233-139
  - Schenk N.C. y Y. Perez. 1990. Manual for the identification of VA mycorrhizal fungi. 3th Edition. Sinergistic Publications. Gainesville
  - Schüßler A., D. Schwarzott, C. Walker. 2001. A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. *Mycol Research* 105: 1413–1421
  - Stokes E., S. Maura, D. Charles y G. Koch. 2000. *Categorical Data Analysis*

*Using the SAS® System, Second Edition.* Cary, NC: SAS Institute Inc.

- Soumaila Z.B., T.B. Tra, Z.G. Noel, K.Z. Ghislaine, F.R. Romain, A. Zeze. 2012. Arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Theobroma cacao* L. in the region of Yamoussoukro (Cote d'Ivoire). *Afri Jour of Agricul Research*. 7(6): 993-1001.
- Suparno A., S. Prabawardani, S. Yahya, N.A. Taroreh. 2015. Inoculation of Arbuscular Mycorrhizal Fungi Increase the Growth of Cocoa and Coffee Seedling Applied with Ayamaru Phosphate Rock. *Jour of Agricul Science* 7(5): 199-210.
- USDA (United States Department of Agriculture). 2014. Soil Survey Field and Laboratory Methods Manual. Soil Survey Investigations Report No. 51, Version 2.0. R. Burt y Soil Survey Staff (ed.). U.S. Department of Agriculture, Natural Resources Conservation Service. Soil Survey Field and Laboratory Methods Manual.
- van der Heijden M.G.A., V. Rinaudo, E. Verbruggen, C. Scherrer, P. Bàrberi, M. Giovannetti, 2008. The significance of mycorrhizal fungi for crop productivity and ecosystem sustainability in organic farming systems. 16th IFOAM Organic World Congress, Modena, Italy, June 16-20, 2008 Archived at <http://orgprints.org/view/projects/conference.html>
- Van Geel M., M. De Beenhouwer, B. Lievens, O. Honnay. 2016. Crop-specific and single-species mycorrhizal inoculation is the best approach to improve crop growth in controlled environments. *Agron for Sustain Development*. 36:37
- Wehner J., P.M. Antunes, J.R. Powell, J. Mazukatow, M.C. Rillig. 2010. Plant pathogen protection by arbuscular mycorrhizas: a role for fungal diversity?. *Pedobiologia*. 53: 197-201

## Capítulo II

### 3. Análisis espacial de la incidencia de enfermedades en diferentes genotipos de cacao (*Theobroma cacao* L.) en El Yopal (Casanare), Colombia<sup>1</sup>

Palabras clave: cacao, dependencia espacial, dispersión, modelos estadísticos, moniliasis, pudrición negra del fruto.

#### 3.1 Introducción

El cacao (*Theobroma cacao* L.) es un sistema productivo agrícola de interés creciente en Colombia (ICA, 2013; Rodríguez y Vera, 2015). Sin embargo, enfermedades como “pudrición negra del fruto” (PNF) y “moniliasis” (MS) son reportadas como limitantes en este cultivo a nivel nacional (Jaimes y Aranzazu, 2010; Jaimes *et al.*, 2011; Correa *et al.*, 2014; Rodríguez y Vera 2015; Ramírez, 2016). Ambas enfermedades generan pudrición en el fruto de cacao, órgano de interés agronómico y comercial en las plantaciones (Ramírez, 2016). MS impacta más del 40 % de la producción anual de cacao en el país (Correa *et al.*, 2014), mientras que la incidencia de PNF viene aumentando en los últimos años y se reporta como la mayor limitante en algunos lotes productivos monoclonales en Colombia (Rodríguez y Vera 2015; Ramírez, 2016). En el mundo, esta última reporta pérdidas anuales entre 10 y 30 % en producción de granos, con valores superiores en condiciones de mayor humedad (McMahon y Purwantara,

---

<sup>1</sup> Trabajo publicado recientemente. En: Cárdenas, N.J., Darghan A., Sosa M.D., Rodríguez A. 2017. Análisis espacial de la incidencia de enfermedades en diferentes genotipos de cacao (*Theobroma cacao* L.) en El Yopal (Casanare), Colombia. Acta Biológica Colombiana. 22(2): 209-220.

2004).

En general, una epidemia se define como el progreso de una enfermedad en el tiempo y espacio. Las condiciones ambientales y las características del patosistema determinan la estructura de la epidemia y sus patrones espaciales (van Maanen y Xu, 2003). El estudio de la dinámica de enfermedades en el espacio y tiempo contribuye al desarrollo de estrategias para el manejo de epidemias (Agrios, 2004). Sin embargo, el éxito de estas estrategias depende de la aplicación de métodos y modelos adecuados, que representen el gradiente de enfermedad en el espacio y/o la curva de progreso de la enfermedad en el tiempo, considerando la relación entre patógenos, hospedante, variables ambientales y manejo del cultivo (Campbell y Madden, 1990).

Inicialmente, los estudios de patrones espaciales de enfermedades se centraron en el análisis de la media y la varianza o en la distribución de frecuencias de la incidencia de la enfermedad (Madden y Hughes, 1995; Madden y Hughes, 1999). No obstante, este enfoque analítico no tiene en cuenta información sobre la ubicación de las muestras en el espacio, ni el grado de dependencia entre observaciones cercanas. Además, con el uso de la teoría de variables regionalizadas de la geoestadística, la varianza entre muestras se interpreta como una función de su distancia de separación (Rossi *et al.*, 1992; Pizzato *et al.*, 2014). Su objetivo es medir la dependencia espacial entre mediciones, tomadas a diferentes distancias y empleando esta información para interpolar, extrapolar y simular. En este sentido, el análisis espacial se ha definido como la evaluación cuantitativa de la variación o cambios de una población con orientación espacio-temporal dentro de un área específica (Florez y Corredor, 2000).

El modelamiento teórico y la descripción estadística de la dinámica espacio-temporal de las epidemias tiene un interés creciente, especialmente para datos de incidencia de enfermedad donde plantas individuales o partes de plantas son clasificadas como enfermas o sanas (van Maaden y Xu, 2003). Diferentes métodos han sido empleados para caracterizar la agregación espacial de datos provenientes de incidencia de enfermedad. Análisis de relaciones, varianza-media, ajuste de distribución beta-binomial, autocorrelación espacial y métodos geoestadísticos son métodos empleados para cuantificar la heterogeneidad espacial de datos de incidencia de enfermedad (van Maaden y Xu, 2003).

Así, es fundamental determinar de forma precisa, la dinámica de las enfermedades en campo para poder establecer estrategias de manejo adecuadas. Adicionalmente, la variación en la afectación de las plantas por PNF y MS puede ser originada a partir de la variabilidad espacial de condiciones conductivas a la enfermedad, tales como diferentes niveles de susceptibilidad en el material clonal y su alternabilidad en el establecimiento del cultivo. Por esto, es importante identificar las características de dependencia espacial de la incidencia de enfermedades y su dispersión en plantaciones de cacao.

Análisis por semivariogramas y *kriging* han sido empleados para detectar patrones de dispersión espacio-temporal de *Phytophthora* sp. en frutos de cacao. Ten Hoopen *et al.* (2009) estudiaron la relación espacio-temporal de la enfermedad PNF de cacao empleando análisis por semivariogramas, demostrando una dependencia espacial de la distribución de la enfermedad en el cultivo a partir de plantas monitoreadas durante dos épocas de producción.

En la actualidad, es escasa la información sobre el comportamiento espacial simultáneo de dos enfermedades limitantes en el cultivo de cacao, en condiciones del trópico ácido, en zonas de Suramérica con amplio potencial de producción. Esto puede limitar la aplicación de medidas más precisas de manejo de enfermedades y la implementación de estrategias para su control desde el establecimiento de la plantación. El objetivo de este trabajo fue caracterizar la variabilidad espacial de la incidencia de PNF y MS en una plantación compuesta por tres clones de cacao en El Yopal (Casanare, Colombia) empleando metodologías de análisis espacial.

## **3.2 Materiales y métodos**

### **3.2.1 Área de estudio**

El estudio se realizó en la finca “Mate Pantano” de la Universidad de La Salle ubicada en zona rural del municipio de El Yopal (Casanare), a una altura de 256 m s.n.m. y con coordenadas geográficas de 5°19'31"N y 72°17'48"W. Las condiciones de temperatura, precipitación y humedad relativa máximas y mínimas presentadas durante el tiempo de evaluación fueron de 27,6 – 23,3°C, 122,5–50,3 mm y 83 – 91 %

respectivamente. Los datos meteorológicos fueron obtenidos a partir de una estación climatológica ubicada en la finca de la Universidad, que colectó y registró datos diarios en línea a través del software WeatherLink 5.9.2. Se delimitó y monitoreó un área de 1,4 hectáreas de una plantación de cacao de 4,5 años de edad, compuesta por tres materiales clonales. El área monitoreada se delimitó empleando la función *track manager* de un dispositivo GPS Garmin Etrex 30x, con base en criterios de homogeneidad del sistema productivo -sin sombrero en los tres clones presentes- y del terreno -sin cambios significativos en la pendiente, ni anegamientos-.

Datos espaciales y de enfermedad fueron colectados a partir de 135 plantas, correspondiendo a 45 plantas por clon de los materiales CCN51, ICS95 y FSA12, sembrados intercaladamente en el lote cada dos surcos por clon, a una distancia de 3 x 3 m entre plantas. Las plantas monitoreadas fueron seleccionadas a través del lote con base en la presencia de frutos de cacao jóvenes y maduros. Estos fueron evaluados con una frecuencia de siete días durante agosto, septiembre y octubre de 2015, meses correspondientes a la época de lluvias en la zona de estudio.

### **3.2.2 Variables analizadas**

Se analizó la variable incidencia de las enfermedades MS y PNF de cacao y su comportamiento espacial en el lote. La incidencia para ambas enfermedades se calculó según la ecuación 1:

$$\text{Incidencia} = (ME/MT) \times 100.$$

Dónde, *ME* = número de frutos enfermos por árbol y *MT* = número total de frutos por árbol. El número acumulado de frutos enfermos para cada planta fue calculado durante las semanas evaluadas.

### **3.2.3 Geo-referenciación**

Se levantó un mapa del perímetro del lote monitoreado por georeferenciación, empleando el dispositivo GPS Garmin Etrex 30x. Se consideró una planta como punto de muestreo y las ubicaciones de las plantas monitoreadas fueron registradas en el mapa mediante coordenadas geográficas espaciales.

### **3.2.4 Identificación de las enfermedades**

El reconocimiento de las enfermedades en campo se realizó siguiendo los síntomas y

escalas de severidad reportadas en la literatura. La infección por MS presentó daños internos y externos, incluyendo lesiones acuosas pequeñas, deformación, maduración prematura y manchas de color chocolate -con límite no bien definido- en la parte exterior del fruto de cacao (Phillips-Mora y Wilkinson, 2007). En estados avanzados de infección, los tejidos internos formaron una masa compacta rodeada por una sustancia acuosa que causó la pérdida de las semillas contenidas (Phillips-Mora y Wilkinson, 2007). Los síntomas de PNF por su parte, se presentaron en la superficie del fruto como una mancha incolora en estado inicial, que posteriormente se desarrolló en una lesión de color marrón o negro con un límite bien definido, extendiéndose por todo el fruto en un tiempo de dos semanas aproximadamente (McMahon y Purwantara, 2004). Con frecuencia, las infecciones en frutos maduros iniciaron en la punta o base de estos (puntos distales del fruto), mientras que infecciones ecuatoriales se asociaron con daños en la superficie de los frutos o heridas (McMahon y Purwantara, 2004).

### 3.2.5 Análisis espacial

#### *Incidencia “pudrición negra del fruto”*

La variabilidad espacial (relaciones espaciales) de la incidencia de PNF entre puntos de muestreo (plantas) fue analizada por semivariogramas isotrópicos empíricos y ajustados empleando el procedimiento “variogram” del paquete estadístico SAS Institute Inc. versión 9.4®. Se realizó una transformación logarítmica a los valores de número acumulado de frutos enfermos por planta durante el tiempo de evaluación. Los parámetros descriptivos de los semivariogramas proporcionados por el programa estadístico fueron: 1) La varianza “pepita” (C0) o valor en el cual la curva del modelo calculado intercepta el eje y. 2) El rango (A) para el cual la dependencia espacial (en metros) es aparente. 3) El umbral que corresponde a la asíntota del modelo (C+C0). Los semivariogramas obtenidos permitieron cuantificar el grado y escala de la variación espacial, dados a través de la ecuación 2:

$$\gamma(h) = \frac{1}{2} N(h) \sum [Z(x) - Z(x+h)]^2$$

Donde  $\gamma(h)$  corresponde a la semivarianza de la incidencia de plantas de cacao infectadas en el espacio, separadas por los intervalos de las distancias  $h$ .  $N(h)$  es el

número total de pares de plantas de cacao separadas por un intervalo de distancia  $h$ .  $Z(x)$  es el valor de la incidencia en una planta localizada en la posición  $x$ .  $Z_{(x+h)}$  es el valor de la incidencia a la distancia del intervalo  $h$  desde  $x$ .

La dependencia espacial fue estimada a través del índice del grado de dependencia espacial (*SDDI* –por sus siglas en inglés-) basado en los valores  $(C)$  y  $(C_0)$  de la ecuación 3 y la clasificación adoptada por Alves y Pozza (2010):

$$SDDI = (C_0/C_0+C) \times 100.$$

Donde cuando  $SDDI \leq 25\%$ , existe una fuerte dependencia espacial. Cuando  $25\% \leq SDDI \leq 75\%$ , una dependencia espacial moderada tiene lugar. Y cuando  $SDDI \geq 75\%$ , una pobre dependencia espacial es aparente.

El método de interpolación *kriging* fue empleado a partir de las propiedades estructurales de los semivariogramas obtenidos y los datos de las variables evaluadas. El indicador *kriging*, a partir del principio de dependencia espacial en el cual las muestras cercanas tienen mayor similitud entre sí que las más distantes, estima los valores de las variables en los puntos no muestreados a partir de los puntos muestreados. Los mapas *kriging* fueron construidos con el procedimiento “krige2d” del programa SAS Institute Inc. versión 9.4®.

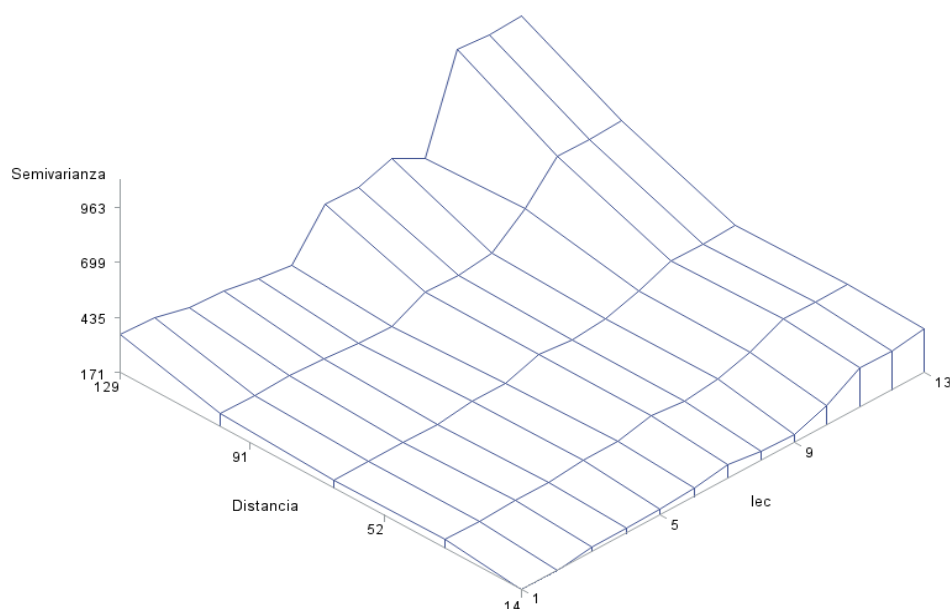
### ***Incidencia “moniliasis”***

Se empleó el estadístico de prueba conocido como *Join Count* para estimar la autocorrelación espacial entre pares de puntos, a partir del número de pares de árboles con síntomas de la enfermedad, separados por una distancia y orientación específica. El *Join Count*, a nivel nominal, consideró la presencia o ausencia de MS. La distribución y dependencia espacial de esta propiedad se pudo expresar a nivel de una variable binaria, conteniendo solo dos valores asignados a la variable: presencia/ausencia. *Join Count* permitió caracterizar la naturaleza de la distribución espacial de MS de acuerdo a la similaridad con tres patrones de distribución referentes: agrupada, aleatoria o dispersa, donde la existencia de una distribución agrupada infiere una fuerte dependencia espacial positiva, una distribución aleatoria

no presenta dependencia espacial y una distribución dispersa implica una fuerte distribución espacial negativa (Collet *et al.*, 2016). La distribución espacial de incidencia de MS se presentó mediante mapas asociados a la secuencia temporal del fenómeno estocástico. La relación de dependencia o autocorrelación espacial se evaluó a través del índice de Moran (Dormann *et al.*, 2007), respecto a la aparición de nuevos sitios de infección de MS y los precedentes, para las 13 semanas monitoreadas.

### 3.3 Resultados

El comportamiento espacial de incidencia de PNF se analizó mediante semivariogramas empíricos (o experimentales), obtenidos a partir del conjunto de puntos medidos (Figura 1). Los semivariogramas se usaron como herramientas en la detección de continuidad espacial y de la estructura del proceso aleatorio, ya que la semivarianza empírica proporcionó un estimado de la semivarianza teórica, que caracterizó la estructura espacial del proceso. La variable incidencia de PNF presentó estructura de dependencia espacial de acuerdo a los semivariogramas empíricos obtenidos debido a que la semivarianza no fue constante en función de la distancia en ningún caso (Fig. 1).



**Figura 1.** Semivariogramas empíricos obtenidos para incidencia de PNF con cambios en la semivarianza en función de la distancia de separación de las plantas monitoreadas para las semanas evaluadas.

Posteriormente, con el ajuste de estos semivariogramas a modelos matemáticos teóricos se logró cuantificar el grado y escala de variación espacial, permitiendo dilucidar aspectos biológicos importantes asociados a la epidemia de PNF. Entre estos, se logró inferir la capacidad máxima de dispersión del inóculo de infección en campo a través de los valores de los rangos obtenidos en m (Tabla 1), bajo las condiciones agronómicas dadas en este estudio. Mediante el ajuste se obtuvieron los modelos de “potencia” (Pow), “esférico” (Sph) y “efecto sinehole” (She) para las 13 semanas monitoreadas. Este ajuste permitió extraer parámetros estructurales (Tabla 1) usados posteriormente para la interpolación por *kriging*.

**Tabla 1.** Parámetros estructurales de semivariogramas ajustados (Modelo, Rango, Umbral) y estadístico de dependencia espacial (SDDI) de incidencia de PNF para 13 semanas de monitoreo.

Semana	Modelo	Parámetros del modelo		
		Rango (m)	Umbral ( $C_0+C$ )	SDDI
1	Pow	36.23	452.40	76.32
2	Sph	37.48	307.77	64.35
3	Pow	38.24	362.26	70.99
4	She	37.02	398.27	79.99
5	Sph	39.33	318.32	79.61
6	She	21.74	455.39	78.50
7	Sph	38.89	354.81	62.32
8	She	39.25	712.38	48.84
9	She	40.23	617.88	36.13
10	She	40.00	669.45	39.40
11	She	40.00	669.25	39.39
12	She	40.27	614.09	41.16
13	She	38.27	933.66	82.33

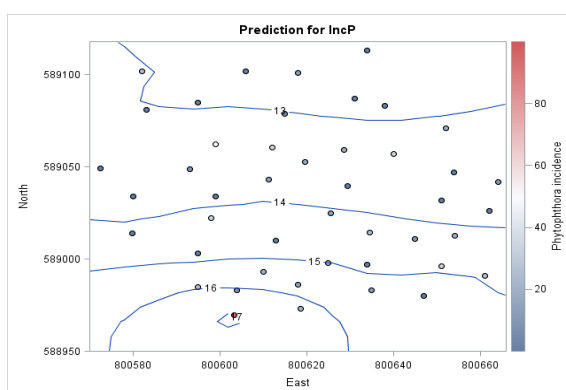
En general, en el modelo Pow la semivarianza del proceso estocástico se incrementó constantemente con la distancia, lo que indicó la existencia de dependencia espacial de incidencia de la enfermedad dentro de los rangos de distancia obtenidos (Tabla 1) y condicionada por los focos de infección presentes. En el modelo Sph la semivarianza alcanzó el valor del umbral en la escala, medida de la variación espacial que correspondió a la varianza de la población, a partir de la cual las medidas de incidencia de PNF son espacialmente independientes unas de otras. En el modelo She la semivarianza se incrementó con la distancia, alcanzando el umbral a una distancia promedio de 37,09 m y oscilando alrededor del valor del umbral con una amplitud que

disminuyó a medida que se movió a mayores valores del rango.

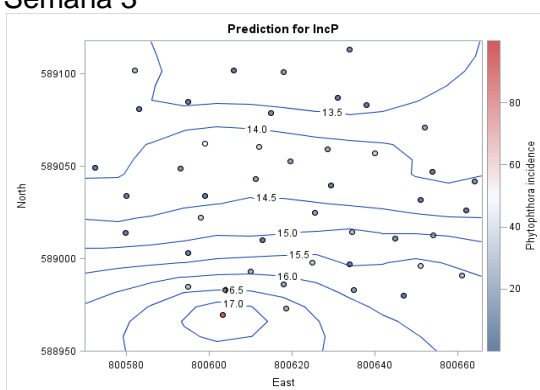
Se corroboró la existencia de correlación espacial entre plantas de cacao infectadas para el tiempo de evaluación empleado. Los valores de rango para los cuales existió una dependencia espacial moderada ( $25\% < SDDI < 75\%$ ) de incidencia de PNF, se encontraron en un radio de distancia entre los 36,23 y 40,27 m para la mayoría de las semanas evaluadas. A distancias menores, alrededor de 21,74 m para el modelo ajustado “She” en la semana seis, la dependencia espacial fue enmascarada debido a la presencia intercalada de clones con características de resistencia a la enfermedad. Por el contrario, para rangos mayores en los semivariogramas obtenidos, la dependencia espacial tendió a ser más fuerte (Tabla 1).

A partir de los parámetros estructurales de los semivariogramas, se construyeron representaciones gráficas bidimensionales de la estimación *kriging*, que identificaron la distribución espacial de la variable incidencia de PNF en campo (Fig. 2). Se corroboró la aparición de múltiples focos de infección y el incremento de los valores de incidencia en sus zonas de influencia en el lote a través de las semanas evaluadas. Valores de incidencia de la enfermedad para diferentes puntos no muestreados, se predijeron a partir de puntos muestreados en el lote. Estos valores se ilustran por medio de diferentes “niveles” de incidencia delimitados por contornos, para seis semanas representativas de evaluación (Fig. 2).

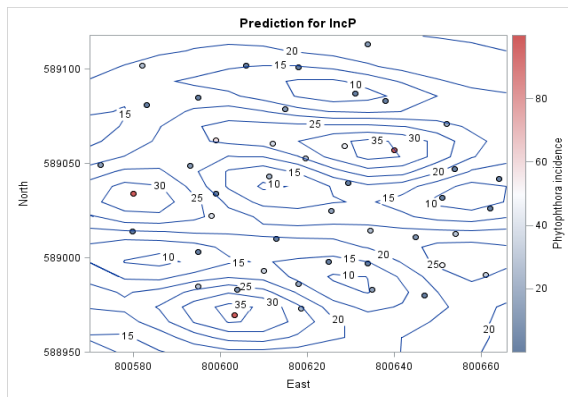
### Semana 1



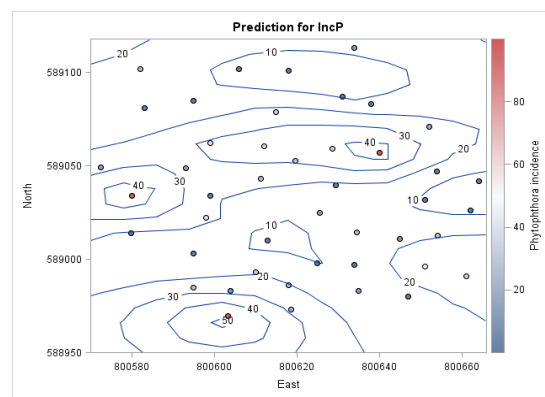
### Semana 3



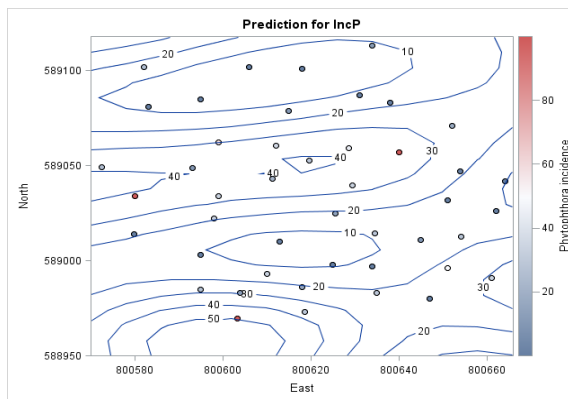
Semana 5



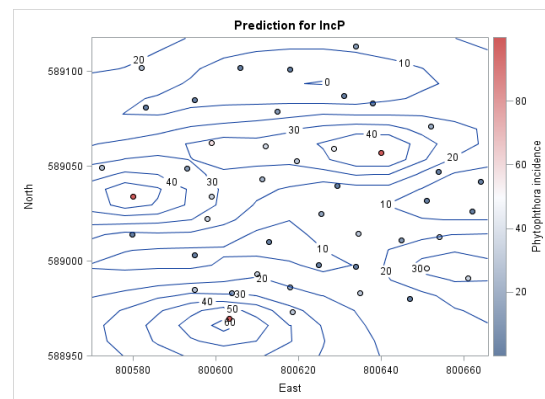
Semana 7



Semana 9



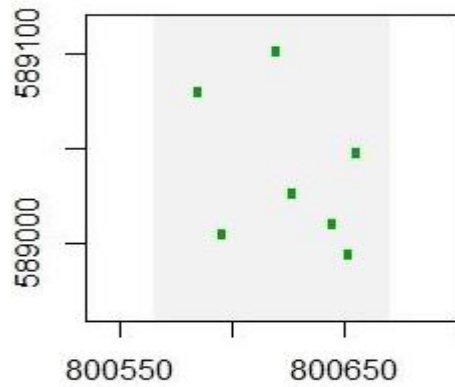
Semana 11



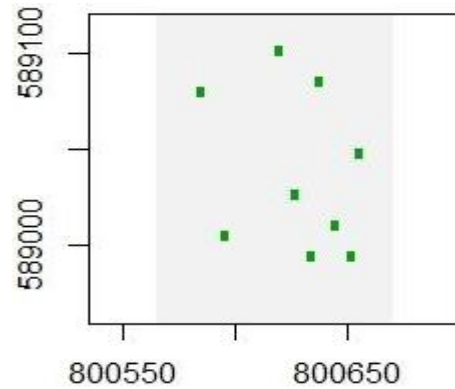
**Figura 2.** Mapas de interpolación por *kriging* de incidencia de PNF para seis semanas representativas en un área de monitoreo de 1,4 ha. El eje x y y corresponden a coordenadas geográficas E y N respectivamente.

Por otro lado, en el análisis del comportamiento espacial de incidencia de MS, se identificaron sitios en el lote propios a la aparición de focos de infección de la enfermedad. Estos correspondieron con la ubicación de árboles de cacao que reportaron características de susceptibilidad para esta enfermedad. En general, se evidenció la aparición de nuevos sitios de infección en el tiempo (Fig. 3).

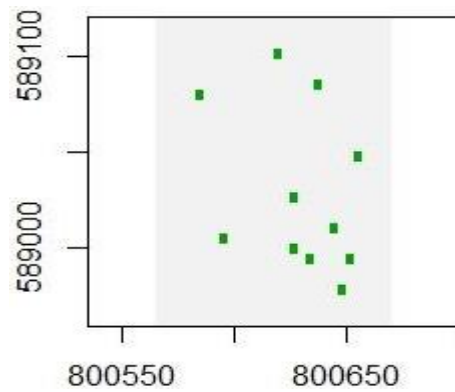
Semana 1



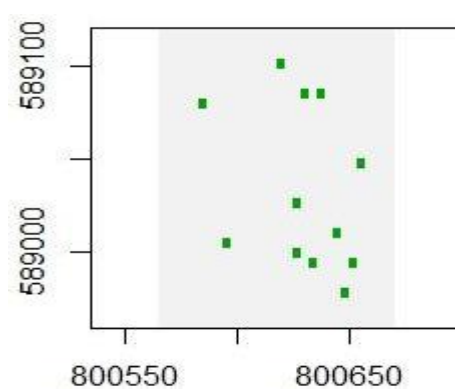
Semana 3



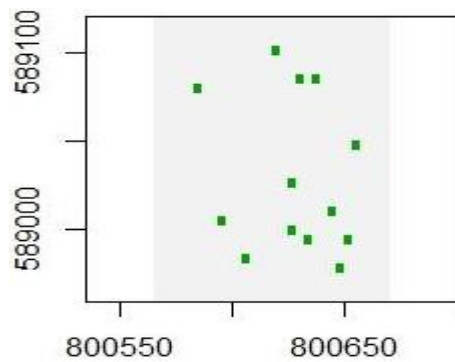
Semana 5



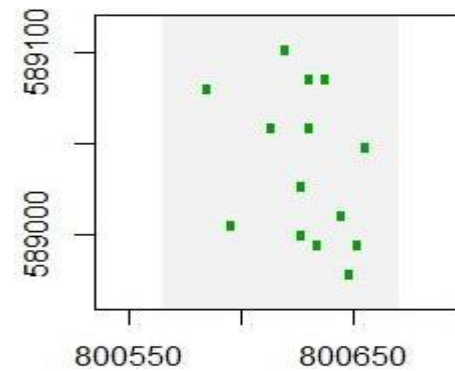
Semana 7



Semana 9



Semana 11



**Figura 3.** Mapas de distribución espacial de incidencia de MS obtenidos por *Join Count* para seis semanas representativas en un área de monitoreo de 1,4 ha. El eje x y y corresponden a coordenadas geográficas E y N respectivamente.

La autocorrelación espacial, a través de los valores estimados de *p value* de la prueba

o *Índice de Moran* (Tabla 2), se evidenció para las semanas cinco y siete ( $p < 0,05$ ). Para las semanas restantes no se rechazó la hipótesis asociada al hecho de que la incidencia de MS se distribuyó de forma aleatoria entre las plantas del área de estudio. De acuerdo a esto, los procesos espaciales que promueven el patrón de infección observados constituyen una dispersión aleatoria excepto para las semanas cinco y siete ( $p < 0,05$ ), dónde existe correlación espacial del proceso de infección de esta enfermedad.

**Tabla 2.** Valores estimados *p value* por *Índice de moran* en la determinación de autocorrelación espacial para 13 semanas de monitoreo.

Semana	<i>p value</i>
1	0.439598
2	0.342343
3	0.350051
4	0.289433
5	0.012549
6	0.132432
7	0.005342
8	0.325345
9	0.242201
10	0.148093
11	0.138917
12	0.394535
13	0.234232

### 3.4 Discusión

Se evidenció un progreso de la incidencia de las enfermedades en el tiempo con la aparición de nuevos focos de infección a través de las semanas de evaluación (Fig. 2 y Fig. 3). El estudio de semivariogramas usando un enfoque geoestadístico permitió identificar focos de infección de PNF y MS durante las 13 semanas de monitoreo. Los rangos a los cuales se encontró dependencia espacial de los datos para PNF, indicaron focos de infección distanciados entre 21,74 y 40,27 m para las semanas evaluadas (Tabla 1 y 2); distancias que correspondieron a una mayor amplitud comparadas con las reportadas por Ten Hoopen *et al.* (2009) para la misma enfermedad en un cultivo monoclonal de cacao en África, las cuales oscilaron entre los 3,3 y 6,6 m. Esto puede explicarse por las características propias de alternabilidad de

clones en el cultivo monitoreado, con distintas características de resistencia, que limitó la expresión de nuevos focos de infección y dispersión de la epidemia a manera de barrera viva, en lugares del espacio con presencia de clones resistentes a *Phytophthora* spp.

Los mapas de interpolación por *kriging* permitieron predecir la distribución, cuantificación y evolución de zonas de influencia bajo niveles específicos de incidencia de PNF, dados por los diferentes contornos con valores numéricos definidos. (Fig. 2). Se evidenciaron variaciones en los niveles de incidencia y su área de influencia en el tiempo, con una tasa de cambio promedio de 11,03 % mensual en regiones del lote de alta incidencia y de 5,14 % mensual en zonas de menor incidencia de la enfermedad.

En general, la aparición de estos focos de infección de PNF y MS en sitios específicos correspondió a la ubicación de clones con características susceptibles, ilustrando la dinámica epidemiológica de las enfermedades y la relación de especificidad patógeno-hospedante. En plantas del clon CCN51, se corroboraron las características de susceptibilidad a *Phytophthora* spp. (Arciniegas y Phillips, 2006) y resistencia a *Monilophthora roreri* (Corpoica, 2004) y de resistencia a *Phytophthora* spp. del clon ICS95 (Arciniegas y Phillips, 2006). Sin embargo, no se evidenció resistencia a *Monilophthora roreri* en el material ICS95 (Corpoica, 2004;) en el lote experimental dónde se presentó incidencia de MS.

De acuerdo a esto último, aunque existió presencia de MS en plantas ICS95, ésta enfermedad no se expresó con mayor frecuencia debido a que los valores de incidencia en todas las plantas fueron menores (media 8 %) comparados con los mayores valores de incidencia para PNF (media 35 %). Además, la resistencia reportada en ICS95 frente a *Monilophthora roreri* se referencia como resistencia “moderada” (Corpoica, 2004) a significativamente alta, ante aislados colombianos del patógeno (Phillips-Mora *et al.*, 2005).

Así mismo, otras características relacionadas con el sistema productivo tales como edad del cultivo y cantidad de frutos por planta, pueden explicar también la ocurrencia de condiciones conductivas para la expresión de las enfermedades evaluadas. Esto debido a que se ha detectado que estas variables se relacionan significativamente con las pérdidas provocadas por PNF y MS en plantaciones de edades entre los 4,4 a 8,7

años (Ramírez, 2016). Rango de edad que correspondió a todas las plantas del lote monitoreado y, en su mayoría, con significativa producción de frutos.

Por otra parte, las condiciones agroclimáticas presentadas en la zona de estudio también pudieron influir en la dinámica de dispersión de las enfermedades. La alta humedad relativa y precipitaciones constantes presentadas, para los meses comprendidos entre agosto y octubre (dentro del régimen de lluvias unimodal en la región) en los cuales se llevó a cabo el experimento, pueden explicar la rápida aparición de focos de infección de PNF durante el tiempo de evaluación. Esto en concordancia con Wood (1974) quien reporta que períodos de alta humedad relativa son requeridos para la rápida dispersión de la enfermedad, y con Ramírez (2016) quién evidenció la mayor relación de ocurrencia de pérdidas en producción de cacao por efecto de incrementos en la precipitación y humedad relativa.

De acuerdo a lo anterior, la humedad relativa se ha visto como el factor climático más determinante para explicar la alta incidencia en regiones de alta humedad relativa como Nigeria y la ausencia casi completa de la enfermedad en zonas de baja humedad relativa en zonas como Malasia (Cabi, 2015). De igual forma, la precipitación y liberación de zoosporas en el agua superficial del suelo, desde donde son esparcidas a los frutos de las plantas por salpicadura de agua lluvia (McMahon y Purwantara, 2004), es un mecanismo de dispersión del inóculo de infección eficaz que puede explicar la mayor incidencia de PNF con respecto a MS. También pudieron existir otros mecanismos de dispersión de la enfermedad a través del movimiento de inóculo desde el suelo hasta el dosel por insectos como la “hormiga negra pequeña” *Crematogaster striatula* (Evans, 1973) que requieren de evaluación detallada. Sin embargo, se ha reportado que el inóculo potencial del suelo disminuye rápidamente con el tiempo fuera de los períodos epidémicos, principalmente por su baja capacidad saprofítica y no patogénica en las raíces de cacao. Aún así, se conoce que puede sobrevivir entre la corteza en los tallos de las plantas por varios meses (Despreaux *et al.*, 1987).

La rápida aparición de focos de infección de PNF en el tiempo, puede explicarse por las condiciones propias de alta humedad relativa en la región, para los meses comprendidos entre abril y noviembre (régimen de lluvias unimodal), período dentro

del cual se llevó a cabo el experimento. Esto en concordancia con Wood (1974) quien reporta que períodos de humedad relativa son requeridos para la rápida dispersión de la enfermedad. Deberdt *et al.* (2008) también asocian la ocurrencia de precipitaciones y alta humedad relativa como condiciones ambientales que favorecen el desarrollo de la epidemia y las especies de *Phytophthora* implicadas. Es así como, la humedad relativa se ha visto como el factor climático más determinante para explicar la alta incidencia en regiones de alta humedad relativa como Nigeria y la ausencia casi completa de la enfermedad en zonas de baja humedad relativa en zonas como Malasia (Cabi, 2015).

Por otro lado, se ha reportado que la formación, liberación y dispersión de esporas de *Moniliophthora roreri* no requiere de alta humedad y su dispersión natural ocurre principalmente por viento (Cabi, 2015). Condición que puede explicar, en parte, la menor frecuencia de aparición de focos de infección en el tiempo, con valores más bajos de incidencia de la enfermedad MS con respecto a PNF. Sin embargo, el potencial para la dispersión por viento, es limitado a poca distancia a partir de una sola fuente de inóculo debido al peso de las esporas y su susceptibilidad (Phillips-Mora *et al.*, 2007). Además, Ramírez (2016) menciona otras variables de importancia asociadas a la ocurrencia de MS como edad del cultivo y el total de frutos presentes que deben ser tenidas en cuenta.

Lo anterior también puede ser explicado porque, la alta incidencia de nuevos focos de infección de MS ocurre cuando coinciden las condiciones de aparición de un gran número de frutos, un clima de lluvia cálida y la presencia de inóculo en campo (frutos infectados) (Cabi, 2015). Además, si las esporas son liberadas al suelo, su desplazamiento a largas distancias no es significativo y generalmente los cambios en la turgencia en pocos días y la invasión por otros microorganismos, inmoviliza las esporas (González *et al.*, 1981). De tal forma que, el principal vector de transmisión viene dado por la actividad humana y de desplazamientos en las plantaciones (Phillips-Mora *et al.*, 2007).

Los semivariogramas experimentales obtenidos y su ajuste a modelos teóricos demostraron la existencia de autocorrelación espacial de la variable incidencia de PNF, lo que sugiere que los métodos geoestadísticos pueden ser una herramienta útil

en la modelación e interpretación de epidemiologías en el sistema productivo de cacao en el trópico húmedo. Los semivariogramas experimentales reflejaron las distancias máximas y la manera en que un punto tiene influencia sobre otro punto en función de la distancia. Esta información base se ajustó, a semivariogramas teóricos para modelar matemáticamente el proceso estocástico debido a la imposibilidad de utilizar de forma directa los semivariogramas experimentales en el método de interpolación *kriging*. Por otro lado, el *Join Count* como metodología de análisis espacial, permitió evaluar presencia/ausencia de MS en las plantas monitoreadas y el estadístico de prueba Índice de Moran fue útil para probar autocorrelación espacial entre patrones de puntos o sitios de infección de la enfermedad.

### 3.5 Conclusiones

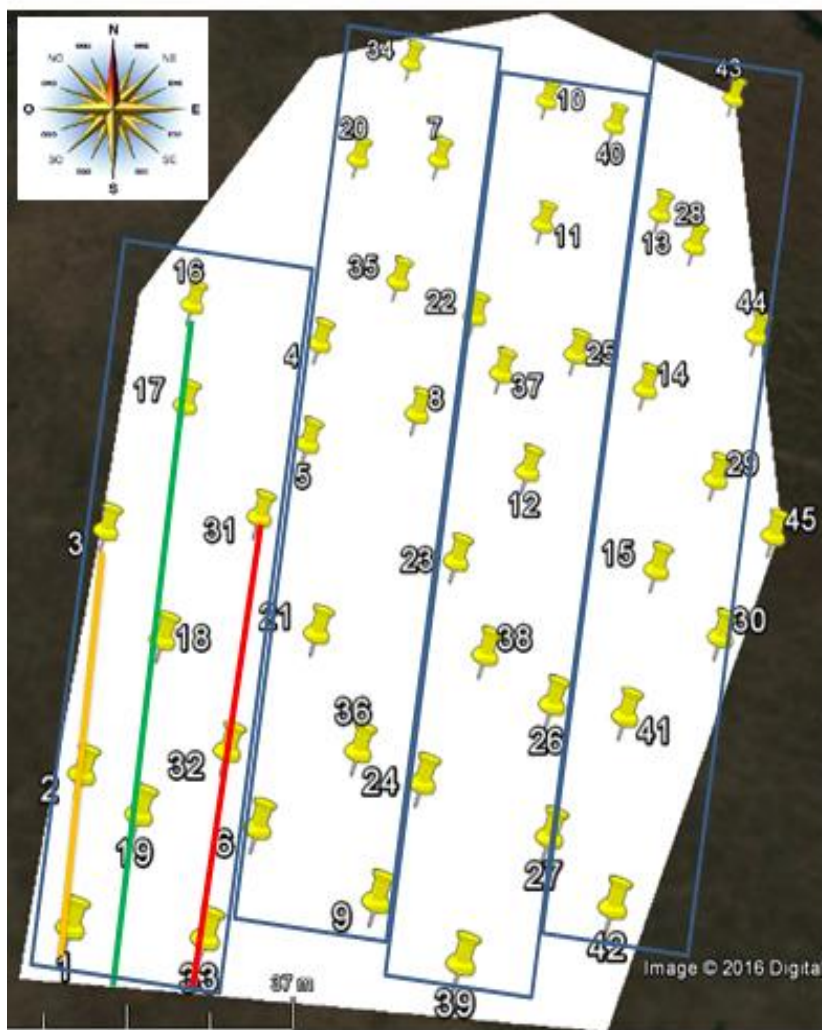
Las condiciones experimentales dadas en el lote de cultivo y el enfoque de análisis espacial empleado, contribuyó al entendimiento de la dinámica espacial de dos enfermedades limitantes en tres clones de cacao en la Orinoquía Colombiana. Estos análisis prueban su gran importancia en el diseño a futuro, de estrategias de manejo de epidemias de gran incidencia fitopatológica, a través, por ejemplo, del diseño espacial de plantaciones en donde materiales vegetales con grados de tolerancia a enfermedades, puedan ser ubicados estratégicamente, sin sacrificar productividad ni calidad.

La alta humedad relativa, característica de la zona donde fue establecido el experimento, parece ser el factor climático más influyente en el desarrollo de las epidemias de PNF y MS. Esta condición de humedad relativa y las características propias de los mecanismos de dispersión de estas enfermedades, se relacionaron con una mayor incidencia de PNF y menor de MS. La dinámica del progreso de las enfermedades PNF y MS a través de la aparición de focos de infección en sitios específicos donde se encontraban clones con características de susceptibilidad definidas, reflejó condiciones conductivas de la aparición de la enfermedad bajo las condiciones experimentales dadas. Sin embargo, es necesario realizar estudios experimentales con tiempos de evaluación más robustos, en condiciones de época lluviosa y seca, para estudiar la dinámica epidemiológica más precisa de estas enfermedades, teniendo en cuenta las características propias del triángulo de enfermedad: hospedante susceptible–patógeno virulento–ambiente propicio.

De acuerdo a los resultados obtenidos en este estudio bajo las condiciones experimentales dadas, y en concordancia con lo reportado con Ramírez (2016) en plantaciones de Antioquia-Colombia, se infiere que la PNF fue la epidemia más predominante en el lote de cultivo ubicado en El Yopal (Casanare)-Colombia comparada con MS, enfermedad que ha sido referenciada previamente como la de mayor impacto negativo en el país.

### 3.6 Anexos capítulo II

Anexo 1. Lote experimental del cultivo productivo de cacao monitoreado en campo.



### 3.7 Bibliografía

- Alves MC, Pozza EA, Machado JC, Araújo DV, Talamini V, Oliveira MS. Geostatistics as methodology to study the space-time dynamics of diseases transmitted by seed-borne *Colletotrichum* spp. *Fitopatol Bras.* 2006;31:557–563. Doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-41582006000600004>
- Alves MC, Pozza EA. Indicator kriging modeling epidemiology of common bean anthracnose. *Appl Geomat.* 2010;2:65-72. Doi:10.1007/s12518-010-0021-1
- Agrios GN. *Plant Pathology*. 5 ed. San Diego: Academic Press; 2004. p. 126-138.
- Aime MC, Phillips-Mora W. The causal agents of witches' broom and frosty pod rot of cacao (*Theobroma cacao* L.) form a new lineage of Marasmiaceae. *Mycol.* 2005;97(5):1012-1022. Doi: 10.3852/mycologia.97.5.1012
- Arciniegas A, Phillips MW. Caracterización de genotipos superiores de cacao seleccionados por el programa de mejoramiento genético del CATIE por su rendimiento y/o resistencia a moniliasis. En: Libro de resúmenes, International Cocoa Research Conference: proceedings actes. San José, Costa Rica; 2006. p. 21-25.
- Burrough PA, McDonnell RA. *Principles of geographical information systems*. New York: Oxford University Press; 1998. p. 97-124.
- Cabi. *Moniliophthora roreri* (frosty pod rot). In: *Invasive Species Compendium*. Cent for Agricul Bioscien Inter. 2015. Available in: <http://www.cabi.org/isc/datasheet/40979>. Cited: 13 Jun 2016.
- Cabi. *Phytophthora megakarya* (black pod of cocoa). In: *Invasive Species Compendium*. Cent for Agricul Bioscien Inter. 2016. Available in: <http://www.cabi.org/isc/datasheet/40979>. Cited: 13 Jun 2016.
- Campbell CL, Madden LV. *Introduction to plant disease epidemiology*. New York: Wiley Editorial; 1990. p. 53-90.
- Collet C, Schneuwly D, Caloz R. Discrete spatial distributions 2016. Available in: <http://www.gitta.info/DiscrSpatVari/en/text/DiscrSpatVari.pdf>. Cited: 03 Ago 2016.
- Corpoica. Caracterización de clones de cacao por respuesta a monilia (*Moniliophthora roreri*) en Santander. Corp Col de Invest Agro. 2004. Available in: <http://conectarural.org/sitio/sites/default/files/documentos/CARACTERIZACIO>

N%20DE%20CLONES%20DE%20CACAO%20POR%20RESPUESTA%20A%20MONILIA%20%20EN%20SANTANDER. Cited: 19 Sep 2016.

- Correa JS, Castro S, Coy J. Estado de la moniliasis del cacao causada por *Moniliophthora roreri* en Colombia. Acta Agron. 2014;63(4):388-399. Doi: <https://doi.org/10.15446/acag.v63n4.42747>
- Deberdt PM, Fegue CV, Tondje PR, Bon MC, Ducamp M, Hurard C, *et al.* Impact of environmental factors, chemical fungicide and biological control on cacao pod production dynamics and black pod disease (*Phytophthora megakarya*) in Cameroon. Biological Control. 2008;44:149-159. Doi: 10.1016/j.biocontrol.2007.10.026
- Despreaux D, Cambrony D, Clement D, Nyasse S, Partiot M. Study of cocoa black pod in Cameroon: description of new control methods. In: Proceedings of the Tenth International Cocoa Research Conference. Santo Domingo, República Dominicana; 1987. p. 407-412.
- Dormann CF, McPherson JM, Araújo MB, Bivand R, Bolliger J, Carl G, Davies RG, *et al.* Methods to account for spatial autocorrelation in the analysis of species distributional data: a review. Ecograp. 2007;30(5):609-628. Doi:10.1111/j.2007.0906-7590.05171.x
- Evans HC, Commonwealth Mycological Institute (Great Britain). Pod rot of cacao caused by *Moniliophthora (Monilia) roreri*. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, 1981. 44 p.
- Evans HC. New developments in black pod epidemiology. Cocoa Research Institute. Coco Grow Bullet. 1973;20:10-16.
- Florez E, Corredor D. Análisis espacial de las poblaciones de *Frankliniella occidentalis* (Pergande) en un cultivo de fresa bajo cubierta, como soporte en las decisiones de manejo integrado de plagas. Agron Colom. 2000;17:25-42.
- González L. Efecto de las fuentes de inóculo sobre las posibilidades de combate de la moniliasis del cacao. En: primeras jornadas de investigación. UCR. San José, Costa Rica; 1981. p. 228-229.
- ICA. El ICA apoya Plan Nacional de Renovación de Cacao. Instituto Colombiano Agropecuario, ICA Comunica. 2013. Available in: <http://www.ica.gov.co/Periodico-Virtual/Prensa/2013/El-ICA-apoya-Plan-Nacional-de-Renovacion-de-Cacao.aspx>. Cited: 25 Ene 2016.
- Jaimes Y, Aránzazu F. Manejo de las enfermedades del cacao (*Theobroma*

- cacao L.) en Colombia, con énfasis en *Monilia (Moniliophthora roreri)*. In: Hoyos L.M., editor. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria, Corpoica, Colombia. 2010; 90 p.
- Jaimes Y, Aránzazu F, Rodríguez E, Martínez N. Behavior of introduced regional clones of *Theobroma cacao* toward the infection *Moniliophthora roreri* in three different regions of Colombia. *Agron Colom.* 2011;29(1):361-371.
  - Madden LV, Hughes G. Plant disease incidence: Distributions, heterogeneity and temporal analysis. *Annu Rev of Phytopath.* 1995;33:529–564. Doi: 10.1146/annurev.py.33.090195.002525
  - Madden LV, Hughes G. Sampling for plant disease incidence. *Phytopath.* 1999;89(11):1088-1101. Doi: 10.1094/PHYTO.1999.89.11.1088.
  - McMahon P, Purwantara A. *Phytophthora* on cocoa. In: Drenth A, Guest D, editors. *Diversity and Management of Phytophthora in Southeast Asia*, 1ra. Ed. Australian Centre for International Agricultural Research. 2004;114:104-115.
  - Merritt RN, Orum TV, Garcia RJ. Applications of Geographic Information Systems and Geostatistics in Plant Disease Epidemiology and Management. *Plan Diseases.* 1999;83(4):308-319. Doi: <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS.1999.83.4.308>
  - Moral F. Aplicación de la geoestadística en las ciencias ambientales. *Ecosist.* 2004;13:78-86.
  - Phillips-Mora W, Castillo JK, Rodríguez E, Wilkinson MJ. Evaluation of cacao (*Theobroma cacao*) clones against seven Colombian isolates of *Moniliophthora roreri* from four pathogen genetic groups. *Plant Pathol.* 2005;54(4):483-490. Doi: 10.1111/j.1365-3059.2005.01210.x
  - Phillips-Mora W, Aime MC, Wilkinson MJ. Biodiversity and biogeography of the cacao (*Theobroma cacao*) pathogen *Moniliophthora roreri* in tropical America. *Plant Pathol.* 2007;56:911-922. Doi: 10.1111/j.1365-3059.2007.01646.x
  - Phillips-Mora W, Wilkinson MJ. Frosty pod of cacao: A disease with a limited geographic range but unlimited potential of damage. *Phytopathol.* 2007;97:1644-1647. Doi: 10.1094/PHYTO-97-12-1644.
  - Pizzato JA, Araújo D, Galvanin E, Junior JR, Matos A, Vecchi M, Zavislak F. Geostatistics as a Methodology for Studying the Spatiotemporal Dynamics of *Ramularia areola* in Cotton Crops. *Amer Jour Plant Scien.* 2014;5:2472-2479. Doi:10.4236/ajps.2014.515262

- Plantegenest M, Le May C, Fabre F. Landscape epidemiology of plant diseases. *JR Soc Inter.* 2007;16(4):963-972. Doi: 10.1098/rsif.2007.1114
- Ramírez JG. Pérdidas económicas asociadas a la pudrición de la mazorca del cacao causada por *Phytophthora* spp. y *Moniliophthora roreri* (Cif y Par) Evans *et al.*, en la hacienda Theobroma, Colombia. *Rev de Prot Veg.* 2016; 31(1):42-49.
- Rodríguez E, Vera A. Identificación y manejo de la pudrición parda de la mazorca (*Phytophthora* sp.) en cacao. Corpoica: Bogotá, Colombia. 2015. 60. p.
- Rossi RE, Mulla DJ, Journel AG, Franz EH. Geostatistical Tools for modeling and interpreting ecological spatial dependence. *Ecol Monogra.* 1992;62(2):277-314. Doi: 10.2307/2937096
- Ten Hoopen M, Sounigo O, Babin R, Dikwe G, Cilas C. Spatial and temporal analysis of a *Phytophthora megakarya* epidemic in a plantation in the centre region of Cameroon. *Proceedings of the 16<sup>th</sup> International Cocoa Research Conference.* 2009. 683-687 p.
- van Maanen A, Xu XM. Modelling plant disease epidemics. *Europ J Plant Pathol.* 2003;109(7):669–682. Doi: 10.1023/A:1026018005613
- Wood GAR. Black pod meteorological factors. 2 ed. Londres: Gregory P.H Editorial; 1974. p. 112-135.

## Capítulo III

### 4. Impacto de la simbiosis de *Rhizophagus irregularis* con plántulas de cacao en la incidencia y severidad del tizón de plántulas

Palabras clave: *Rhizophagus irregularis*, *Phytophthora palmivora*, tizón de plántulas, prueba de infección, plántulas de cacao.

#### 4.1 Introducción

Aunque los HFMA se han estudiado en menor medida en su rol de protección contra patógenos de plantas comparado con su papel en la nutrición mineral y el ciclaje de nutrientes, se ha identificado que varios géneros de HFMA se relacionan con mecanismos asociados a la habilidad de proteger plantas contra patógenos (Pozo y Azcón-Aguilar, 2007), significando que los HFMA son un grupo de microorganismos promisorios que reducen enfermedades en plantas (Tchameni *et al.*, 2011; Plenchette *et al.*, 2005).

Así mismo, se ha reconocido que distintas especies de HFMA pueden generar efectos diferenciales en cuanto a la fisiología y crecimiento entre hospederos dado que existen amplias variaciones en la toma de nutrientes entre las distintas especies de HFMA mediadoras (Jakobsen *et al.* 1992; van der Heijden *et al.* 1998, 2003; Smith *et al.* 2000; van Aarle *et al.* 2002 citado por Wehner *et al.*, 2009), donde las relaciones entre una especie de HFMA dada y su hospedero son altamente específicas (Herre *et al.*, 2007). Igualmente, en varios estudios con resultados contrastantes, se ha observado que la presencia de hongos FMA puede limitar de formas diferentes el daño causado

por patógenos en plantas cultivadas. También, se ha reportado la reducción de síntomas causados por patógenos de diferentes géneros y estilos de vida -biotrofos, necrotrofos, hemibiotrofos- (Pozo *et al.*, 2002; Yao *et al.*, 2002; Zhu y Yao, 2004; Nikhat *et al.*, 2004; Khaosaad *et al.*, 2007; Al-Hmoud y Abou, 2008; Amer y Norouzi *et al.*, 2009; Soukayna, 2012; Olawuyi *et al.*, 2013; Al-Momany, 2015).

En sistemas productivos de cacao en etapa de vivero, especies de *Phytophthora* son el problema fitosanitario de mayor impacto a nivel mundial (Anderson y Guest, 1990; Bowers *et al.*, 2001; McMahon y Purwantara, 2004; Richards *et al.*, 2011; Tchameni *et al.*, 2011; Prabha y ChandraMohan, 2014) y en Colombia (ICA, 2012; ICA, 2013). Su manejo convencional se basa en aplicaciones de fungicidas de síntesis química que impactan el medio ambiente y en la exclusión de plántulas sintomáticas que genera pérdidas económicas a los productores. Así mismo, la resistencia genética resulta ser la medida de control más prolongada en el tiempo y por tanto, más costosa debido a la inversión en el proceso para obtener variedades resistentes, donde adicionalmente, no existe una metodología estandarizada para evaluar la resistencia genética del germoplasma de cacao a *Phytophthora* spp. (Luz y Silva, 2001 citado por Hanada *et al.*, 2009).

Por todo lo anterior, y debido a que la expresión de enfermedad va más allá de la interacción planta-patógeno en el contexto de la asociación con micorrizas arbúsculares (Azcón *et al.*, 1996), la identidad o particularidad del organismo simbiote puede generar diferencias con respecto a esta interacción bidireccional (Borowitz, 2001; Herre *et al.* 2005; Herre *et al.*, 2007). Así, el uso del hongo FMA *Rhizophagus irregularis* puede constituirse en una herramienta adicional para el manejo integrado de la enfermedad causada por patógenos como *Phytophthora palmivora* en viveros de cacao. Sin embargo, es necesario entender las múltiples interacciones generadas entre estos agentes y plántulas de cacao.

## **4.2 Materiales y métodos**

### **4.2.1 Lugar de estudio**

Los diferentes procedimientos se realizaron en el campus Utopía de la Universidad de la Salle, ubicado en Yopal- Casanare. Los ensayos experimentales se llevaron a cabo

en un vivero ubicado en el campus con una temperatura media de 26.8°C y una humedad relativa media del 75%.

#### **4.2.2 Material fúngico**

*Rhizophagus irregularis*:

Se emplearon y multiplicaron cultivos *in vitro* del aislado canadiense DAOM 197198 de la especie del hongo FMA *Rhizophagus irregularis* (CAN). También, se empleó el producto comercial GLOMYGEL® que contiene propágulos del hongo *R. irregularis*.

*Phytophthora palmivora*:

Se empleó y multiplicó la cepa C9 del oomycete *Phytophthora palmivora* aislada a partir de frutos de cacao y proporcionada por el banco de microorganismos de CENIPALMA.

*Trichoderma asperellum*:

Se utilizó y multiplicó la cepa H4562 del microorganismo antagonista *Trichoderma asperellum*, proveniente del stock de microorganismos del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia. Este organismo se empleó como control positivo en la evaluación de control biológico de la enfermedad, dando sustento a la funcionalidad del control en el patosistema *P. palmivora* – plántulas de cacao.

#### **4.2.3 Material vegetal**

Se emplearon plántulas de cacao del clon IMC-67 de FEDECACAO, obtenidas a partir de semilla.

#### **4.2.4 Sustratos de siembra**

Para la siembra y cultivo del material vegetal se empleó un sustrato compuesto por arena-suelo en una proporción 1:1, esterilizado con el producto de síntesis química Basamid® (Dazomet). El suelo empleado fue colectado a partir de un bosque de galería cercano al lugar de experimentación. La mezcla fue sometida a incubación bajo el efecto del producto esterilizante, empleando una capa de plástico que cubrió el sustrato por un período de ocho días. Posteriormente este fue dispuesto en bolsas de

polietileno negro de 3 kg de capacidad para la etapa de siembra.

#### **4.2.5 Metodología**

La estrategia metodológica general se compuso de un procedimiento discriminado en tres etapas experimentales: 1. Caracterización de *P. palmivora* y producción de inóculo. 2. Prueba de infección de *P. palmivora* en plántulas de cacao, realizada con el fin de estandarizar una metodología para la inoculación de *P. palmivora* en las plántulas y generar enfermedad. y 3. Establecimiento del ensayo para evaluar el efecto de la simbiosis de HFMA con plántulas de cacao sobre el tizón o marchitez de plántulas.

#### **4.2.6 Caracterización de *P. palmivora* y producción de inóculo**

Se caracterizó la morfología macroscópica y microscópica del aislamiento patogénico C9 de *P. palmivora* procedente de frutos de cacao y proporcionado por CENIPALMA. Se emplearon 20 repeticiones (platos) del aislamiento para la evaluación macroscópica y 10 repeticiones (platos) para la caracterización microscópica (Rodríguez y Vera, 2015). Las variables macroscópicas evaluadas de acuerdo con las metodologías propuestas por Erwin y Ribeiro (1996) y Cerqueira *et al.* (1999) fueron: Crecimiento radial de la colonia en centímetros (Brasier y Griffin 1979), patrón de crecimiento de la colonia, desarrollo aéreo del micelio, color, borde y morfología.

La caracterización microscópica se basó en una identificación y medición microscópica de estructuras asexuales (clamidosporas y esporangios) en colonias con 15 días de crecimiento. Para la determinación del tamaño del esporangio, pedicelo y clamidospora se realizaron montajes de estructuras teñidas con azul de lactofenol en láminas portaobjetos (CMI, 1985; Dhingra y Sinclair, 1986). Estas mediciones se realizaron con un microscopio binocular Primo Star marca Carl Zeiss, usando el objetivo de 40x y el software de fotografía Zen lite 2011 (CMI, 1985; Dhingra y Sinclair, 1985).

Adicionalmente, con base en la metodología descrita por Erwin y Ribeiro (1996), se caracterizaron las siguientes propiedades: presencia o ausencia de clamidosporas, posición de las clamidosporas (terminales o intercalares), forma del esporangio, desprendimiento del esporangio (mayor o menor facilidad de éste para desprenderse

del esporangióforo, característica que permite clasificarlos en caedizos —si se desprenden fácilmente— y no caedizos —si se desprenden difícilmente—), tamaño del pedicelo, relación largo:ancho del esporangio (L:A), formato del esporangio: papilado, semipapilado o no papilado (Erwin y Ribeiro, 1996).

El aislamiento se multiplicó en medios de cultivo sólido y líquido específicos según el procedimiento estandarizado descrito en el Anexo 1. Para la activación de la virulencia del patógeno se realizó el procedimiento en el laboratorio descrito en el Anexo 2.

#### **4.2.7 Producción de inóculo**

El inóculo de infección se compuso de una suspensión de zoosporas de *P. palmivora*, obtenidas a partir de cultivos de 10 días de edad con base en la metodología reportada por Nyassé *et al.* (1995). Brevemente, los inóculos fueron sometidos a cuatro días de oscuridad y seis días bajo una duración alternada de luz-oscuridad (12 horas bajo luz blanca y 12 horas en la oscuridad) en medio agar-zanahoria incubado a 25°C. Cultivos con esporangios fueron inducidos a liberar zoosporas por adición de agua destilada estéril a 4°C (Dhingra y Sinclair, 1995). Después de una hora a temperatura ambiente, las concentraciones de zoosporas fueron ajustadas a  $3 \times 10^5$  y  $3 \times 10^8$  zoosporas  $\text{mL}^{-1}$  con ayuda de una cámara de Neubauer o hematocitómetro. La primera concentración ha sido reportada como óptima en estudios de infección en frutos y hojas de cacao por Nyassé *et al.* (1995) y Okey (1996) con base en el experimento previo de inoculación de *P. palmivora* en cinco clones de cacao realizado por Nyassé *et al.* (1995).

#### **4.2.8 Experimento I**

##### **Experimento I: Prueba de inoculación de *P. palmivora* en plántulas de cacao**

##### **Métodos de inoculación**

**Inoculación en suelo:** El procedimiento de inoculación usado se basó en la metodología reportada por Tchameni *et al.* (2011). Se inocularon plántulas de 30 días de edad. El suelo o sustrato presente en las bolsas de siembra fue infectado depositando 3 ml de agua destilada estéril conteniendo la suspensión de zoosporas de

*P. palmivora*, en las concentraciones definidas según la Tabla 1. La aplicación del inóculo se hizo en forma de corona o alrededor del tallo de cada plántula, dónde se realizó un canal circular de medio centímetro de profundidad aproximadamente y teniendo en cuenta un radio de aplicación de 5 cm aproximadamente desde la base de este. El sitio de inoculación fue cubierto nuevamente con sustrato esterilizado. Dos grupos de 50 plántulas fueron inoculadas con las concentraciones de  $3 \times 10^5$  y  $3 \times 10^8$  zoosporas de *P. palmivora* respectivamente. 50 plántulas de 30 días de edad ubicadas en un vivero distante, correspondieron al tratamiento control en las que se aplicaron 3 ml de agua destilada estéril sin inóculo.

**Inoculación en hojas:** Se empleó el método de inoculación de *P. palmivora* en plántulas de cacao reportado por Sriwati (2012; 2015). Brevemente, se inocularon plántulas de 30 días de edad. La suspensión de zoosporas con las concentraciones de  $3 \times 10^5$  y  $3 \times 10^8$  de *P. palmivora* fue aplicada sobre cada plántula según el tratamiento correspondiente, usando un pulverizador o atomizador manual (Nyandu *et al.*, 2009), para un total de 50 plántulas inoculadas por tratamiento de concentración. Para la evaluación del tratamiento control (sin inoculación del patógeno), se emplearon plántulas de 30 días de edad en un vivero aparte, a las cuales se asperjó 3 ml de agua destilada estéril mediante atomizador manual.

### **Evaluación de la enfermedad**

La expresión de la severidad de la enfermedad fue evaluada siete ddi (días después de la inoculación) del patógeno con base en la escala desarrollada por Nyasse *et al.* (1995). Valores de 0 a 5 puntos fueron estimados según el tamaño de lesión en las hojas, donde:

- 0 = ausencia total del desarrollo de síntomas;
- 1 = se observan puntos de penetración en el sitio de inoculación;
- 2 = se observan puntos de penetración conectados;
- 3 = presencia clorosis;
- 4 = necrosis somera
- 5 = aparición de grandes lesiones necróticas o necrosis verdadera

Así, el índice de intensidad de la infección o severidad de la enfermedad se determinó para cada tratamiento calculando la relación: suma de puntaje individual en la escala para cada plántula sobre el número total de plántulas usadas. Adicionalmente, se

estudió el comportamiento de la enfermedad mediante un análisis de la intensidad con la cual se presentó en el hospedero, esto es, valoraciones de incidencia y severidad en plántulas de cacao en relación con el tiempo (Tahi *et al.*, 2006).

### Diseño experimental

Se siguió un diseño experimental en bloques al azar con cinco repeticiones y cinco tratamientos según la Tabla 1. La unidad experimental consistió en 10 plántulas de cacao con 30 días después de siembra (dds).

**Tabla 1.** Tratamientos experimentales para prueba de inoculación *P. palmivora*.

Tratamiento	Descripción	Densidad de inóculo (zoosporas ml <sup>-1</sup> )
1	Inoculación en sustrato	3x10 <sup>5</sup>
2	Inoculación en sustrato	3x10 <sup>8</sup>
3	Inoculación en hoja	3x10 <sup>5</sup>
4	Inoculación en hoja	3x10 <sup>8</sup>
5	Control negativo	-----

Se realizaron evaluaciones de la incidencia y severidad de la enfermedad con una frecuencia de siete días. A partir de estos parámetros se construyó un índice de severidad con el cual se elaboró la curva de avance de la enfermedad. De la curva de la enfermedad se calculó el área bajo la curva (AUDPS). Los datos obtenidos se analizaron mediante un análisis de varianza y una prueba de comparación múltiple por Tukey. Mediante el análisis estadístico de los parámetros evaluados se determinó la densidad de inóculo y el sitio de inoculación óptimo para la expresión y desarrollo de la enfermedad en plántulas de cacao. El manejo agronómico de las plántulas experimentales se realizó con base en el protocolo del Anexo 3 del capítulo III.

### Experimento II: Efecto de la simbiosis de HFMA con plántulas de cacao sobre el tizón o muerte regresiva de plántulas.

#### Método de inoculación

Se empleó el método de inoculación en hojas de las plántulas, descrito con detalle en la sección métodos de inoculación del experimento I.

## Diseño experimental

El ensayo se llevó a cabo en condiciones de vivero con una temperatura media de 26.8°C y una humedad relativa del ambiente de 75%. Se realizó un diseño experimental de bloques al azar con cinco repeticiones y seis tratamientos según la tabla 2. La unidad experimental correspondió a 10 plántulas de cacao con 30 dds, sobre las cuales se midieron las siguientes variables con una frecuencia de siete días durante cuatro semanas: incidencia y severidad de tizón de plántulas, altura y peso seco de plántulas. La inoculación de *R. irregularis* se llevó a cabo al momento de la siembra. El patógeno fue inoculado a los 30 dds, siguiendo la metodología seleccionada en la etapa 2. El ensayo tuvo una duración aproximada de dos meses. El análisis de los datos se realizó por medio de la varianza y una prueba de comparación múltiple de Tukey. El manejo agronómico de las plántulas experimentales se realizó con base en el protocolo del Anexo 3 del capítulo III.

**Tabla 2.** Tratamientos experimentales para evaluación del impacto de la simbiosis de *R. irregularis* y plántulas de cacao sobre el tizón de plántulas.

Tratamiento	Descripción	Ausencia (-) y/o Presencia (+)
1	Control absoluto	- HFMA - <i>P. palmivora</i>
2	Control agua	+ Agua + <i>P. palmivora</i>
3	<i>Trichoderma asperellum</i>	+ Trichoderma sp .+ <i>P. palmivora</i>
4	<i>Rhizophagus irregularis</i> aislado Glomygel	+ HFMA (Glomygel®) + <i>P. palmivora</i>
5	<i>Rhizophagus irregularis</i> aislado Cánada (CAN)	+HFMA (línea CAN) + <i>P. palmivora</i>

## 4.3 Resultados

### 4.3.1 Resultados caracterización de la cepa patogénica C9 de *P. palmivora*.

Las características macroscópicas y microscópicas evaluadas de la cepa C9 de *P. palmivora* (CENIPALMA) se presentan en las tablas 3 y 4 respectivamente, de acuerdo con las metodologías propuestas por Cerqueira *et al.* (1999), Erwin y Ribeiro (1996).

**Tabla 3.** Caracterización macroscópica de la cepa C9 de *P. palmivora* (CENIPALMA). Valores medios para 20 réplicas (platos) del aislamiento +/- error estándar de la media.

<b>Caracterización macroscópica cepa C9 <i>P. palmivora</i></b>	
Crecimiento radial de la colonia (cm)	3,66 cm
Patrón de crecimiento de la colonia	Irregular
Desarrollo aéreo del micelio	Elevado
Color	Blanco
Borde	Ondulado

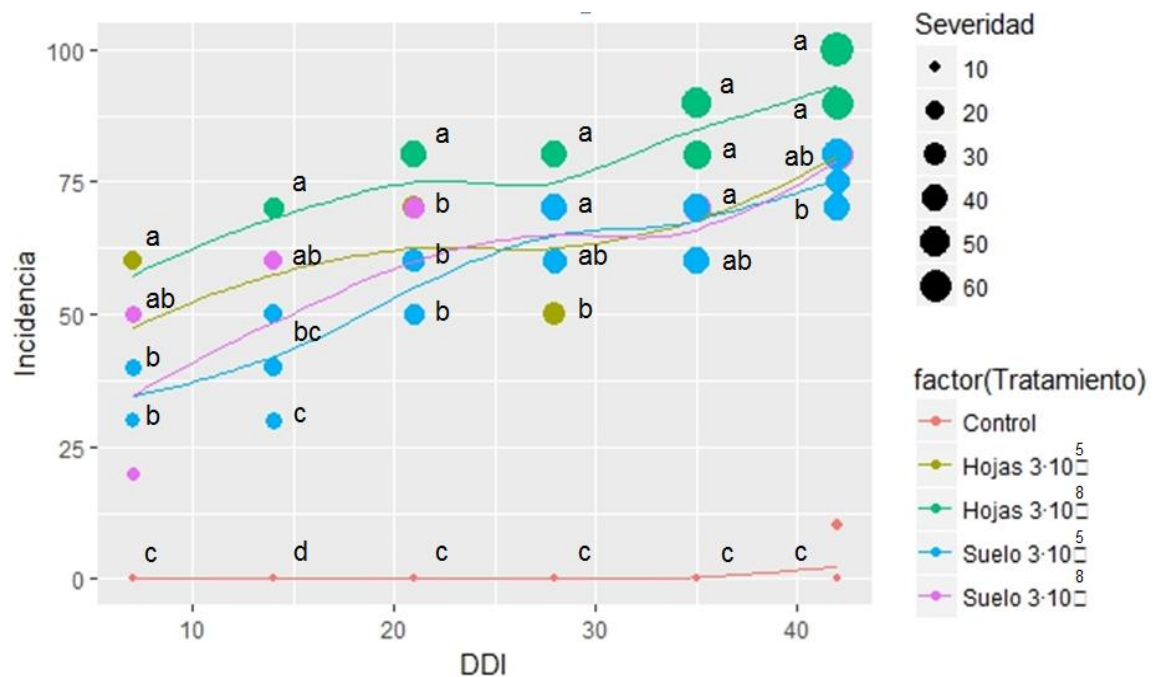
**Tabla 4.** Caracterización microscópica de la cepa C9 de *P. palmivora* (CENIPALMA). Valores medios para 10 réplicas (platos) del aislamiento +/- error estándar de la media.

<b>Caracterización microscópica cepa C9 <i>P. palmivora</i></b>	
Presencia/ausencia de clamidosporas	Ausencia
Posición de clamidosporas	No aplica
Forma del esporangio	Elipsoide
Desprendimiento del esporangio	Caduco
Tamaño del pedicelo	Corto
Relación largo : ancho del esporangio	51 $\mu$ m x 35 $\mu$ m
Formato del esporangio	Papilado

#### **4.3.2 Resultados experimento I: Prueba de inoculación de *P. palmivora* en plántulas de cacao.**

Los efectos de la inoculación de *P. palmivora* en plántulas de cacao se presentan por medio del modelo de análisis de un diseño de medidas repetidas doblemente multivariado. El efecto principal es significativo y la interacción entre el tiempo y el tratamiento también. Es decir, existen diferencias estadísticas significativas entre los componentes de estos factores y su interacción (Anexo 4: Tablas 5.1, 5.2, 5.3, 5.4).

Todos los tratamientos de inoculación con *P. palmivora*, en las concentraciones dadas (Tabla 1), provocaron enfermedad en las plántulas de cacao experimentales. El tratamiento control también presentó expresión de la enfermedad en condiciones naturales de vivero (sin inoculación), sin embargo, en las plantas control, el máximo porcentaje de incidencia fue de 2 % y el mayor nivel de severidad alcanzado correspondió a 9.5 % (Fig. 1).



**Figura 1.** Intensidad de la enfermedad por efecto de los tratamientos de inoculación de *P. palmivora* en plántulas de cacao. La significancia estadística de tratamientos fue determinada por ANOVA. Tratamientos seguidos por la misma letra no difieren estadísticamente por el test de Tukey ( $p < 0.05$ ). Valores medios para cinco replicas +/- error estándar de la media. DDI: días después de inoculación

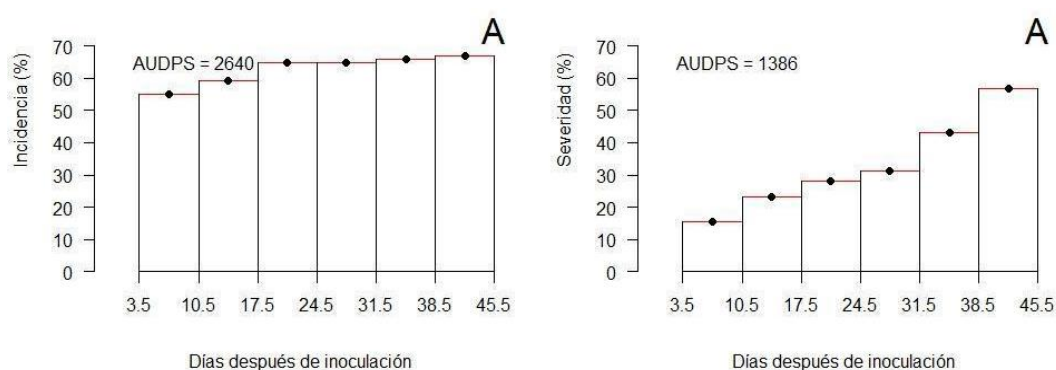
En general, los mayores niveles de incidencia de la enfermedad se obtuvieron bajo la inoculación de *P. palmivora* en hojas, donde el tratamiento de mayor concentración ( $3 \times 10^8$  zoosporas  $\text{mL}^{-1}$ ) presentó diferencias estadísticas significativas a los 21 y 35 días después de inoculación (ddi) respecto a los demás tratamientos, lo cual coincide con lo encontrado en el MANOVA (Anexo 4, Tabla 5.5). El mayor porcentaje de incidencia alcanzado por este tratamiento fue del 66%.

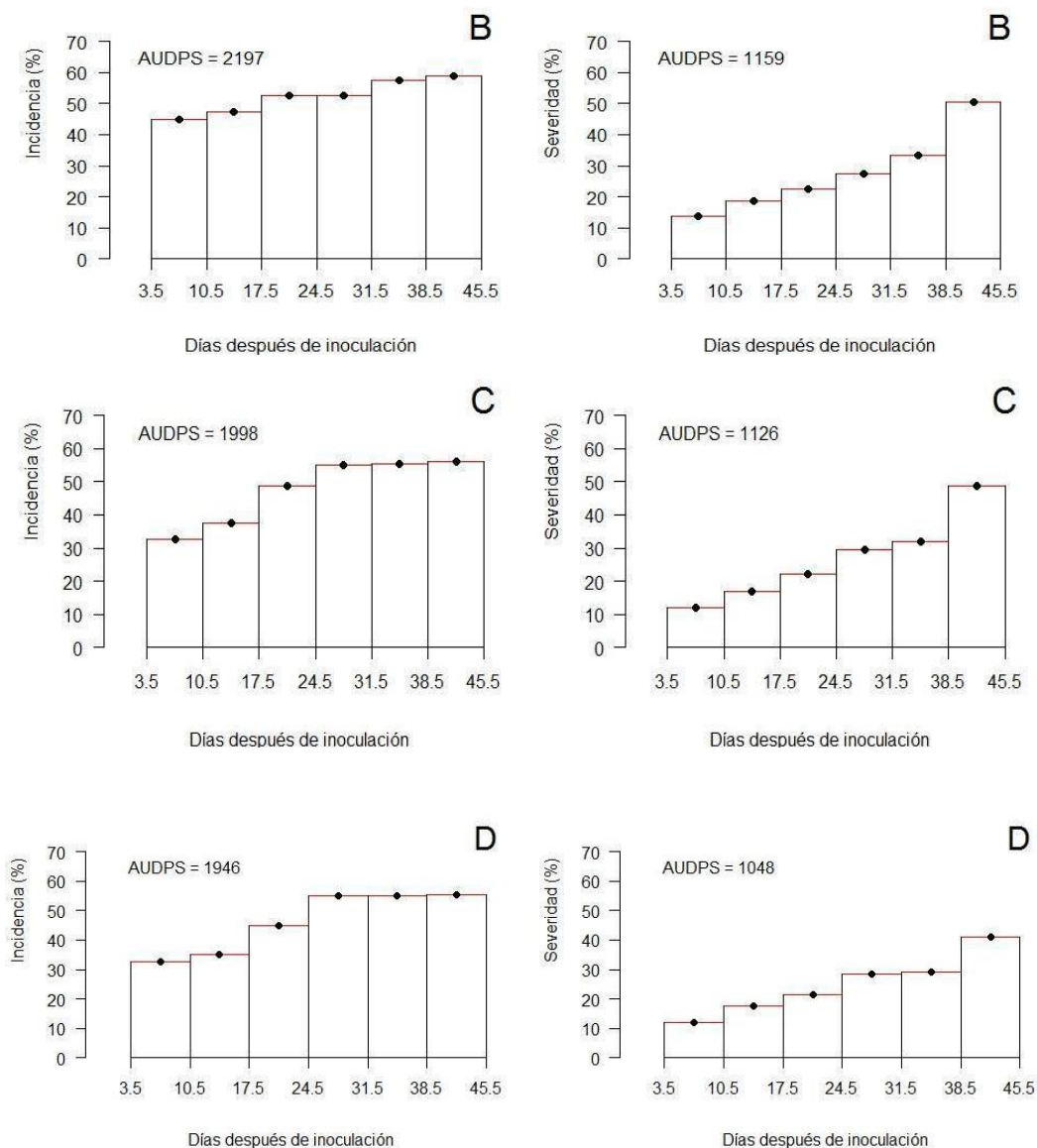
Los tratamientos de inoculación dirigida al suelo, presente en las bolsas de siembra, registraron valores de incidencia inferiores al 50 % hasta los 21 ddi. En las evaluaciones siguientes los valores incrementaron, pero no superaron, en general, los alcanzados por los tratamientos de inoculación dirigida al follaje. Sin embargo, no hubo

diferencias estadísticas entre los tratamientos de inoculación en suelo y el de inoculación en hojas a menor concentración ( $3 \times 10^5$  zoosporas  $\text{mL}^{-1}$ ) a partir de los 21 ddi en adelante (Fig. 1). Dentro de la evaluación de intensidad de la enfermedad por efecto de los tratamientos de inoculación con *P. palmivora* en hojas de plántulas de cacao, también se evidenció una respuesta diferencial en la variable severidad a lo largo del tiempo (Fig. 1).

El tratamiento de inoculación del patógeno a la mayor concentración ( $3 \times 10^8$  zoosporas  $\text{mL}^{-1}$ ) resultó en los niveles más altos de severidad de la enfermedad en las hojas de plántulas de cacao. Se presentaron diferencias estadísticas significativas entre todos los tratamientos (Fig. 1).

En la Fig. 2, se observan las áreas bajo la curva de progreso de la enfermedad (AUDPS) obtenidas para todos los tratamientos de inoculación. El porcentaje de incidencia en las plantas inoculadas en las hojas con una concentración de  $3 \times 10^8$  zoosporas presentaron un AUDPS de 2640, el área se redujo un 16,8% para las plantas inoculadas también en hojas, pero a una concentración de zoosporas de  $3 \times 10^5$ . Los inóculos dispuestos en el suelo fueron menos infectivos, la concentración de zoosporas de  $3 \times 10^8$  en suelo fue menor en un 24,32% y la de  $3 \times 10^5$  en un 26,29%, respecto al mejor tratamiento. Las plantas inoculadas en las hojas con una concentración de  $3 \times 10^8$  zoosporas presentaron un AUDPS de 1386 con respecto a la severidad, la concentración de  $3 \times 10^5$  zoosporas en suelo reporta un AUDPS menor hasta en un 18,76%. Concentraciones de zoosporas de  $3 \times 10^5$  tanto en hojas como en suelo desarrollaron menor severidad y por tanto menor AUDPS con una diferencia de 19,66 y 24,75%, respectivamente.





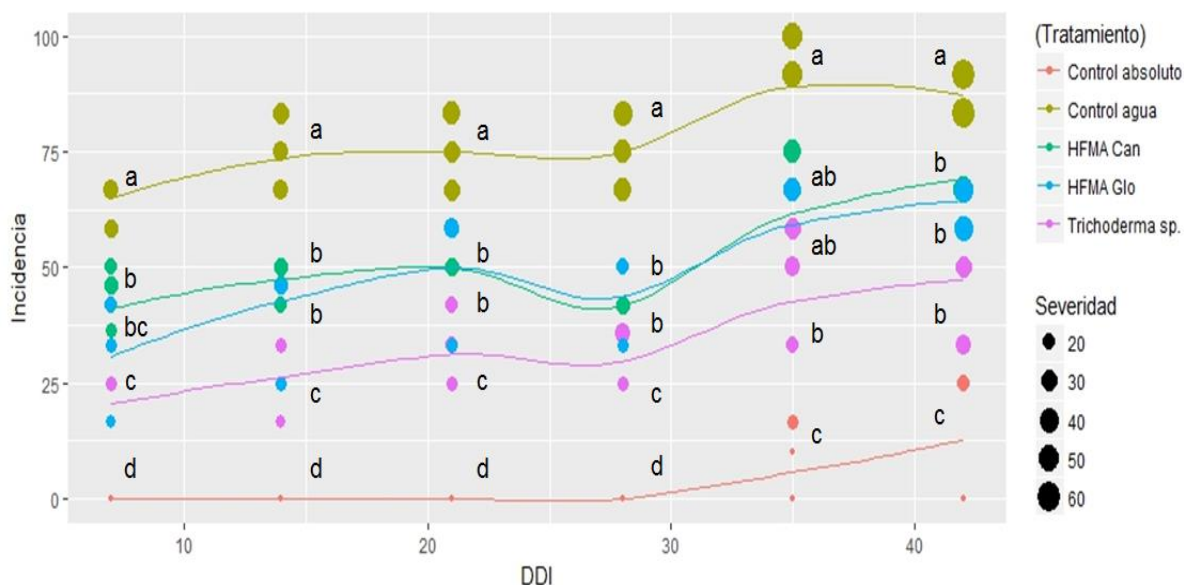
**Figura 2.** Área bajo la curva de progreso de la enfermedad (AUDPS). Prueba de infección. A, inoculación de  $3 \times 10^8$  zoosporas en hojas. B, inoculación de  $3 \times 10^5$  zoosporas en hojas. C, inoculación de  $3 \times 10^8$  zoosporas en suelo. D, inoculación de  $3 \times 10^5$  zoosporas en suelo.

### 4.3.3 Resultados experimento II: efecto de la simbiosis de HFMA con plántulas de cacao sobre el tizón o muerte regresiva de plántulas.

Se presentan los efectos de la simbiosis de *R. irregularis* con plántulas de cacao inoculadas con *P. palmivora*, por medio de un modelo de análisis o diseño de medidas repetidas doblemente multivariado. El efecto principal es fuerte y la interacción entre el tiempo y el tratamiento también. Es decir, existen diferencias significativas dadas por

estos factores y su interacción (Anexo 5: Tablas 5.6, 5.7, 5.8, 5.9, 5.10).

Las medias de incidencia de la enfermedad, expresada en las plántulas por efecto de los tratamientos de inoculación con HFMA, fueron significativamente diferentes a las asociadas con los controles (Fig. 3). La inoculación de HFMA y *Trichoderma* sp. significó una reducción notable en los niveles de incidencia de la enfermedad para todos los tiempos de evaluación. Las plántulas bajo el efecto de *Trichoderma* sp. presentaron los menores valores de incidencia.

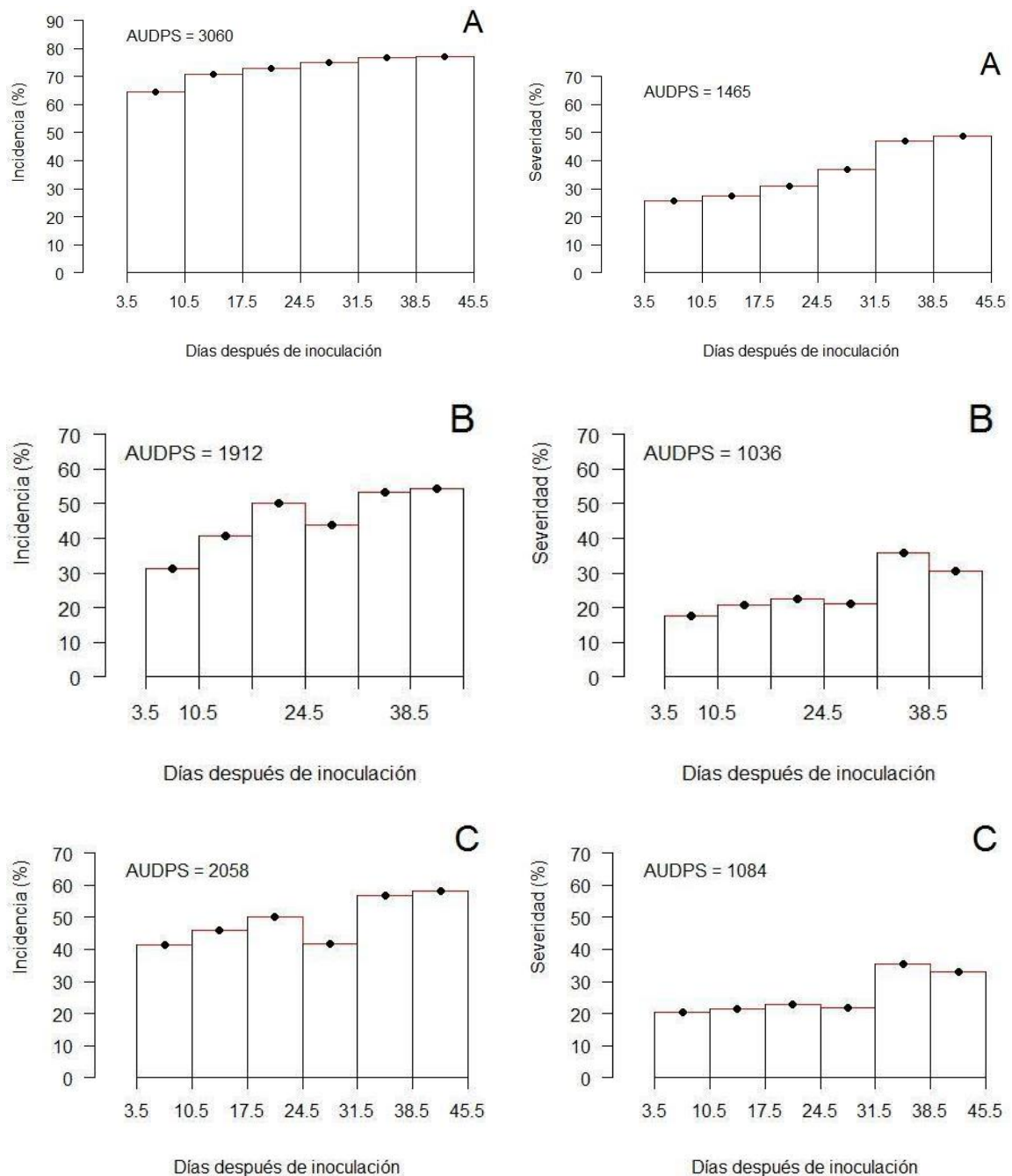


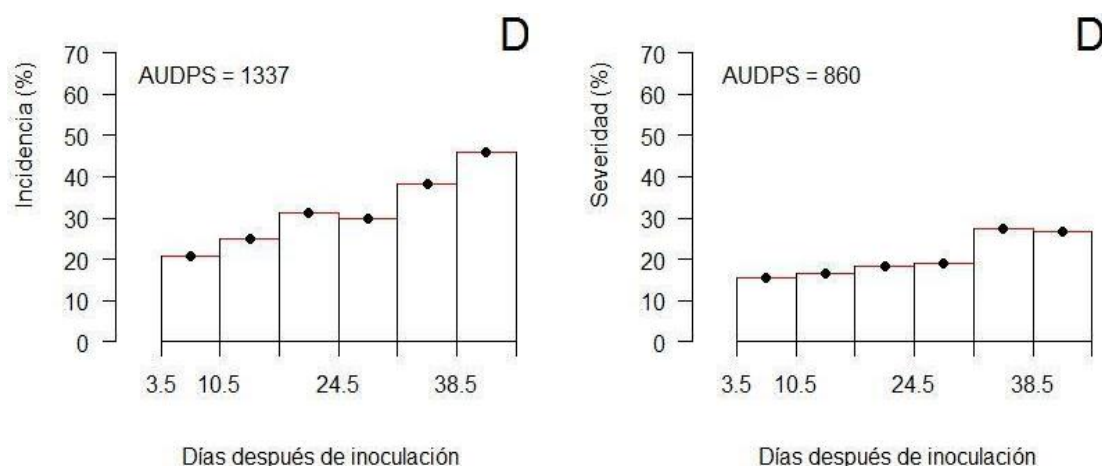
**Figura 3.** Intensidad de la enfermedad por efecto de los tratamientos de inoculación de HFMA en plántulas de cacao. La significancia estadística de tratamientos fue determinada por ANOVA. Tratamientos seguidos por la misma letra no difieren estadísticamente por el test de Tukey ( $p < 0.05$ ). Valores medios para cinco replicas +/- error estándar de la media. DDI: días después de inoculación.

Esta reducción en la incidencia de *P. palmivora* correspondió a valores entre un 22.9% y 33.3% bajo el efecto de HFMA y entre un 31.3% y 43.8% bajo el efecto de *Trichoderma* sp. En términos de severidad de la enfermedad, se presentaron diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos de inoculación de HFMA y los controles (Fig. 3).

Los resultados presentados en la Fig. 3 concuerdan con los reportados en la Fig. 4, donde se observan valores respectivos de AUDPS que soportan los efectos de los HFMA sobre el progreso de la enfermedad (B, C).

Las plantas control absoluto presentaron expresión de la enfermedad bajo condiciones naturales de vivero en este experimento, sin embargo, esta fue observada a partir de los 47 dds y su valor máximo alcanzó valores de incidencia de 12.5 % durante el tiempo de evaluación.





**Figura 4.** Área bajo la curva de progreso de la enfermedad (AUDPS). Prueba de HFMA. A, Control agua. B, HFMA Glomygel. C, HFMA CAN. D, *Trichoderma* sp.

El mayor porcentaje de incidencia de la enfermedad en condiciones de vivero se registró en las plantas control agua (a las que se aplicó agua y *P. palmivora*), con un AUDPS resultante de 3060. El área bajo la curva se redujo en un 37,52% para las plantas inoculadas con HFMA Glo y en un 32,73% para aquellas inoculadas con HFMA CAN. La reducción generada por la presencia de *Trichoderma* sp. fue de un 56,31%. El AUDPS de la severidad para el tratamiento control agua fue de 1465, donde el área se redujo en un 29,29% para las plantas inoculadas con HFMA Glo y en 27,38% para aquellas inoculadas con HFMA CAN; la reducción generada por la presencia de *Trichoderma* sp. fue de un 41,30%. En la Fig. 4 no se reporta el tratamiento control absoluto porque la expresión de la enfermedad fue mínima.

## 4.4 Discusión

### 4.4.1 Experimento I: Prueba de inoculación de *P. palmivora* en plántulas de cacao.

El clon IMC67, empleado ampliamente en viveros comerciales del país, presentó expresión de la enfermedad al ser inoculado *P. palmivora* tanto en suelo como en hojas de las plántulas bajo las metodologías empleadas en este estudio. La intensidad de la enfermedad alcanzó niveles máximos al final del experimento, exponiendo las plántulas a una fuerte presión de inóculo dada por la mayor concentración empleada ( $3 \times 10^8$  zoosporas  $\text{mL}^{-1}$ ) en hojas.

Este comportamiento puede explicarse por las características propias de

susceptibilidad de este material clonal a *Phytophthora* spp. Varios estudios han reportado las características de susceptibilidad de IMC67 a este patógeno. Rodríguez y Vera (2015) en un estudio exploratorio de resistencia de diferentes clones de cacao en Colombia, reportan al clon IMC67 como “moderadamente susceptible” a la infección por *Phytophthora* spp. Tahi *et al.* (2000) por su parte, estudiaron la resistencia a la inoculación de *P. palmivora* en hojas, tallos y raíces de plántulas en ocho clones de cacao, dónde IMC67 se encontró entre los clones resistentes a la enfermedad. Posteriormente, Tahi *et al.* (2006) evaluaron la resistencia foliar a *P. palmivora* en los mismos clones de cacao en cuatro estadios de desarrollo de hoja y tres tiempos de incubación, encontrando similares resultados de resistencia para IMC67.

Iwaro *et al.* (1997) por su parte, evaluaron la inoculación y resistencia a *P. palmivora* en hojas y frutos de 12 clones de cacao en los estados de penetración y pospenetración del patógeno para identificar la relación de resistencia entre estados y sitios de infección. Para el caso particular del clon IMC67, encontraron que, aunque no presentó diferencias significativas en el número de lesiones (penetración) respecto a la mayoría de clones evaluados, si obtuvo mayores valores en tamaño de lesión (pospenetración) comparado con gran parte de los clones. Esto se atribuyó a características clonales propias frente a la infección como espesor de cutícula o frecuencia estomatal de hojas (estomas que sirven como estructuras de entrada a *P. palmivora*) (Iwaro *et al.*, 1995).

Así mismo, la edad de las plántulas (30 dds) al momento de la inoculación de *P. palmivora* fue una condición conductiva para la expresión significativa del tizón de plántulas de cacao en vivero. Prabha y ChandraMohan (2014) argumentan que la incidencia de *P. palmivora* en plántulas de cacao, bajo condiciones naturales, es más acentuada entre los 15 y 60 días de edad, con niveles de infección entre 78 y 25% respectivamente, hallazgos que les llevaron a concluir que la enfermedad se reduce en función de la edad de las plántulas. Así mismo, otros reportes describen mayor susceptibilidad a la infección por *Phytophthora palmivora* en hojas jóvenes de cacao comparado con hojas de mayor edad (Nyadanu *et al.*, 2009; Nyassé *et al.*, 1995; Tahi *et al.*, 2006).

En este estudio, al realizar la inoculación de *P. palmivora* en plántulas de 30 dds, se evidenció un porcentaje significativo de infección acorde a lo reportado por Prabha y

ChandraMohanán (2014) para esta edad de plántulas. Sin embargo, el porcentaje de plántulas infectadas aumentó con el tiempo y hasta el final de la evaluación (45 ddi / 75 dds), contrastado a lo reportado por estos autores quienes hallaron porcentajes menores de plántulas infectadas a los 60 dds respecto a plántulas de 30 dds. Por lo tanto, se debe tener en cuenta que el momento (edad de plántulas) de inoculación conduce a niveles de infección diferentes en plántulas de cacao (Kellam y Zentmyer, 1986; Prabha y ChandraMohanán, 2014).

Por otro lado, las enfermedades asociadas a *Phytophthora* se han relacionado a una dinámica activa en el suelo. Kellam y Zentmyer (1986) por ejemplo, evaluaron patogenicidad de cepas de *P. palmivora*, *P. capsici* y *P. citrophthora* a nivel de raíces en plántulas de cacao bajo condiciones de vivero, donde a los 60 ddi de clamidosporas y oosporas en un sustrato artificial. El porcentaje de plántulas infectadas fue de 100% para *P. palmivora*, 93% para *P. citrophthora* y 40% para *P. capsici*, concluyendo que estas estructuras de reproducción, el sitio y el momento de inoculación evaluados, son apropiados para infectar plántulas de cacao, aún empleando distintas especies de *Phytophthora*. No obstante, en razón de la existencia natural de la infección de *Phytophthora* spp. en partes aéreas de las plantas, reportada ampliamente en cacao a nivel de tallos y hojas (McMahon y Purwantara, 2004; Guest, 2007), en este estudio se inoculó el patógeno tanto en suelo como en hojas de las plántulas.

En este sentido, la asociación patogénica o no patogénica con raíces de cacao puede perpetuar el inóculo para la infección de partes aéreas de las plantas (Kellam y Zentmyer, 1986). Esto puede explicarse por la dispersión de estructuras móviles de propagación (zoosporas) que se encuentran en el suelo (campo) o sustrato (vivero), a través de mecanismos físicos como el salpique de agua en forma de gotas de lluvia o riego, alcanzando órganos cercanos a la superficie del suelo como frutos, tallos y hojas (Gregory, 1984; McMahon y Purwantara, 2004). También, las hormigas pueden constituir un vector importante de dispersión vertical de inóculo, transportando estructuras de infección de *Phytophthora* spp. contenidas en microgotas adheridas a su cuerpo o procesos de mirmecocoria desde el suelo hacia órganos aéreos (Evans, 1973; Gregory, 1984). Estos mecanismos explican la relación de dispersión de la enfermedad desde el suelo hacia las partes aéreas de la planta.

Así, la inoculación en estos dos sitios (suelo y hojas) fue un factor de variación en los

niveles de infección que oscilaron entre 35 y 75% desde los 7 hasta 45 ddi de *P. palmivora*. Por tanto, sumado al momento (edad), el sitio de inoculación en la plántula fue otro factor conductivo determinante para la expresión de enfermedad. En este estudio, aunque se presentó alta variabilidad en los niveles de infección por efecto de los factores mencionados, se pudo establecer la concentración de zoosporas de *P. palmivora* y el sitio de inoculación apropiado para generar los mayores niveles de infección en las plántulas, bajo las condiciones experimentales dadas. La elección de hacer inoculación del patógeno en hojas con una concentración de  $3 \times 10^8$  zoosporas  $\text{mL}^{-1}$ , se tradujo en mayores niveles de intensidad de la enfermedad. Sin embargo, estos niveles no reflejan la naturaleza de presión de inóculo existente en viveros comerciales. Por esto, es necesario realizar estudios de seguimiento sobre las cantidades de inóculo presentes en condiciones de infección natural en viveros productivos de cacao en el país.

Finalmente, pruebas de inoculación como la abordada en este estudio, pueden aportar como metodología base para la evaluación de resistencia a *Phytophthora* spp. en plantas de cacao adultas, ya que se ha evidenciado una relación directa de las características de resistencia entre hojas y frutos de cacao (Iwaro *et al.* 1995). Iwaro *et al.* (1995) encontraron una correlación entre resistencia de hojas y frutos no significativa para el estado de penetración (número de lesiones), mientras que el estado de resistencia pos-penetración (tamaño de lesión) fue significativa y positiva. Este hecho determina que la resistencia de tejidos internos es común entre hojas y frutos e indica que la resistencia en hojas en estado pos-penetración de infección puede ser usada como indicador para predecir la resistencia en frutos.

Así mismo, futuros trabajos deben contemplar parámetros que permitan dilucidar mecanismos intrínsecos de plántulas de cacao como respuesta a la infección por *Phytophthora* sp., tales como daños oxidativos (Bela *et al.*, 2015), depósitos de calosa (Arcos y Narro, 2009), síntesis de metabolitos secundarios, etc. Es por esto que en este trabajo se hizo una aproximación a los mecanismos de respuesta “tempranos” de plántulas de cacao, a partir del análisis de la actividad guayacol peroxidasa (GPX) y de deposición de calosa al inocular con *P. palmivora*.

## 4.4.2 Experimento II

### **Experimento II: efecto de la simbiosis de HFMA con plántulas de cacao sobre el tizón o muerte regresiva de plántulas.**

Este estudio presenta la primera evaluación sobre el efecto del hongo FMA *R. irregularis* en la expresión de *P. palmivora* en plántulas de cacao, en condiciones de vivero comercial. Así, esta investigación representa una confirmación puntual que la simbiosis con HFMA tiene un significativo impacto en las interacciones planta - patógeno planteada por autores como Pozo y Azcón-Aguilar (2007), en condiciones reales de producción de plántulas de cacao. En reportes recientes, se ha presentado el rol de otras especies de HFMA y/o *Trichoderma* sp. en el patosistema plántulas de cacao – *Phytophthora* sp., que ha sido abordado en este trabajo.

Sriwati *et al.* (2015) evidenciaron una reducción de hasta un 59% de la infección por *Phytophthora palmivora* en plántulas de cacao inoculadas con tres especies de *Trichoderma*: *T. virens*, *T. asperellum* y *T. longibrachiatum*. Por su parte, Tchameni *et al.* (2011) reportaron una reducción significativa de *Phytophthora megakarya* en plántulas de cacao bajo el efecto de la inoculación separada de *Trichoderma asperellum* y dos especies de HFMA. Sin embargo, hasta el momento, los efectos de la interacción puntual entre *R. irregularis* y el patosistema plántulas de cacao - *P. palmivora* no han sido explorados, ni se ha incursionado en el análisis de respuestas de defensa “tempranas” producto de esta interacción, a través de indicadores como la actividad GPX y de deposición de calosa expuestos en este trabajo.

Las diferencias encontradas en la reducción de la intensidad de la enfermedad por efecto de la inoculación de *R. irregularis*, proporcionó evidencia sobre la capacidad de esta especie de HFMA en inducir o mejorar la resistencia a *P. palmivora* en plántulas de cacao. Sin embargo, su efecto de protección fue ligeramente menor que el reportado por Tchameni *et al.* (2011) al inocular las especies de HFMA *Gigaspora margarita* y *Acaulospora tuberculata* en plántulas de cacao expuestas a *P. megakarya*. Al respecto, se ha reconocido que distintas especies de HFMA pueden generar efectos diferentes en limitar el daño causado por patógenos en plantas (Wehner *et al.*, 2009). También, las relaciones entre una especie de HFMA dada y su hospedero son altamente específicas (Herre *et al.*, 2007; Sanders y Rodríguez, 2016). De esta

manera, se pueden explicar resultados contrastantes en el control de patógenos por efecto de diferentes especies de HFMA inoculadas en plantas como lo mencionan ampliamente Dehne (1982), Lindermann (1994) y Dugassa *et al.* (1996). Lo anterior evidencia que la funcionalidad de la interacción involucra más que al hospedero y al patógeno, y que la identidad o particularidad del organismo benéfico puede generar diferencias con respecto a esta interacción bidireccional (Herre *et al.*, 2007).

Por otra parte, la reducción observada en la incidencia y severidad de la enfermedad no fue similar entre los tratamientos de inoculación con *R. irregularis* y *Trichoderma* sp., donde este último tuvo el mayor efecto de protección contra *P. palmivora*. Esto puede explicarse por los diferentes modos de acción y/o activación de mecanismos de defensa por *Trichoderma* sp. y el hongo FMA *R. irregularis*. Como agentes de control de patógenos, se reporta que especies de *Trichoderma* spp. en general, desempeñan un mecanismo basado en el micoparasitismo (Martínez *et al.*, 2013). En HFMA, varios son los mecanismos planteados: antagonismo, micoparasitismo, antibiosis y activación de los mecanismos propios de defensa del hospedero (Morandi *et al.*, 1985; Dugassa *et al.*, 1996; Nikhat *et al.*, 2004; Lioussane *et al.*, 2008). Incluso, se ha hipotetizado que la asociación con HFMA pueda activar más de un mecanismo de defensa en la planta (Azcón y Barea, 1996).

Así, se ha reportado que estas alteraciones en el hospedero van desde cambios en el balance hormonal y perfiles transcripcionales, hasta alteraciones del metabolismo primario y secundario (Hause *et al.* 2007; Liu *et al.* 2007; Schliemann *et al.* 2008; López-Ráez *et al.*, 2010), lo que significa que la simbiosis con HFMA implica una reprogramación significativa de funciones en la planta. El establecimiento de la simbiosis implica alteraciones en la fisiología de la planta hospedera y tiene un claro impacto en la respuesta de ésta al estrés biótico (Pozo *et al.*, 2010).

Múltiples estudios han evaluado la protección contra enfermedades a partir de HFMA en un significativo grupo de patógenos y sus hospederos (Dehne, 1982; Graham 1986; Roger y Mosse, 2004; Pozo *et al.*, 2010). Sin embargo, aún existen vacíos en el conocimiento sobre los mecanismos involucrados en este rol de los HFMA en varios patosistemas (Hooker *et al.*, 1994; Linderman, 1994; Pozo *et al.*, 2010). Por esto, el presente estudio se direccionó en tratar de dilucidar mecanismos específicos inducidos de respuesta “temprana” en plántulas de cacao, al inocular *R. irregularis* (Cap. IV). Los

resultados encontrados (Fig. 3 y 4B-C) confirman los beneficios bióticos que se obtienen al inocular HFMA en general y muestran el uso potencial de *R. irregularis* específicamente en la mitigación de patógenos tan agresivos como *Phytophthora*, en un sistema agrícola de interés creciente en el país como el cacao.

Por otro lado, estudios sobre el efecto de HFMA en enfermedades foliares o aéreas son menos abundantes y menos concluyentes comparados con análisis de su impacto en enfermedades de suelo (Azcón y Barea, 1996; Pozo *et al.*, 2010). En enfermedades foliares, se ha reportado que los efectos de HFMA dependen en gran medida del estilo de vida y la estrategia de ataque del patógeno (Pozo y Azcón-Aguilar, 2007). En general, el grado de protección por HFMA varía con el tipo de patógeno involucrado, planta, suelo y condiciones ambientales (Azcón y Barea, 1996). Además, se ha reconocido que diferentes especies de HFMA afectan diferencialmente la protección contra patógenos de un hospedero y una especie particular de HFMA pueden afectar dos hospederos de formas distintas, lo que indica que diferentes combinaciones de HFMA y hospederos son funcionalmente diferentes (Herre *et al.*, 2007).

Azcón y Barea (1996) recomiendan el uso de HFMA “apropiados” para la protección contra enfermedades, preferiblemente en forma simultánea con otros microorganismos de suelo, antagónicos a patógenos. No obstante, en plántulas de cacao, se encontró que la inoculación simultánea con *Trichoderma asperellum* y HFMA no siempre resultó en beneficios positivos en el hospedero (Tchameni *et al.*, 2011). Por lo que se requiere ampliar estudios sobre inoculación simultánea. Sin embargo, es claro que el uso de HFMA durante la fase de vivero, genera efectos en la reducción del daño por *Phytophthora* spp. en hojas de plántulas de cacao (Herre *et al.*, 2007; Sriwati *et al.*, 2015; Tchameni *et al.*, 2011) y este trabajo lo corroboró bajo las condiciones experimentales dadas de la Orinoquía colombiana.

## 4.5 Conclusiones

El clon IMC67 de cacao presentó expresión de la enfermedad al ser inoculado *P. palmivora* en suelo y hojas de las plántulas bajo las metodologías empleadas en este estudio. La mayor intensidad de la enfermedad fue posible exponiendo las plántulas a una fuerte presión de inóculo dada por la mayor concentración utilizada ( $3 \times 10^8$  zoosporas mL<sup>-1</sup>) en hojas.

De acuerdo a los resultados obtenidos de reducción de la enfermedad en este patosistema, el hongo FMA *R. irregularis* puede constituirse en una herramienta complementaria potencial, no convencional, para el manejo preventivo de *P. palmivora* en plántulas de cacao. Esto contribuye a las estrategias de manejo integrado para combatir la enfermedad en fases tempranas en vivero, teniendo en cuenta que el mejoramiento genético para el hallazgo de clones de cacao con características de resistencia puede ser significativamente prolongado en el tiempo (Drenth y Guest, 2013).

## 4.6 Anexos capítulo III

### Anexo 1. Procedimiento para la propagación y multiplicación *in vitro* de *P. palmivora*.

Materiales:

- 1000 ml agua destilada
- Una zanahoria grande fresca
- 16 gramos de agar nutritivo
- Cuchara normal
- Tela Malla filtradora o coladora de orificios finos
- 1 balde plástico
- Plancha magnética
- Un agitador magnético
- Un guante
- 1 erlenmeyer de capacidad > 1000 ml

Procedimiento:

1. Pelar la zanahoria y pesar 120 gramos sin cáscara.
2. Licuar los 120 gr de zanahoria en el agua destilada (pedir prestado a las señoras de la cocina la licuadora).
3. Utilizar la malla o tela a manera de colador, y verter (colar) el jugo de zanahoria (1000 ml) con ayuda de una cuchara en el balde (previamente lavado). Tener cuidado de no dejar caer lo colado en el balde, solo el zumo.
4. Pesar 16 gramos de agar nutritivo y depositarlo en el frasco Erlenmeyer.
5. Verter el jugo de zanahoria colectado del balde en el frasco Erlenmeyer y mezclar con el agar con ayuda del agitador magnético sobre la plancha. Activar en alta temperatura hasta ebullición mientras se mezcla.

6. Servir en cajas Petri, bajo condiciones de cámara de flujo laminar con mecheros.



**Figura 5.** Procedimiento de multiplicación de *P. palmivora* en medios de cultivo.

## Anexo 2. Procedimiento para la activación de virulencia de *P. palmivora*.

Materiales:

- mazorcas de cacao completamente sanas, de edad intermedia.
- Papel toalla desinfectado
- Hipoclorito al 2%

Procedimiento:

1. Colectar frutos de cacao sanos en campo.
2. Desinfestar con hipoclorito al 2% durante 6 minutos por inmersión.
3. Enjuagar con agua destilada esterilizada y secar con papel toalla esterilizado.
4. Inocular el microorganismo en las mazorcas (hacer una herida y poner por punción

el micelio).

5. Colocar en cámara húmeda los frutos dentro de un recipiente plástico desinfectado previamente con alcohol al 96%, a la cual se coloca una toalla esterilizada, una tapa de una caja Petri estéril y 10 ml de agua destilada esterilizada. La tapa de la caja Petri es para colocar la toalla, humedecerla, colocar sobre ésta la tapa y encima de ésta el fruto de cacao para evitar el contacto con la toalla y finalmente tapar el recipiente.

6. Los frutos en la cámara húmeda van a demorar aproximadamente 3 a 4 días en mostrar lesiones, una vez observada la lesión de aproximadamente 4 a 5 cm de diámetro, tomar la zona de avance y sembrar de nuevo en el medio agar zanahoria.

7. Mantener los aislamientos con 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad a temperaturas promedio de 26 a 27 °C, si es fácil tener una incubadora, de lo contrario en condiciones de laboratorio.

### Anexo 3. Manejo agronómico de plántulas de cacao en vivero

Para el establecimiento de los ensayos en vivero se utilizaron semillas cosechadas máximo de tres días antes de la siembra y provenientes de plantas sanas, vigorosas, de buena producción procedentes de Arauca y pertenecientes al Clon IMC 67 de FEDECACAO. Estas semillas se sembraron bajo polisombra al 50% en bolsas de 3 Kg de capacidad con sustrato compuesto por arena – suelo en proporción 1:1 respectivamente, esterilizado previamente con el producto comercial fumigante Basamid® (i.a. Dazomet). Para un buen crecimiento en vivero, las plántulas tuvieron una separación o espaciamiento de 30 cm x 30 cm.

El riego se realizó manual y de manera localizada, a partir de controles diarios para mantener el sustrato a capacidad de campo. Sin embargo, se evitó el exceso de riego especialmente en los primeros 2 meses debido a que las plántulas de cacao son muy sensibles a anegamiento durante este período. Riegos una vez al día con 500 ml de agua por plántula es generalmente apropiado (Pinzón *et al.*, 2008).

Se realizó una fertilización edáfica a los 30 días después de siembra (dds) utilizando una dosis de Nitrogeno (5 g/plántula), P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (1 g/plántula) y K<sub>2</sub>O (0,5 g/plántula) (con base en ensayos previos de calibración de niveles críticos de nutrientes, realizados en la zona experimental).

#### Anexo 4. Estadística experimento I: Prueba de inoculación de *P. palmivora* en plántulas de cacao.

**Tabla 5.1.** Criterio de test MANOVA y estadísticos F exactos para la hipótesis de efecto no Response. El estadístico F para la raíz mayor de Roy es un límite superior, el estadístico F para Lambda de Wilks es exacto.

Estadístico	Valor	F-Valor	Num DF	Den DF	Pr > F
Lambda de Wilks	0.0009153	7640.59	2	14	<.0001
Traza de Pillai	0.9990847	7640.59	2	14	<.0001
Traza Hotelling-Lawley	1091.5121965	7640.59	2	14	<.0001
Raíz más grande de Roy	1091.5121965	7640.59	2	14	<.0001

**Tabla 5.2.** Criterio de test MANOVA y aproximaciones para la hipótesis de efecto no Response\*Treatment. El estadístico F para la raíz mayor de Roy es un límite superior, el estadístico F para Lambda de Wilks es exacto.

Estadístico	Valor	F-Valor	Num DF	Den DF	Pr > F
Lambda de Wilks	0.00494726	46.26	8	28	<.0001
Traza de Pillai	1.06984486	4.31	8	30	0.0015
Traza Hotelling-Lawley	186.01413674	314.27	8	17.83	<.0001
Raíz más grande de Roy	185.93282843	697.25	4	15	<.0001

**Tabla 5.3.** Criterio de test MANOVA y estadísticos F exactos para la hipótesis de efecto no Response\*Time. El estadístico F para la raíz mayor de Roy es un límite superior, el estadístico F para Lambda de Wilks es exacto.

Estadístico	Valor	F-Valor	Num DF	Den DF	Pr > F
Lambda de Wilks	0.00199787	299.72	10	6	<.0001
Traza de Pillai	0.99800213	299.72	10	6	<.0001
Traza Hotelling-Lawley	499.53341377	299.72	10	6	<.0001
Raíz más grande de Roy	499.53341377	299.72	10	6	<.0001

**Tabla 5.4.** Criterio de test MANOVA y aproximaciones para la hipótesis de efecto no Respuesta\*Tiempo\*Tratamiento. El estadístico F para la raíz mayor de Roy es un límite superior, el estadístico F para Lambda de Wilks es exacto.

Estadístico	Valor	F-Valor	Num DF	Den DF	Pr > F
Lambda de Wilks	0.00007257	6.98	40	24.607	<.0001
Traza de Pillai	2.85567892	2.25	40	36	0.0078
Traza Hotelling-Lawley	147.79655834	19.61	40	8.1176	<.0001
Raíz más grande de Roy	126.65585644	113.99	10	9	<.0001

**Tabla 5.5.** Análisis de medidas repetidas de la varianza. Tests de hipótesis para efectos Between Subjects.

Fuente	DF	Tipo III SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Tratamiento	4	75960.18162	18990.04540	675.48	<.0001
Error	15	421.69872	28.11325		

Anexo 5. Estadística experimento II: efecto de la simbiosis de HFMA con plántulas de cacao sobre el tizón o muerte regresiva de plántulas.

**Tabla 5.6.** Criterio de test MANOVA y estadísticos F exactos para la hipótesis de efecto no Response. El estadístico F para la raíz mayor de Roy es un límite superior. El estadístico F para Lambda de Wilks es exacto.

Estadístico	Valor	F-Valor	Num DF	Den DF	Pr > F
Lambda de Wilks	0.00253368	2755.78	2	14	<.0001
Traza de Pillai	0.99746632	2755.78	2	14	<.0001
Traza Hotelling-Lawley	393.68284740	2755.78	2	14	<.0001
Raíz más grande de Roy	393.68284740	2755.78	2	14	<.0001

**Tabla 5.7.** Criterio de test MANOVA y aproximaciones para la hipótesis de efecto no Respuesta\*Tratamiento. El estadístico F para la raíz mayor de Roy es un límite superior. El estadístico F para Lambda de Wilks es exacto.

Estadístico	Valor	F-Valor	Num DF	Den DF	Pr > F
Lambda de Wilks	0.00880472	33.80	8	28	<.0001
Traza de Pillai	1.32921647	7.43	8	30	<.0001
Traza Hotelling-Lawley	74.18452675	125.34	8	17.83	<.0001
Raíz más grande de Roy	73.66335991	276.24	4	15	<.0001

**Tabla 5.8.** Criterio de test MANOVA y estadísticos F exactos para la hipótesis de efecto no Respuesta\*Tiempo. El estadístico F para la raíz mayor de Roy es un límite superior. El estadístico F para Lambda de Wilks es exacto.

Estadístico	Valor	F-Valor	Num DF	Den DF	Pr > F
Lambda de Wilks	0.00800500	74.35	10	6	<.0001
Traza de Pillai	0.99199500	74.35	10	6	<.0001
Traza Hotelling-Lawley	123.92198164	74.35	10	6	<.0001
Raíz más grande de Roy	123.92198164	74.35	10	6	<.0001

**Tabla 5.9.** Criterio de test MANOVA y aproximaciones para la hipótesis de efecto no Respuesta\*Tiempo\*Tratamiento. El estadístico F para la raíz mayor de Roy es un límite superior. El estadístico F para Lambda de Wilks es exacto.

Estadístico	Valor	F-Valor	Num DF	Den DF	Pr > F
Lambda de Wilks	0.00095793	3.23	40	24.607	0.0015
Traza de Pillai	2.59678916	1.67	40	36	0.0619
Traza Hotelling-Lawley	60.57478810	8.04	40	8.1176	0.0020
Raíz más grande de Roy	53.75612467	48.38	10	9	<.0001

**Tabla 5.10.** Análisis de medidas repetidas de la varianza. Tests de hipótesis para efectos Between Subjects

Fuente	DF	Tipo III SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Tratamiento	4	66160.42646	16540.10662	248.47	<.0001
Error	15	998.51358	66.56757		

### Anexo 6. Material fotográfico experimental.





**Figura 6.** Manejo agronómico de plántulas de cacao en vivero.

## 4.7 Bibliografía

- Azcón C. y J.M. Barea. 1996. Arbuscular mycorrhizas and biological control of soil-borne plant pathogens – a overview of the mechanisms involved. Springer 6,457-464.
- Brasier C.M. y M.J. Griffin. 1979. The taxonomy of *Phytophthora palmivora* on cocoa. T Brit Mycol Soc. 72(1): 111-143.
- Cerqueira A.O., E.D.M.N. Luz y C.S. Rocha. 1999. Caracterização morfológica e biométrica de alguns isolados de *Phytophthora* spp. da micoteca do Centro de Pesquisas do Cacau. Fitopatol Bras. 24: 114-119.
- CMI (Commonwealth Mycological Institute). 1985. Manual para patólogos vegetales. Commonwealth Agricultural Bureaux. London 438 p.
- Dehne H.W. 1982. Interaction between vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi and plant pathogens. Phytopathology 72: 1115–1119.
- Dhingra O.D. y J.B. Sinclair, 1995. Basic Plant Pathology Methods, 2. ed. C.R.C. Press. Boca Ratón. Florida 355 p.
- Dugassa G.D., V. Alten y F. Schonbeck. 1996. Effects of arbuscular mycorrhiza (AM) on health of *Linum usitatissimum* L. infected by fungal pathogens. Plant and Soil 185:173-182.
- Erwin D.C. y O.K. Ribeiro. 1996. *Phytophthora* diseases worldwide. St. Paul: The American Phytopathological Society.
- Gregory P.H., M.J. Griffin, A.C. Maddison, M.R. Ward. 1984. Cocoa black pod: a reinterpretation. Cocoa Growers Bulletin, 35: 5–21.
- Hause B., C. Mrosk, S. Isayenkov, D. Strack. 2007. Jasmonates in arbuscular mycorrhizal interactions. Phytochem 68: 101–110.
- Herre E. A., L.C. Mejía, D.A. Kylo, E. Rojas, Z. Maynard, A. Butler y S.A. Van. 2007. Ecological Implications of anti-pathogen effects of tropical fungal endophytes an mycorrhizae. Ecology 88 (3): 550-558.
- Hooker J.E., M. Jaizme-Vega, D. Atkinson. 1994. Biocontrol of plant pathogens using arbuscular mycorrhizal fungi. In: Gianinazzi S, Schüepp H (eds) Impact of arbuscular mycorrhizas on sustainable agriculture and natural ecosystems. Birkhäuser, Basel, pp 191–200.
- ICA (Instituto Colombiano Agropecuario). 2013. Manejo fitosanitario del cultivo del cacao (*Theobroma cacao* L.) Medidas para la temporada invernal. Bogotá.
- ICA (Instituto Colombiano Agropecuario). 2013. El ICA apoya Plan Nacional de

Renovación de Cacao. En: ica comunica, <http://www.ica.gov.co/Periodico-Virtual/Prensa/2013/El-ICA-apoya-Plan-Nacional-de-Renovacion-de-Cacao.aspx>; consulta: Agosto 2015.

- Iwaro A. D. 1995. Mechanisms of resistance to *Phytophthora palmivora* (Butler) Butler in cacao (*Theobroma cacao* L.) and their genetic basis. Ph. D. Thesis, Department of Plant Science, The University of the West Indies, St. Augustine, Trinidad.
- Iwaro A.D., T. N. Sreenivasan y P. Umaharan. 1997. Foliar Resistance to *Phytophthora palmivora* as an indicator of Pod Resistance in *Theobroma cacao*. Plant Dis. 81: 619-624.
- Kellam M.K. y G.A. Zentmyer. 1986. Morphological, physiological, ecological y pathological comparisons of *Phytophthora* species isolated from *Theobroma cacao*. Phytopathology 76:159-164
- Linderman R.G. 1994 Role of VAM fungi in biocontrol. In: Pflieger FL, Linderman RG (eds.) Mycorrhizae and plant health. APS, St Paul, pp 1–26
- Liu J., I. Maldonado-Mendoza, M. Lopez-Meyer, F. Cheung, C.D. Town, M.J. Harrison. 2007. Arbuscular mycorrhizal symbiosis is accompanied by local and systemic alterations in gene expression and an increase in disease resistance in the shoots. Plant J 50: 529–544.
- López-Ráez J.A., A. Verhage, I. Fernández, J.M. García, C. Azcón-Aguilar, V. Flors, M.J. Pozo. 2010. Hormonal and transcriptional profiles highlight common and differential host responses to arbuscular mycorrhizal fungi and the regulation of the oxylipin pathway. J Exp Bot 61, 2589–2601
- Martínez B., D. Infante, Y. Reyes, 2013. *Trichoderma spp.* y su función en el control de plagas en los cultivos. Rev. Protec Vegetal. 28(1):1-11
- McMahon P. y A. Purwantara. 2004. Phytophthora on cocoa pp. 104-115. En: André Drenth y David I. Guest (Eds.), Diversity and Management of *Phytophthora* in Southeast Asia, 1ra. Ed. Australian Centre for International Agricultural Research. Monograph No. 114, 238pp
- Meyer J.R. y R.G. Linderman. 1986. Selective influence on populations of rhizosphere or rhizoplane bacteria and actinomycetes by mycorrhizas formed by *Glomus fasciculatum*. Soil Biol Biochem 18: 191–196
- Morandi D.G. y G. Pearson. 1985. Influence of mycorrhizal infection and phosphate nutrition on secondary metabolite contents of soybean roots. INRA,

Paris.

- Nikhat S. y S.A. Naqvi. 2004. Mycorrhiza in management of fruits and vegetables diseases. Diseases of fruits and vegetables: volume II, India.
- Okey E.N., E.J. Duncan, G. Sirju-Charran, T.N. Sreenivasan. Factors affecting the susceptibility of six cocoa clones to *Phytophthora palmivora* (Butl.) Butler bark canker in Trinidad. Plant Pathol. 45 (1): 84-91
- Prabha K. y R. ChandraMohan. 2014. Management of cocoa seedling blight caused by *Phytophthora palmivora*. Plant. Archiv. 14: 461-463
- Plenchette C., C. Clermont-Dauphin, J.M. Meynard, J.A. Fortin. 2005. Managing arbuscular mycorrhizal fungi in cropping systems. Can. J. Plant Sci. 85: 31-40.
- Pozo y Azcón-Aguilar. 2007. Unraveling mycorrhiza-induced resistance. Curre. Opi. in Plant Biol. 10. 393-398
- Pozo M.J., S.C. Jung, J. A. López-Ráez, C. Azcón-Aguilar. 2010. Impact of Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis on Plant Response to Biotic Stress: The Role of Plant Defence Mechanisms. H. Koltai and Y. Kapulnik (eds.), *Arbuscular Mycorrhizas: Physiology and Function*, DOI 10.1007/978-90-481-9489-6\_9, Springer Science
- Rodríguez E. y A.G. Vera. 2015. Identificación y manejo de la pudrición parda de la mazorca (*Phytophthora* sp.) en cacao. En: Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria -Corpoica-, [http://digitool.gsl.com.mx:1801/webclient/StreamGate?folder\\_id=0&dvs=1478733468175~59](http://digitool.gsl.com.mx:1801/webclient/StreamGate?folder_id=0&dvs=1478733468175~59). 60 p.; consulta: septiembre 2016.
- Roger T. y B. Mosse. 2004. A history of research on arbuscular mycorrhiza. Mycorrhiza 14:145-163.
- Schliemann W., C. Ammer, D. Strack. 2008. Metabolite profiling of mycorrhizal roots of *Medicago truncatula*. Phytochem 69: 112–146
- Tahi G.M., I. Kebe, A.B. Eskes, S. Ouattara, A. Sangare, F. Mondeil. 2000. Rapid screening of cocoa genotypes for field resistance to *Phytophthora palmivora* using leaves, twigs and roots. Eur J Plant Pathol 106: 87–94.
- Tahi G.M., B.I. Kebe, J.A.K. N'Goran, A. Sangare, F. Mondeil, C. Cilas, A.B. Eskes. 2006. Expected selection efficiency for resistance to cacao pod rot (*Phytophthora palmivora*) comparing leaf disc inoculations with field observations. Euphy. 149: 35–44
- Tahi G.M., B.I. Kebe, A.B. Eskes, S. Ouattara, A. Sangare, F. Mondeil. 2006.

Rapid Screening of Cacao Genotypes for Field Resistance to *Phytophthora palmivora* Using Leaves, Twigs and Roots. Eur. Jour. Of Plant Pathol. 106: 87–94

- Tchameni S.N., M.E.L. Ngonkeu, B.A.D. Begoude, L. Wakam, R. Fokom, A.D. Owona, J.B. Mbarga, T. Tchana, P.R. Tondje, F.X. Etoa, J. Kuate. 2011. Effect of *Trichoderma asperellum* and arbuscular mycorrhizal fungi on cacao growth and resistance against black pod disease. Crop Protection 30: 1321-1327
- Wehner J. P., P. Antunes, J.R. Powell, J. Mazukatow, M.C. Rillig. 2009. Plant pathogen protection by arbuscular mycorrhizas: A role for fungal diversity?. Pedobi 2009.10.002.



## Capítulo IV

### 5. Efecto de *Rhizophagus irregularis* sobre la actividad guayacol peroxidasa (GPX) y deposición de calosa en plántulas de cacao inoculadas con *Phytophthora palmivora*

Palabras clave: cacao, calosa, guayacol peroxidasa, resistencia, *Rhizophagus irregularis*.

#### 5.1 Introducción

Distintos mecanismos de defensa son desarrollados por las plantas (Somssich y Hahlbrock, 1998). Estos son regulados por una red interconectada de vías de señalización donde diferentes fitohormonas cumplen una función central. La alteración en las vías de señalización de ácido salicílico - ácido jasmónico y cambios en la expresión de genes asociados a defensa, resultan en una estrategia de precondition en los tejidos de la planta para una activación de defensa basal sistémica más fuerte y rápida (Pozo *et al.*, 2007). Al respecto, Lee *et al.* (2005) reportan la manifestación de la activación de defensa basal por deposición de calosa en las células hospederas como un mecanismo de protección estimulado por el hongo FMA *Rhizophagus irregularis* (antes *Glomus intraradices*) contra *Colletotrichum* spp. en pepino. Así mismo, en plantas de tomate asociadas con HFMA se forman estructuras de papilas alrededor de los sitios de infección del patógeno, con deposición de pectina no esterificada y calosa, previniendo la propagación de *Phytophthora parasítica* (Cordier *et al.*, 1998; Pozo *et al.*, 2002). En general, la deposición de calosa se ha observado en el sitio donde ocurre la penetración del patógeno en la planta, durante la activación de sus primeros mecanismos de defensa (Khole *et al.*, 1985; Flors *et al.*, 2005).

La identificación de depósitos de calosa en tejidos del hospedero como expresión de la activación de defensa basal, puede constituirse en un indicador de la defensa inducida por HFMA. Sin embargo, un factor clave en la inducción de resistencia parece estar relacionado con la magnitud de la colonización de raíces por HFMA. Así, algunos estudios comparativos de diferentes niveles de colonización por estos hongos, concluyen que se requiere de una simbiosis bien establecida para el desarrollo de una respuesta significativa de resistencia sistémica inducida o local en la planta (Slezack *et al.*, 2000; Khaosaad *et al.*, 2007).

Así mismo, las plantas responden al ataque de patógenos produciendo fitoalexinas, enzimas y proteínas. Enzimas oxido-reductoras peroxidasas (POXs) y polifenol oxidasas (PPOs) están implicadas en protección celular y resistencia a enfermedades (Amil-Ruiz *et al.*, 2011; Thakker *et al.*, 2013). Entre estas, las peroxidasas de plantas clase III son bien conocidas (Almagro *et al.*, 2008) y su importancia es clave para el estudio de mecanismo de resistencia de enfermedad en plantas (Quiroga *et al.*, 2000; Sasaki *et al.*, 2004; Thakker *et al.*, 2013).

Las peroxidasas comprenden una importante clase de proteínas PR (subfamilia PR-9) implicadas en estas respuestas de defensa, en la cual un importante rol es catalizar la formación de radicales fenólicos a expensas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Allison y Schultz, 2004), indispensable en el cierre estomático por respuesta hipersensible asociándolo a las vías de transducción de señales en la planta (McInnis *et al.*, 2006). PR-9 son claves en: a) la biosíntesis de lignina; b) limitar la propagación celular de la infección a través del establecimiento de barreras estructurales por medio de reticulación de componentes de la pared celular o la generación de ambientes altamente tóxicos por producción masiva de ROS (Lagrimini *et al.*, 1987; Passardi *et al.*, 2005); c) la degradación de estos niveles citotóxicos (como por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) generados en tejidos de plantas como resultado de ataques por patógenos (Thakker *et al.*, 2013). Bajo condiciones de estrés oxidativo, las actividades de enzimas antioxidantes tales como superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), ascorbato peroxidasa (APX), glutatión reductasa (GR) y peroxidasa (POX) son generalmente incrementadas en plantas y, en varios casos su actividad es correlacionada con mejoramiento de tolerancia al estrés (Bela *et al.*, 2015).

Por lo anterior, este estudio se propuso evaluar la inducción de resistencia sistémica

por el hongo FMA *R. irregularis*, a través del seguimiento de la actividad peroxidasa y la deposición de calosa en las plántulas. Y, de esta forma, direccionar el potencial de uso de esta tecnología para explorar el efecto de este simbiote sobre la enfermedad “tizón de plántulas” de cacao. Es importante anotar que esta enfermedad se caracteriza por un manejo convencional limitado y crítico en términos económicos y ambientales, en vivero. Esta fase de producción en el cultivo determina la sanidad y calidad del material vegetal que será establecido en campo.

## 5.2 Materiales y métodos

### 5.2.1 Descripción general

A partir de material vegetal y muestreos destructivos de las plántulas de cacao sometidas previamente a los tratamientos experimentales descritos en la Tabla 2 del capítulo III, se estimó la actividad peroxidasa y de depósitos de calosa en las células hospederas, empleando técnicas de tinción y microscopía de fluorescencia indicadas en los protocolos del Anexo 1 y 2 respectivamente. Así mismo, se determinó la concentración de calosa en las raíces de las plántulas según metodología adaptada de Arcos y Narro (2009) como se describe en el protocolo del Anexo 3.

### 5.2.2 Actividad peroxidasa (GPX)

*Muestreo y extracción para análisis enzimático.*

La actividad peroxidasa fue analizada a partir de extractos de proteína obtenidos de hojas y raíces de plántulas de cacao inoculadas y no inoculadas con *P. palmivora* y *R. irregularis*, a los 1, 3, 5, 8 y 10 días después de inoculación del patógeno (ddi). Se colectaron tres gramos de material vegetal correspondiente y fueron sometidos a maceración con nitrógeno líquido en mortero y pistilo. Posteriormente, las muestras se homogeneizaron con tampón fosfato de potasio 0.1 M y pH 7.0 en proporción 2:1 (ml de buffer: gramos de tejido) (Schopfer *et al.*, 2001) con 9% (p/v) de Polivinilpirrolidona (PVPP) (Rodríguez, 2002). Para romper las membranas celulares, Triton X-100 al 10% (v/v) fue adicionado al tampón de extracción a una tasa de 1.6  $\mu$ l/mg de tejido (Jansen *et al.*, 2001). Las muestras se agitaron durante una hora en baño de hielo y posteriormente se centrifugaron a 3500 rpm durante 15 minutos a 4°C para ser filtradas a través de cuatro capas de gasa. Se centrifugó

nuevamente a 15000 rpm por 20 minutos y posteriormente a 13000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Estos extractos enzimáticos fueron almacenados a -20°C hasta su análisis 2 días después.

#### *Determinación de concentración de GPX total*

La concentración de proteína total se determinó mediante el método de Bradford (595 nm) (Bradford, 1976). La actividad total GPX fue determinada a partir de 3 réplicas de 5 µl de extracto crudo proveniente de las muestras de tejido foliar y de raíz, empleando un espectrofotómetro donde se registraron los valores de absorbancia a temperatura ambiente a 470 nm durante dos minutos, a intervalos de 0.1 s. Como volumen final de reacción se utilizó 1 ml y para la medición de actividad, se hizo uso de la siguiente mezcla de reactivos en el orden correspondiente: 1) 750 µL de tampón fosfato de potasio 0.05 M pH 7.0, 2) 100 µL de guayacol 0.28%, 3) 50 µL de extracto enzimático y 4) 100 µL de peróxido de hidrógeno 0.3% (Cisneros *et al.*, 1997).

El sustrato oxidable guayacol empleado fue oxidado a un complejo coloreado de tetraguayacol en presencia de peroxidasa. La velocidad de formación del coloreado se empleó como indicador de medida de la actividad enzimática peroxidasa, por lecturas espectrofotométricas de las absorbancias en relación con el tiempo. El incremento en la absorbancia fue monitoreado a 470 nm en el espectrofotómetro y la unidad peroxidasa se expresó como  $\Delta\text{Abs}/\text{min}$ .

### **5.2.3 Deposición de calosa**

Se realizó un muestreo destructivo de plántulas a los 0, 1, 3, 5, 8 y 10 ddi del patógeno, seccionándolas en submuestras de raíz y hojas. Cada muestra se sumergió por 24 horas en una solución fijadora compuesta por formaldehído, etanol al 70% y ácido acético glacial en proporción 5:90:5 (v/v/v) respectivamente. Posteriormente, las muestras fueron deshidratadas en cinco series progresivas de etanol y aclaradas en xilol por 24 horas para ser infiltradas e imbibidas en parafina durante 24 horas (Radford *et al.*, 1998). Se realizaron cortes entre 5-10 µm con micrótopo rotatorio y con un baño en xilol, etanol y agua destilada se removió el exceso de parafina (Hao *et al.*, 2008). La tinción con azul de anilina al 0.1% se realizó en buffer fosfato de potasio

0.1 M y pH 7.1, donde transcurridos 10 minutos se observó en microscopio de fluorescencia.

## 5.3 Resultados

### 5.3.1 Actividad guayacol peroxidasa (GPX)

Se evaluó la actividad guayacol peroxidasa (GPX) como indicador de defensa “temprana” en plántulas de cacao inoculadas con el hongo FMA *Rhizophagus irregularis*. En general, la actividad GPX expresada en todos los tratamientos, fue mayor a los uno y tres ddi de *P. palmivora* tanto en muestras de hojas como de raíces de las plántulas (Fig. 1A y B). También, los niveles de actividad GPX fueron mayores en tejidos de plántulas que presentaron síntomas de la enfermedad comparado con el tratamiento control absoluto, donde la expresión GPX fue mínima (Fig. 1A y B).

La mayor actividad GPX fue obtenida por parte de los tratamientos de inoculación del patógeno y los HFMA a través del tiempo, y su incremento significativo se expresó hasta los cinco ddi de *P. palmivora*.

#### *Actividad GPX en raíces*

Para la actividad GPX en raíces y durante las primeras 24 horas después de inoculación del patógeno, la presencia de *P. palmivora* causó un incremento promedio en la actividad enzimática alrededor de 26.6% en plántulas inoculadas con HFMA, comparado con un aumento del 18.5% de esta actividad en plántulas inoculadas únicamente con el microorganismo patógeno. Estas diferencias fueron significativas entre estos tratamientos, excepto entre los dos tratamientos de inoculación con HFMA (Fig. 1B).

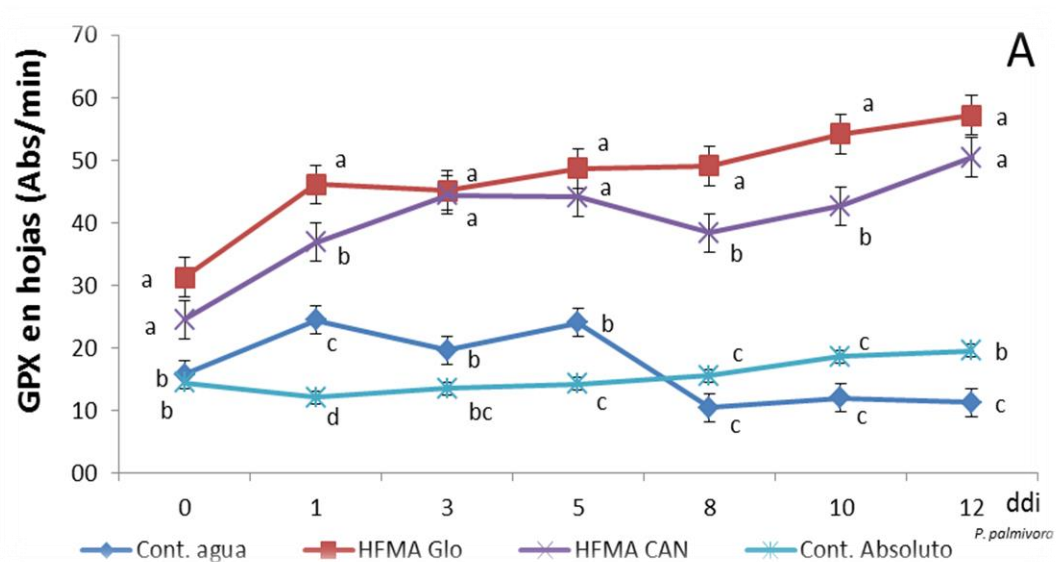
También, los niveles de actividad GPX en raíces de plántulas micorrizadas fueron significativamente superiores comparados con los obtenidos en el tratamiento control absoluto durante todo el experimento. Para los tres ddi por ejemplo, la actividad GPX en las plantas micorrizadas fue 3.5 veces superior a la actividad detectada en los controles (Fig. 1B). Estos niveles superiores de actividad se mantuvieron durante todo el tiempo de evaluación, tan solo a las 24 horas después de inoculación del patógeno, las plantas con *R. irregularis* obtuvieron mayores valores de actividad GPX. Sin

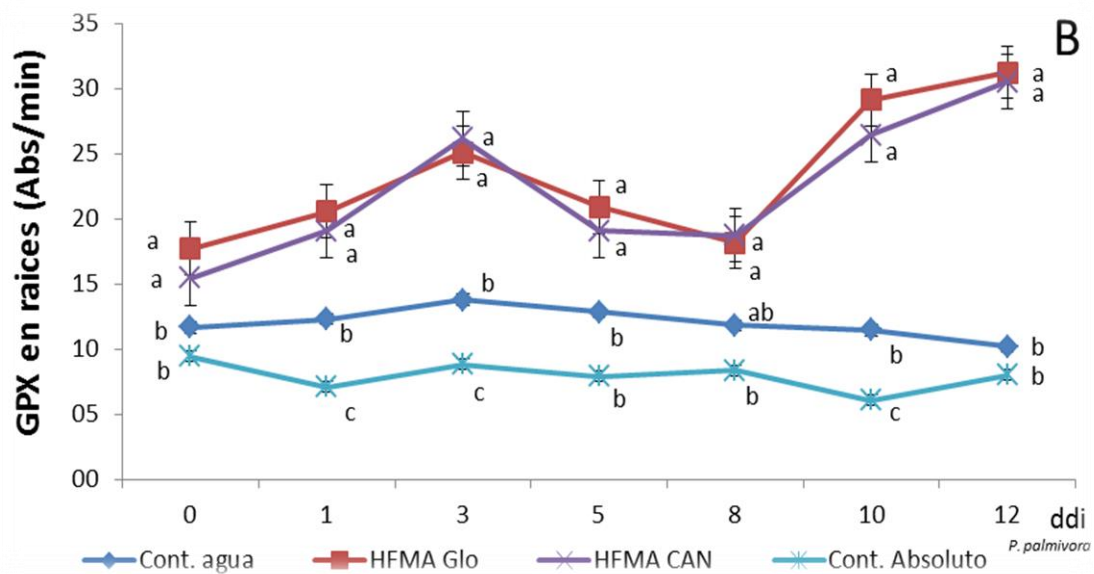
embargo, a los 8 ddi del patógeno, no se evidenciaron diferencias significativas en la actividad GPX en raíces entre plantas micorrizadas y el tratamiento control. (Fig. 1B).

#### Actividad GPX en hojas

En general, se observó una tendencia creciente de actividad GPX en hojas después de la inoculación del patógeno en todos los tratamientos de inoculación de *R. irregularis*. Sin embargo, a partir de 24 horas y hasta los 8 ddi del patógeno, esta actividad disminuyó para las plantas inoculadas con el hongo *Rhizophagus irregularis* aislado CAN. Plántulas bajo el tratamiento con *R. irregularis* aislado Glomygel, mantuvieron una tendencia creciente en los niveles de actividad GPX durante todo el tiempo de evaluación (Fig. 1A).

De acuerdo a lo anterior, los niveles de GPX en hojas mostraron diferencias significativas entre los dos tratamientos de plántulas inoculadas con aislados del hongo FMA *R. irregularis* a lo largo del experimento, excepto para los cero y tres ddi. Esto representó, en general, un efecto diferencial de los dos aislados del hongo FMA sobre la expresión de la actividad GPX en las plántulas a nivel de hojas. Al final del tiempo de evaluación del experimento, los niveles GPX obtenidos bajo el efecto de los HFMA obtuvieron los mayores valores GPX. (Fig. 1A).



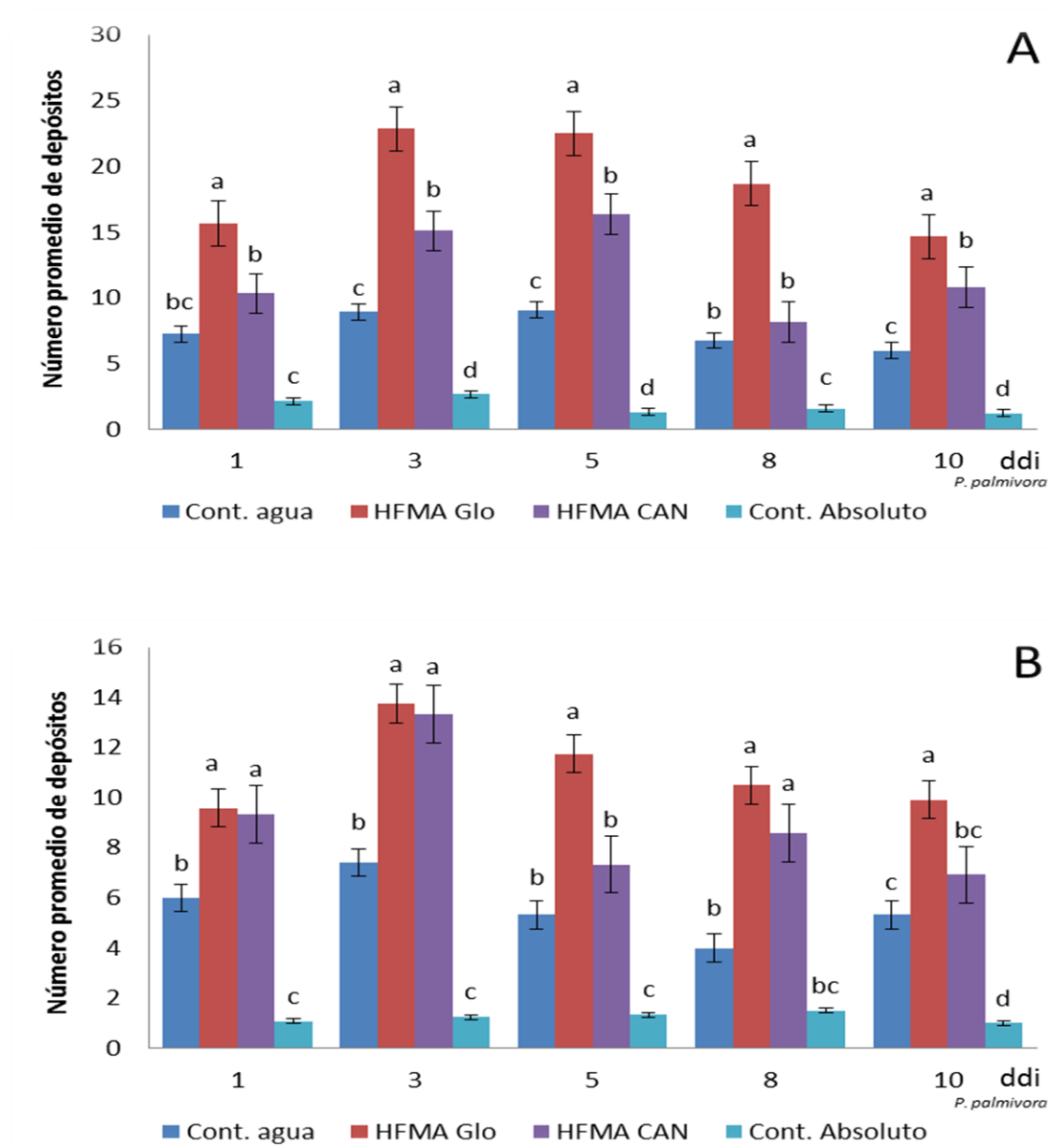


**Figura 1.** Actividad guayacol peroxidasa (GPX) en hojas (A) y raíces (B) de plántulas de cacao. Actividad evaluada en ddi de *P. palmivora*. La significancia estadística de tratamientos fue determinada por ANOVA. Tratamientos seguidos por la misma letra no difieren estadísticamente por el test de Tukey ( $p < 0.05$ ). Valores medios para cinco réplicas +/- error estándar de la media.

### 5.3.2 Deposición de calosa

La inoculación de *R. irregularis* tuvo efecto en los depósitos de calosa hallados en hojas y raíces de plántulas de cacao. La presencia de este microorganismo simbiote resultó en un incremento de los niveles de calosa comparado con los tratamientos control. Plantas en simbiosis con HFMA alcanzaron los mayores niveles obtenidos de calosa en hojas y raíces para las evaluaciones posteriores a los cinco, ocho y 10 ddi., presentando diferencias estadísticas significativas entre este hongo simbiote y el antagonista (Fig. 2).

El tratamiento control agua, con inoculación del patógeno, presentó mayor expresión de depósitos de calosa en hojas y raíces comparado con el control absoluto durante todas las evaluaciones, esto como defensa inherente de la planta ante el ataque del patógeno. Sin embargo, estos niveles fueron significativamente inferiores en relación con los obtenidos por efecto de los tratamientos de inoculación de HFMA (Fig. 2).



**Figura 2.** Presencia de calosa en hojas (A) y raíces (B) de plántulas de cacao. La significancia estadística de tratamientos fue determinada por ANOVA. Tratamientos seguidos por la misma letra no difieren estadísticamente por el test de Tukey ( $p < 0.05$ ). Valores medios para cinco réplicas  $\pm$  error estándar de la media.

#### *Deposición de calosa en hojas*

En general, los niveles de calosa expresados en hojas se incrementaron entre el primer y tercer ddi de *P. palmivora*, momento a partir del cual y en adelante hasta el final de la evaluación, presentaron una tendencia de disminución de deposición en todos los tratamientos evaluados (Fig. 2A). Los resultados de esta variable medida en hojas fueron significativamente diferentes entre los dos tratamientos de inoculación de

HFMA, para la mayor parte de las evaluaciones durante el experimento, exceptuando la última evaluación a los 10 ddi del patógeno. Los mayores niveles de calosa en hojas se presentaron en plantas inoculadas con HFMA a los cinco y ocho ddi (Figura 2A y B).

#### *Deposición de calosa en raíces*

Al igual que la respuesta generalizada en hojas, la deposición de calosa en raíces presentó un aumento significativo entre el primer y tercer ddi del patógeno, presentando una disminución desde este punto del tiempo y hasta los 10 ddi de *P. palmivora*. Entre el primer y tercer ddi del patógeno, los niveles de calosa fueron superiores por la inoculación con *R. irregularis* aislado Glomygel, en las tres últimas evaluaciones. En el tratamiento control agua, donde se inoculó *P. palmivora* solamente, se presentaron niveles de deposición de calosa significativamente menores comparados con los tratamientos bajo la inoculación de hongos benéficos.

## **5.4 Discusión**

### **5.4.1 Actividad guayacol peroxidasa (GPX)**

La actividad GPX se ha correlacionado con la resistencia a enfermedades en varias plantas de cultivo (Bela *et al.*, 2015). En materiales de cacao, la resistencia a especies de *Phytophthora* se ha atribuido a la acción de factores intrínsecos de las plantas. Okey *et al.* (1996) mencionan factores que contribuyen a la protección de plantas de cacao ante *Phytophthora* spp. por efecto no sólo de barreras mecánicas de las plantas o escape a la infección, sino también por la activación de respuestas de defensa de la planta que involucra actividad de enzimas como polifenoloxidasas, fenilalanina amonioliasa y peroxidasa. Esta actividad, ha sido estudiada en muchas interacciones planta – patógeno, sin embargo, el rol de la peroxidasa en resistencia no ha sido establecido en muchos patosistemas (Ye *et al.*, 1990) debido a que cada especie de planta muestra típicamente un único patrón y número de isoenzimas enlazadas a la pared celular, que puede responder diferencialmente a estímulos externos como heridas mecánicas, insectos, hormonas e infección por diferentes patógenos (Caruso *et al.*, 2001; Allison y Schultz, 2004). En este estudio, la infección generada por *P. palmivora* en plántulas de cacao y su respuesta en función de la actividad GPX bajo el

efecto de *R. irregularis*, representa un primer acercamiento de análisis de este patosistema bajo este indicador de respuesta de defensa “temprana” por el efecto específico de un hongo FMA.

En general, múltiples estudios reportan que los cambios en la actividad peroxidasa tiene como finalidad disuadir alguna amenaza por patógenos (Quiroga *et al.*, 2000; Sasaki *et al.*, 2004). Debido a que estas enzimas son importantes en el reforzamiento de la pared celular, es razonable asumir su rol en la contención de patógenos en plantas (Lagrimini *et al.*, 1987). En el presente estudio, los resultados obtenidos concuerdan con los encontrados en otros modelos planta-patógeno donde se han evaluado respuestas de defensa en relación con actividad GPX y microorganismos benéficos (Ramamoorthy *et al.*, 2001; Chowdappa *et al.*, 2013; Vanitha *et al.*, 2011), permitiendo afirmar que esta enzima cuantificada está relacionada con mecanismos de defensa en plántulas de cacao. Esto y según los resultados expuestos (Fig. 1A y B), permite inferir también la existencia de inducción de resistencia a *P. palmivora* en las plántulas por efecto de la simbiosis con el hongo FMA *R. irregularis*.

Lo anterior es de gran significancia debido a que se conoce que la colonización por HFMA genera respuestas de resistencia observadas a nivel de lignificación de células (Abdel-Fattah *et al.*, 2011), expresión de genes que codifican proteínas PR (Song *et al.*, 2015), producción de fitoalexinas (Pozo *et al.*, 2005) y peroxidasas (Rodríguez *et al.*, 2001), indicando que los HFMA no elicitán respuestas de defensa típicas. Sin embargo, estos compuestos podrían sensibilizar el sistema inmune del hospedero a patógenos y mejorar los mecanismos de defensa para contener una posterior infección por parte de estos (Azcón y Barea, 1996; Pozo *et al.*, 2005).

Si las plantas son “inmunizadas”, es decir, que ocurra la acumulación de enzimas relacionadas con defensa antes del ataque del patógeno, entonces la enfermedad puede ser evitada o minimizada (Thakker *et al.*, 2013). En este sentido, varios estudios han mostrado que los hongos FMA generan este fenómeno de resistencia inducida denominado “priming” en plantas hospederas (Ramírez y Rodríguez, 2012), disminuyendo el daño causado por fitopatógenos como consecuencia. Al-Askar y Rashad (2010) examinaron la resistencia mejorada contra *Fusarium solani* en plantas de frijol, conferida por una mezcla de inóculo de los hongos FMA *Gigaspora gigantea*, *Gigaspora margarita*, *Glomus mosseae*, *Glomus clarum* y *Glomus intraradices* (ahora

*Rhizophagus irregularis*). Así, determinaron una correlación de esta resistencia con la biosíntesis de enzimas relacionadas con defensa como polifenol oxidasa y peroxidasa. Otros estudios han demostrado la inducción de este “priming” en plantas por HFMA (Pozo *et al.*, 2007)

Los resultados obtenidos en este estudio demuestran que el inocular *P. palmivora* en las plántulas incrementó los niveles de actividad GPX en sus hojas y raíces y, bajo la simbiosis con HFMA, *R. irregularis* influyó en la mayor acumulación de GPX creciente en el tiempo. Los hongos FMA aplicados “inmunizaron” a las plántulas incluso antes de la inoculación del patógeno (0 ddi) y durante el tiempo de evaluación de esta variable, con una expresión mayor de actividad GPX a los 10 ddi comparado con las plantas control (Fig. 1 A y B). En general, los niveles de actividad GPX presentaron una tendencia de aumento en el tiempo y, a los 10 ddi de *P. palmivora*, los tratamientos bajo *R. irregularis* superaron su magnitud en comparación con todos los tratamientos restantes.

Al detectar al microorganismo invasor, las plantas pueden hacer uso de manera coordinada, de uno, dos o varios mecanismos de defensa en un intento por restringir el crecimiento del patógeno (Dixon *et al.*, 1994). Algunas respuestas de defensa generales incluyen reforzamiento de la pared celular, producción de fitoalexinas y/o acumulación de proteínas antimicrobiales (Almagro *et al.*, 2008), donde su regulación espacio-temporal es un factor decisivo en la respuesta a la interacción patógeno-hospedero (susceptibilidad o resistencia) (Wojtaszek, 1997). Productos bioactivos (antifúngicos) como viniferinas, hordatinas y ciertos lignanos entre muchas otras, son fitoalexinas bien conocidas, resultantes de reacciones mediadas por peroxidases (Almagro *et al.*, 2008). En este trabajo, la respuesta de defensa mostrada por la inoculación de *P. palmivora* incluyó cambios a nivel bioquímico en cuanto a actividad GPX, encontrándose elevadas concentraciones de la enzima en respuesta a la infección del patógeno en plantas en simbiosis con *R. irregularis*.

Por otro lado, peroxidases III que reportan propiedades antifúngicas pertenecientes al grupo de proteínas relacionadas con patogénesis PR-9 (Ghosh, 2006), normalmente son acumuladas no solo localmente en el sitio de infección del patógeno, sino también formadas sistémicamente en la planta después de esta (Almagro, 2008). Esto puede explicar la incrementada actividad GPX registrada tanto en tejidos de hojas como de

raíces de las plántulas durante todo el tiempo de evaluación de esta variable (Fig. 1A y 1B).

Finalmente, aunque las peroxidasas son conocidas por estar implicadas en muchos procesos fisiológicos y de desarrollo debido a que controlan el crecimiento celular, tienen un rol en el catabolismo de auxinas, destrucción de flavonoides, biosíntesis de etileno y metabolitos secundarios, su papel en defensa contra infección por patógenos ha sido demostrado (Bela *et al.*, 2015). Sin embargo, los estímulos directos involucrados en la activación de la respuesta de defensa como la explosión oxidativa, catalizada por peroxidasas, no han sido completamente entendidos cuando las plantas son amenazadas por patógenos o sus moléculas patrón son reconocidas (Kimura y Kawano, 2015). Además, dilucidar cómo es que ciertas peroxidasas han sufrido la selección natural para ser sensibles a factores bióticos, y como estas peroxidasas son realmente integradas dentro de la compleja red de respuestas de defensa, es un desafío para futuras investigaciones (Almagro *et al.*, 2008).

Por estos vacíos en el conocimiento de los mecanismos específicos de actuación de las peroxidasas, y como medida complementaria para el seguimiento de las respuestas de defensa en las plántulas de cacao en simbiosis con *R. irregularis*, inoculadas con *P. palmivora*, se realizó el seguimiento a la actividad de deposición de calosa en sus tejidos.

#### **5.4.2 Deposición de calosa**

La producción de calosa es considerada como un componente estructural en la respuesta de defensa en plantas durante la interacción planta-patógeno (Rosalie y Guest, 2006; Voigt y Somerville, 2009). Esta deposición se ha reportado a través de la formación de papilas o deposiciones en la pared de la célula hospedera en el sitio de penetración del patógeno (Rosalie y Guest, 2006). Las papilas son engrosamientos de la pared celular de las plantas en estos sitios de penetración, contienen componentes primarios y secundarios de la pared y pueden contener también compuestos tales como fenoles, proteínas o calosa que contribuyen al reforzamiento de la pared celular y a la resistencia de planta (Rosalie y Guest, 2006). En este estudio se observó producción de calosa incrementada en los tejidos en todos los tratamientos inoculados con *P. palmivora* (Fig. 2A y B) comparado con el control absoluto, con mayor deposición en aquellas plántulas en simbiosis con *R. irregularis*. Esto permitió

corroborar que ante la presencia del patógeno y HFMA, hay un mayor desencadenamiento de cambios bioquímicos asociados a los mecanismos de defensa de las plántulas de cacao, basados en la generación de barreras estructurales internas en las células.

La deposición de calosa, según el microorganismo benéfico presente, fue detectada a través del tiempo durante la evaluación de esta variable. En el caso de *R. irregularis*, la generación de calosa tanto en hojas como en raíces durante el tiempo de evaluación, pudo estar asociada a su eficacia como agentes controladores (Yedidia *et al*, 1998). Al respecto, Hanada *et al.* (2009) reportan que en cacao un agente de control biológico eficaz, es aquel con alta velocidad de crecimiento, capacidad de colonización y sobrevivencia en los tejidos de la planta, lo que le permite excluir al patógeno, mediante competencia por nutrientes importantes para la germinación de las esporas y el desarrollo de estructuras infectivas, además de la activación química para emitir una respuesta sistémica. En relación a esto último, el reconocimiento rápido y temprano de patógenos por la planta para la movilización de defensas estructurales y bioquímicas, incide directamente en su protección (Dehariya *et al.*, 2014).

Sin embargo, Voigt y Somerville (2009) exponen que se han realizado múltiples observaciones de interacciones planta-patógeno en donde las papilas no se consideran como un mecanismo de defensa que puede contener completamente los patógenos. Se piensa que las papilas actúan como una barrera física para retardar la invasión del patógeno, permitiendo al hospedero ganar tiempo para iniciar reacciones de defensa que requieren la activación y expresión de genes. Esto sustenta los resultados obtenidos en este experimento debido a que, aunque la deposición de calosa fue significativa tanto en tejidos de hojas como de raíz con la inoculación de *P. palmivora*, la expresión de la enfermedad fue creciente durante el transcurso del tiempo de evaluación de esta variable (Fig. 3 y 4, Cap. III). Así mismo, se evidenció este retardo en la invasión del patógeno en plantas micorrizadas las cuales aún con la significativa actividad de deposición de calosa en hojas y raíces, presentaron porcentajes de infección progresivos durante el tiempo de evaluación, pero en menor magnitud comparado con las plántulas del tratamiento control agua (con inoculación de *P. palmivora* únicamente) (Fig. 3 y 4, Cap. III).

## 5.5 Conclusiones

De acuerdo a los resultados obtenidos en este estudio, se infiere que la respuesta de defensa por deposición de calosa es un mecanismo importante involucrado en la protección conferida por *R. irregularis* contra *P. palmivora* en plántulas de cacao. Esto en concordancia con lo reportado por Lee et al. (2005), quienes concluyeron que *Glomus intraradices* (ahora *R. irregularis*) aportó significativamente a la protección en pepino contra *Colletotrichum* mediante la deposición de calosa.

También, estímulos directos involucrados en la activación de la respuesta de defensa como la explosión oxidativa, catalizada por peroxidasas (Kimura y Kawano, 2015), acompañó la formación de papilas (compuestas por calosa) en la membrana plasmática de las células de las plántulas de cacao (Thordal-Christensen et al., 1997), retardando la infección de *P. palmivora* en ellas. La eficacia de estas respuestas de defensa activas con frecuencia determina si las plantas son susceptibles o resistentes a la infección patogénica (Almagro et al., 2008; Voigt y Somerville, 2009).

Finalmente, este estudio es una confirmación puntual que la colonización por *R. irregularis* en raíces confirió una protección sistémica en las plántulas de cacao contra *P. palmivora*. No obstante, los resultados llaman la atención frente a la necesidad de realizar estudios más detallados para investigar mecanismos de respuesta más precisos, a nivel genético o de transcriptómica, por ejemplo, en plántulas de cacao.

## 5.6 Anexos capítulo IV

Anexo 1. Estimación de la actividad peroxidasa (ROS) en tejidos de plántulas de cacao.

1. Colectar 2 gramos de muestra de material vegetal, hojas, raíz, tallo y someter a maceración con nitrógeno líquido (Fernández, 2003).
2. Homogeneizar con tampón fosfato de potasio (0,1 M y pH 6.0) en proporción 2:1 (ml de buffer: gramos de tejido) (Schopfer *et al.*, 2001) con 5% (p/p) de PVPP (Rodríguez, 2002).
3. Agitar durante 1 hora en baño de hielo.
4. Centrifugar a 3500 rpm durante 15 minutos a 4°C y filtrar a través de cuatro capas de gasa. Centrifugar nuevamente a 15000 rpm por 20 minutos y posteriormente a 13000 rpm durante 15 minutos a 4°C (Lagramini *et al.*, 1987). Almacenar los extractos enzimáticos a -20°C hasta su análisis (Fernández, 2003).
5. La determinación de concentración de proteínas totales se realiza a través de método de Bradford (595 nm) (Bradford, 1976).
6. Registrar los valores de absorbancia en el espectrofotómetro a temperatura ambiente a 470 nm durante 2 minutos, a intervalos de 0,1 s (Schopfer *et al.*, 2001). Emplear como volumen final de reacción 1 ml y para la medición de actividad, utilizar según Haskins (1955) la siguiente mezcla en el orden correspondiente:
  - 750  $\mu$ L de tampón fosfato de potasio 0.1 M pH 6.0
  - 100  $\mu$ L de guayacol 2.8%
  - 50  $\mu$ L de extracto enzimático
  - 100  $\mu$ L de peróxido de hidrógeno 3%
7. Expresar la unidad peroxidasa como  $\Delta$ Abs/min y la unidad peroxidasa específica como  $\Delta$ Abs/min/ $\mu$ g de proteína cuantificada mediante el método de Bradford (595 nm) (Rodríguez, 2002).

Anexo 2. Estimación de depósitos de calosa en tejidos de plántulas de cacao.

1. Tomar segmentos de muestra de material vegetal (raíz y hojas) y sumergir en una solución fijadora de formaldehído: ácido acético glacial: etanol al 70% en proporción 10:5:90 (V/V/V) por 24 horas (Hao *et al.*, 2008).
2. Deshidratar en siete series progresivas de etanol al 80% por 24 horas cada una.
3. Aclarar en xilol por 24 horas durante 2 días.
4. Imbibir en parafina durante 24 horas.
5. Realizar cortes con micrótopo rotatorio, removiendo el exceso de parafina mediante baño en xilol, etanol al 95% y agua (Hao *et al.*, 2008).
6. Teñir con azul de anilina al 0.1% (p/v) en buffer fosfato de potasio (0,1 M y Ph 7.0) y observar en microscopio de fluorescencia con el set de filtros Leitz A (UV-365nm) y I 2/3 (azul-495nm) para la determinación cuantitativa de calosa (Radford *et al.*, 1998).

### Anexo 3. Determinación de concentración de calosa en las raíces de las plántulas

1. Cortar en fracciones de 1 cm las raíces de las plántulas a evaluar.
2. Introducir cada fracción de raíz a analizar en viales con etanol al 96% y refrigerar a 4°C hasta su análisis.
3. Eliminar el alcohol de las muestras dejando escurrir el vial que contiene las raíces.
4. Agregar 500 µL de NaOH 1M y someter a vórtex durante 3 minutos. Agregar otros 500 µL de NaOH 1M.
5. Cerrar los viales e incubar a baño maría a 80°C por 20 minutos para solubilizar la calosa. Posteriormente, dejar enfriar a temperatura ambiente.
6. Centrifugar a 12.000 rpm por 10 minutos para que la calosa quede en el sobrenadante y se precipiten los residuos.
7. Prepare dos submuestras (de ser necesaria la submuestra blanco) de 200 µL en tubos de ensayo.
8. A esta submuestra añada 1.25 ml de una solución de anilina o solución sin anilina (de ser necesaria la submuestra blanco):

- 8.1. **Solución de anilina:** Se prepara con glicina, HCl y anilina en las siguientes proporciones: 21 ml 1 M HCl + 59 ml de tampón de glicina 1 M de pH 9.5 + 40 ml de azul de metileno Blue 0.1%. El pH de esta solución deberá ser de entre 3.7 y 4. Si la escala del pH es menor o mayor, indica que hay un deterioro en la solución y que deberá descartarse. El orden de las soluciones que van a mezclarse para preparar la solución A es importante, ya que con estas cantidades se pueden preparar hasta 75 muestras de 110 ml. Se recomienda preparar unas cinco veces estas cantidades (550 ml). La solución se puede conservar por largo tiempo en refrigeración a 20 °C, en oscuridad. Verifi que el pH de la solución cada vez que vaya a utilizarla; debe ser de 3.7 aproximadamente.
  - 8.2. **Mezcla sin anilina (Solución blanco):** Se prepara mezclando tampón de glicina, HCl y agua doblemente desionizada en las siguientes proporciones: 21 ml 1 M HCl + 59 ml tampón glicina 1 M de pH 9.5 + 40 ml de agua doblemente desionizada.

Con la solución blanco se determina la autofluorescencia. Dado que la planta contiene muchos compuestos que generan autofluorescencia — fenoles, clorofila, taninos, lignina—, podría generarse una fuente de error al hacer mediciones de calosa. Para evitarlo, se agrega anilina, que produce fluorescencia por efecto de la formación del complejo siroflúor-calosa. Al agregar anilina a los ápices radiculares es posible medir la fluorescencia total producida por la calosa y otros compuestos orgánicos de la planta. En cambio, la muestra del blanco mide la fluorescencia que producen otros compuestos, excepto la calosa. Si el valor de esta última es muy pequeño, no será necesaria la solución blanco. Existe una relación lineal entre la intensidad de la fluorescencia y la concentración de Pachyman y, por consiguiente, con el contenido de calosa. Al generar la curva de calibración utilice valores que incluyan las concentraciones de Pachyman que se encuentran en las plantas, valores cercanos a 2 µg/ml.
9. Agitar y mezclar por 1-2 segundos.
  10. Incubar los tubos de ensayo a 50°C en baño maría por 20 minutos para que se produzca la decoloración del azul de anilina y la formación del complejo de

siroflúor-calosa.

11. Dejar enfriar por 15 minutos a temperatura ambiente o adicionar agua a temperatura ambiente.
12. Realizar las mediciones de calosa en un microplato o un espectrofotómetro de fluorescencia. En el microplato (Microplate reader) se utiliza una longitud de onda de excitación ( $\lambda_{ex}$ ) de 400/30 nm, de emisión ( $\lambda_{em}$ ) de 485/40 nm y sensibilidad de 50; en el espectrofotómetro, una longitud de excitación ( $\lambda_{ex}$ ) de 394/5 nm, de emisión ( $\lambda_{em}$ ) de 485/5 nm, pase de bandas de 5 nm y 700 voltios.
13. Enciender el espectrofotómetro una hora antes de hacer las mediciones para que la lámpara se caliente. Asegurarse de que la cubeta esté limpia. Lávar con cierta periodicidad con HCl 1N por 20 minutos; enjuagar con abundante agua doblemente desionizada. Nunca usar detergente.
14. Antes de hacer la medición de las muestras, generar una curva de calibración considerando un rango de valores: 0 – 10 ugPE/ml con intervalos de 1.25 y un valor de  $R^2$  cercano a 1 (i.e., 0.998).
15. Medir con el espectrofotómetro la intensidad de fluorescencia (Y) de cada una de las muestras de raíz provenientes del vivero que corresponda a la concentración de Pachyman (X).
16. Para cuantificar la cantidad de calosa (Y), tener en cuenta los valores de fluorescencia (X) y calcular la ecuación de la recta de regresión y su coeficiente de determinación  $R^2$ . No es una condición que la línea de regresión pase por el origen. En este caso, se espera que  $R^2$  tenga un valor muy cercano a 1. Por tanto, la cantidad de Pachyman muestra indirectamente la cantidad de calosa.

## 5.7 Bibliografía

- Abdel-Fattaha, G.M., S.A. El-Haddad, E.E. Hafez, Y.M. Rashad. 2011. Induction of defense responses in common bean plants by arbuscular mycorrhizal fungi. *Microbiol Research*.166: 268—281.
- Allison y Schultz. 2004. Differential activity of peroxidase isozymes in response to wounding, gypsy moth, and plant hormones in northern red oak (*Quercus rubra* L.). *Jour of Chem Ecol*. 30, 7.
- Al-Askar, A. y Y. Rashad. 2010. Arbuscular Mycorrhizal Fungi: A Biocontrol Agent against Common Bean Fusarium Root Rot Disease. *Plant Pathol Journal*. 9, 1.
- Almagro, L., R. Gómez, L.V. Belchi-Navarro, S. Bru, R. Barceló, A.R. Pedreño, M.A., 2008. Class III peroxidases in plant defence reactions. *J. Exp. Bot.* 60, 377–390.
- Amil-Ruiz, F., R. Blanco-Portales, J. Muñoz-Blanco, J.L. Caballero. 2011. The strawberry plant defense mechanism: a molecular review, *Plant Cell Physiol*. 52, 1873–1903.
- Azcón C., J.M. Barea. 1996. Arbuscular mycorrhizas and biological control of soil-borne plant pathogens – a overview of the mechanisms involved. *Springer* 6,457-464.
- Bakalovic, N., F. Passardi, V. Ioannidis , C. Cosio, C. Penel, L. Falquet, C. Dunand. 2006. PeroxiBase: A class III plant peroxidase database. *Phytoche*. 67, 534-539
- Bela, K., E. Horváth, A. Gallé, L. Szabados, I. Tari, J. Csiszár. 2015. Plant glutathione peroxidases: Emerging role of the antioxidant enzymes in plant development and stress responses. *Jour of Plan Physiol*. 176, 192-201
- Bernards, M.A., D.K. Summerhurst, F.A. Razem. 2004. Oxidases, peroxidases and hydrogen peroxide: the suberin connection. *Phytoche Review*. 3, 113–126
- Bolwell, G.P., Bindschedler, L.V., Blee, K.A., Butt, V.S., Davies, D.R., Gardner, S.L., Gerrish, C., Minibayeva, F., 2002. The apoplastic oxidative burst in response to biotic stress in plants: a three-component system. *J. Exp. Bot.* 53, 1367–1376
- Bolwell, G.P., Blee, K.A., Butt, V.S., Davies, D.R., Gardner, S.L., Gerrish, C., Minibayeva, F., Rowntree, E.G., Wojtaszek, P., 1999. Recent advances in

understanding the origin of the apoplastic oxidative burst in plant cells. *Free Radical Res.* 31, S137–S145.

- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72, 248-254
- Caruso, C., Chilosi, G., Leonardi, L., Bertini, L., Magro, P., Buonocore, V. and Caporale, C. 2001. A basic peroxidase from wheat kernel with antifungal activity. *Phytochemistry* 58. 743–750.
- Cesarino, I., P. Araújo, J.L. Sampai, A. Franco, P. Mazzafera. 2012. Enzymatic activity and proteomic profile of class III peroxidases during sugarcane stem development. *Plant Physiol and Biochemis.* 55, 66-76
- Chen, Z., H. Silva, D.F. Klessig. 1993. Active oxygen species in the induction of plant systemic acquired resistance induced by salicylic acid. *Science.* 262, 1883-1886
- Chen, S., Z. Vaghchhipawala, W. Li, H. Asard, M. Dickman. 2004. Tomato Phospholipid Hydroperoxide Glutathione Peroxidase Inhibits Cell Death Induced by Bax and Oxidative Stresses in Yeast and Plants. *Plan Physiol.* 135, 1630-1641
- Chowdappa, P., S.P. Mohan kumar, M.J. Lakshmi, K.K. Upreti. 2013. Growth stimulation and induction of systemic resistance in tomato against early and late blight by *Bacillus subtilis* OTPB1 or *Trichoderma harzianum* OTPB3, *Biol. Control* 65, 109–117
- Cisneros E, Pupo J, Céspedes EM. 1997. Enzimas que participan como barreras piroclóicas para eliminar las radicales libres: III. Glutación peroxidosa. *Rev Cubana Invest Biomed* 16,1,10-5
- Cordier C, Pozo MJ, Barea JM, Gianinazzi S, Gianinazzi-Pearson V. 1998. Cell defense responses associated with localized and systemic resistance to *Phytophthora* induced in tomato by an arbuscular mycorrhizal fungus. *Mol Plant Microbe Interact* 11 : 1017 – 1028
- Dixon, R.A., M.J. Harrison y J. Lamb. 1994. Early Events in the Activation of Plant Defense Responses. *Annu Rev of Phytopathol.* 32, 479-501
- Cosio, C. y C. Dunand. 2009. Specific functions of individual class III peroxidase genes, *J. Exp. Bot.* 60, 391-408

- Duroux, I. y Welinder, K. G. 2003. The peroxidase gene family in plants: A phylogenetic overview. *J. Mol. Evol.* 57, 397–407.
- Gianinazzi-Pearson, V., A. Gollotte, J. Lherminier, B. Tisserant, P. Franken, E. Dumas-Gaudot, M.C. Lemoine, D. van Tuinen, S. Gianinazzi. 1995. Cellular and molecular approaches in the characterization of symbiotic events in functional arbuscular mycorrhizal associations. *Can J Bot* 73, S526–S532
- El-Sayed M y R. Verpoorte. 2004. Growth, metabolic profiling and enzymes activities of *Catharanthus roseus* seedlings treated with plant growth regulators. *Plant Grow Regul.* 44, 53–58.
- Flors, V., Ton, J., Jakab, G., Mauch-Mani, B. 2005. Abscisic Acid and Callose: Team Players in Defence Against Pathogens?. *Phytopathol* 153, 377–383.
- Ghosh M. Antifungal Properties of Haem Peroxidase from *Acorus calamus*. *Annals of Botany.* 2006; 98(6):1145-1153. doi:10.1093/aob/mcl205.
- Gianinazzi-Pearson, V., E. Dumas-Gaudot, A. Gollotte, A. Tahiri-Alaoui, S. Gianinazzi. 1996. Cellular and molecular defence related root responses to invasion by arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol* 133, 45–57
- Heath, M.C. 2000. Hypersensitive response-related death. *Plant Mol Biol.* 44,321–34.
- Jansen, M. A. K., R.A. Van den noort, M. Adillah tan, E. Prinsen, L.M. Lagrimini y R.N.F. Thorneley. 2001. Phenol-oxidizing peroxidases contribute to the protection of plants from ultraviolet radiation stress. *Plant Physiol.* 126,1012–1023.
- Kawano T, Sahashi N, Takahashi K, Uozumi N, Muto S. 1998. Salicylic acid induces extracellular superoxide generation followed by an increase in cytosolic calcium ion in tobacco suspension culture: The earliest events in salicylic acid signal transduction. *Plant Cell Physiol* ; 39, 721-30.
- Kawano, T. 2003. Roles of the reactive oxygen species-generating peroxidase reactions in plant defense and growth induction. *Plan Cell Rep.* 21, 829-837
- Khaosaad T , García-Garrido JM , Steinkellner S , Vierheilig H (2007) Take-all disease is systemically reduced in roots of mycorrhizal barley plants. *Soil Biol Biochem* 39 : 727 – 734
- Kimura, M. y T. Kawano. 2015. Salicylic acid-induced superoxide generation catalyzed by plant peroxidase in hydrogen peroxide-independent manner. *Plan Signal & Behav*; 10, 11.

- Koua D, Cerutti L, Falquet L, Sigrist CJA, Theiler G, Hulo N, et al. PeroxiBase: a database with new tools for peroxidase family classification. *Nucleic Acids Res* 2009;37,D261–6
- Kohle, H. 1985. Chitosan-elicited Callose Synthesis In Soybean Cells As A Ca<sup>2+</sup>-Dependent Process. *Plant Physiol* 77: 544-551
- Lagrimini, L.M. y S. Rothstein. 1987. Tissue Specificity of Tobacco Peroxidase Isozymes and Their Induction by Wounding and Tobacco Mosaic Virus Infection. *Plant Physiol*; 84, 438-442
- Lee CS , Lee YJ , Jeun YC. 2005. Observations of infection structures on the leaves of cucumber plants pre-treated with arbuscular mycorrhiza *Glomus intraradices* after challenge inoculation with *Colletotrichum orbiculare*. *Plant Pathol J* 21 : 237– 243
- Mathe, C. A. Barre, C. Jourda, C. Dunand. 2010. Evolution and expression of class III peroxidases, *Arch Biochem Biophys*. 500, 58-65
- McInnis, S.M., D.C. Emery, R. Porter, R. Desikan, J.T. Hancock, y S.J. Hiscock 2006. The role of stigma peroxidases in flowering plants insights from further characterization of a stigma-specific peroxidases (SSP) from *Senecio squalidus* (Asteraceae). *J. Exp.Bot.* 8, 1835-1846.
- Minibayeva F., R.P. Beckett, I. Kranner. 2014. Roles of apoplastic peroxidases in plant response to wounding. *Phytochem.* 112, 122-129
- Moloji, M.J., O.J. Mwenye, R. Van der Merwe. 2016. Differential involvement of ascorbate and guaiacol peroxidases in soybean drought resistance. *S Afr J Sci.* 112, 9-12
- Narendra, A., S. Jogaiab, S. Itoc, A. Kestur, L. P. Tran. 2015. Improvement of growth, fruit weight and early blight disease protection of tomato plants by rhizosphere bacteria is correlated with their beneficial traits and induced biosynthesis of antioxidant peroxidase and polyphenol oxidase. *Plan Scien.* 231, 62-73
- Neill, S.J., R. Desikan, A. Clarke, R.D. Hurst, J.T. Hancock. 2002. Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants. *Journal of Experimental Botany* 53, 1237–1247
- Okey, E.N., E.J. Duncan, G. Sirju-Charran T.N. Sreenivasan. 1995. Wound-healing in cocoa (*Theobromae cacao* L.) stems and its effect on canker caused

- by *Phytophthora palmivora* (Butl.) Butler. Internat Jour of Pest Management. 41, 224–228
- Okey, E. N., E. J. Duncan, G. Sirju-Charran, T. N. Sreenivasan. 1997. *Phytophthora* Canker Resistance in Cacao: Role of Peroxidase, Polyphenoloxidase and Phenylalanine Ammonia-lyase. Jour. of Phytopathol. 145, 7, 295–299
  - Passardi, F., D. Longet, C. Penel, C. Dunand. 2004. The class III peroxidase multigenic family in rice and its evolution in land plants. Phytochem. 65, 1879–1893.
  - Passardi, F, C. Cosio, C. Penel, C. Dunand. 2005. Peroxidases have more functions than a Swiss army knife. Plant Cell Reports 24, 255–265.
  - Prakasha, A. y S. Umesha. Biochemical and Molecular Variations of Guaiacol Peroxidase and Total Phenols in Bacterial Wilt Pathogenesis of *Solanum melongena*. Biochem Anal Biochem 5, 292.
  - Peng, M. y J. Kuc´. 1992. Peroxidase-generated hydrogen peroxide as a source of antifungal activity in vitro and on leaf discs. Phytopathol. 82, 696–699.
  - Pozo, M.J., Cordier C , Dumas-Gaudot E , Gianinazzi S , Barea JM , Azcón-Aguilar C. 2002. Localized vs systemic effect of arbuscular mycorrhizal fungi on defence responses to *Phytophthora* infection in tomato plants . J Exp Bot 53, 525 – 534
  - Pozo, M.J. y C. Azcon-Aguilar. 2007. Unraveling mycorrhiza-induced resistance. Current Opinion in Plant Biol. 10: 393-398.
  - Quiroga, M., C. Guerrero, M.A. Botella, A. Barceló, I. Amaya, M.I. Medina, F.J. Alonso, S.M. de Forchetti, H. Tigier Y V. Valpuesta. 2000. A tomato peroxidase involved in the synthesis of lignin and suberin. Plant Physiol. 122, 1119–1127.
  - Ramírez, M. y A. Rodríguez. 2012. Mecanismos de defensa y respuestas de las plantas en la interacción micorrícica: una revisión. Rev Colomb Biotecnol. 14, 271-284.
  - Ramamoorthy, V., R. Viswanathan, T. Raghuchander, V. Prakasam, R. Samiyappan. 2001. Induction of systemic resistance by plant growth promoting rhizobacteria in crop plants against pests and diseases, Crop Prot. 20, 1–11
  - Raz, V. y R. Fluhr. 1992. Calcium requirement for ethylene-dependent responses. Plant Cell 4, 1123–1130

- Rivas, J., M. Baltasar, V. Moreno, L. Sánchez. 2008. Determinación de actividad peroxidasa en extractos crudos de diferentes vegetales. En: [http://www.smbb.com.mx/congresos%20smbb/morelia07/TRABAJOS/Area\\_I/C arteles/CI-16.pdf](http://www.smbb.com.mx/congresos%20smbb/morelia07/TRABAJOS/Area_I/C arteles/CI-16.pdf)
- Rodríguez, Y. E. Pérez, E. Solórzano, A. R. Meneses y F. Fernández. 2001. Peroxidase and polyphenoloxidase activities in tomato roots inoculated with *Glomus clarum* or *Glomus fasciculatum*. *Cult Tropicales*. 22(1):11-16.
- Sasaki, K., I. Takayoshi, H. Susumu, K. Katsushi, S. Shigemi, M. Ichiro, M. Atsushi, I. Masataka, I. Hiroyuki, M. Hirokazu y O. Yuko. 2004. Ten Rice Peroxidases Redundantly Respond to Multiple Stresses Including Infection with Rice Blast Fungus. *Plant Cell Physiol*; 45(10), 1442-1452
- Slezack S, Dumas-Gaudot E, Paynot M, Gianinazzi S. 2000. Is a fully established arbuscular mycorrhizal symbiosis required for bioprotection of *Pisum sativum* roots against *Aphanomyces euteiches*? *Mol Plant Microbe Interact* 13 : 238 – 241
- Song, Y., D. Chen, K. Lu, Z. Sun y R. Zeng. 2015. Enhanced tomato disease resistance primed by arbuscular mycorrhizal fungus. *Front in Plant Science*. doi: 10.3389/fpls.2015.00786
- Somssich, I.E. y K. Hahlbrock. 1998. Pathogen defence in plants a paradigm of biological complexity. *Trends Plant Sci* 3,86–90.
- Spanu, P. y P. Bonfante-Fasolo. 1988. Cell-wall-bound peroxidase activity in roots of mycorrhizal *Allium porrum*. *New Phytol* 109,119–124
- Siegel, B. Z. 1993. Plant peroxidases—an organismic perspective. *Plant Growth Regul.* 12:303–312.
- Thakker, J.N., S. Patel, P.C. Dhandhukia. 2013. Induction of defense-related enzymes in banana plants: effect of live and dead pathogenic strain of *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense, *Biotech.* 13, 1–6.
- Thordal-Christensen, H., Zhang, Z., Wei, Y., & Collinge, D. 1997. Subcellular localization of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in plants. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley-powdery mildew interaction. *Plant Journal*, 11, 1187–1194.
- Tognolli, M., C. Penel, H. Greppin, P. Simon. 2002. Analysis and expression of the class III peroxidase large gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Gene* 288, 129–138.

- Van Loon, L.C., M. Rep, C.M.J. Pieterse. 2006. Significance of inducible defence-related proteins in infected plants. *Ann Rev of Phytopath.* 44, 135–162.
- Vanitha, S.C. y S. Umesha. 2011. *Pseudomonas fluorescens* mediated systemic resistance in tomato is driven through an elevated synthesis of defense enzymes, *Biol. Plant.* 55, 317–322
- Voigt, C.A. y S.C. Somerville. 2009. Capítulo 4.4.5: Callose in Biotic Stress (Pathogenesis): Biology, biochemistry and molecular biology of callose in plant defence: callose deposition and turnover in plant–pathogen interactions. pp. 525-562. En: Bacic, A., G.B. Fincher y B.A. Stone. (ed.). *Chemistry, Biochemistry, and Biology of 1-3 Beta Glucans and Related Polysaccharides*. Primera edición. Editorial Elsevier, New York.
- Wojtaszek, P. 1997. Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. *Biochem. J.* 322: 681–692.
- Ye, X.S., S.Q. Pan, J. Kué. 1990. Activity, isozyme pattern, and cellular localization of peroxidase as related to systemic resistance of tobacco to blue mold (*Peronospora tabacina*) and to tobacco mosaic virus. *Phytopathol.* 80:1295-1299
- Yedidia, I., Benhamou, N., Chet, I. 1998. Induction of Defense Responses in Cucumber Plants (*Cucumis sativus* L.) by the Biocontrol Agent *Trichoderma harzianum*. *Rev. App. Environ Microbiol.* 65, 3, 1061-1070
- Yoshioka, H., N. Numata, K. Nakajima, S. Katou, K. Kawakita, O. Rowland, J.D.G. Jones, N. Doke. 2003. *Nicotiana benthamiana* gp91(phox) homologs NbrbohA and NbrbohB participate in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation and resistance to *Phytophthora infestans*. *The Plant Cell* 15, 706–718.
- Yoshioka H, Bouteau F, Kawano T. 2008. Discovery of oxidative burst in the field of plant immunity: looking back at the early pioneering works and towards the future development. *Plant Signal Behav.* 3,153-5.

## 6. Capítulo V

# Colonización de *Rhizophagus irregularis* e impacto de la simbiosis en parámetros de crecimiento de plántulas de cacao.

Palabras clave: cacao, colonización, *Rhizophagus irregularis*,

### 6.1 Introducción

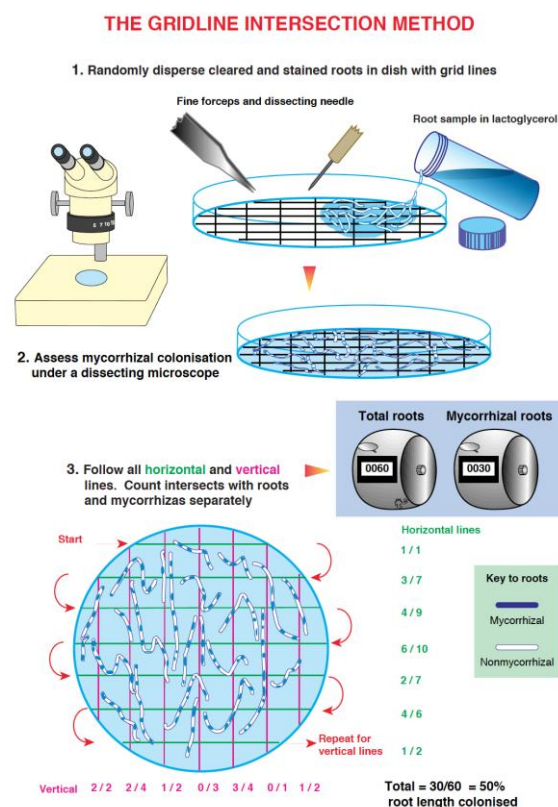
La expansión del sistema productivo de cacao en el país y su éxito productivo como cultivo perenne, en el contexto de las nuevas oportunidades de mercado, requiere de producción de plántulas de alta calidad desde la etapa de vivero para ser utilizadas como patrones en sitio definitivo en las nuevas plantaciones en campo (Fernández *et al.*, 2016). A nivel nacional, el sistema productivo de cacao se caracteriza por manejos fitosanitarios y de fertilización inadecuados en vivero (Fernández *et al.*, 2016), representando limitaciones en plantaciones adultas como crecimiento y desarrollo heterogéneo de los árboles establecidos en campo, que finalmente se traducen en bajos rendimientos.

Adicionalmente, gran parte de los viveristas de cacao desconocen los efectos positivos que se pueden lograr con la aplicación de tecnologías novedosas como los HFMA en el material vegetal (Ballesteros *et al.*, 2004). Incluso, el tiempo prolongado para alcanzar parámetros óptimos de las plántulas para su siembra en sitio definitivo, se reporta como un problema principal en viveros comerciales. Esto se explica por el uso inadecuado de productos de síntesis química y el empleo de sustratos con una población escasa de microorganismos benéficos, ocasionando desbalances nutricionales y estrés biótico y abiótico en el material de siembra.

## 6.2 Materiales y métodos

### 6.2.1 Colonización de *R. irregularis*

Se determinó el porcentaje de colonización de *R. irregularis* en las plántulas de cacao mediante el método de intersección de la grilla (Tennant, 1975), a los 21 ddi de *P. palmivora*. Para esto, se sumergieron las raíces frescas de cacao en KOH al 10%, y se calentaron en baño maría a 80°C por 15 minutos. Se lavaron con abundante agua tres veces y posteriormente se acidificaron con HCL 1% por 10 minutos. Se realizó la tinción con azul de tripano al 0.05% y se dejó actuar por 24 horas a temperatura ambiente. Se retiró el colorante, se lavó nuevamente con agua y se sumergieron en lactoglicerol al 40%. Posteriormente, las raíces teñidas se dispersaron homogéneamente sobre una caja de Petri que contenía una cuadrícula de 1 cm. La lectura del porcentaje de colonización se realizó contando las raíces teñidas (colonizadas) y las raíces totales sobre las intersecciones, de manera vertical y horizontal empleando un microscopio y estereoscópico (Fig. 1).



**Figura 1.** Método de intersección de la grilla (Tennant, 1975) para la determinación de porcentaje de colonización de HFMA en raíces.

## 6.2.2 Parámetros de crecimiento de plántulas

El crecimiento de las plántulas de cacao se midió a través de las variables altura de plántulas en cm, diámetro de tallos en mm y peso seco de plántulas en gr. La altura de las plántulas se estimó empleando un metro convencional desde la superficie del sustrato de siembra hasta la hoja superior en el tercio alto de las plántulas. El diámetro de tallos se midió con la ayuda de un instrumento calibrador de medida, dónde este parámetro se estimó en la distancia media entre la superficie del sustrato de siembra y la primera hoja del tercio bajo de las plántulas. Finalmente, el peso seco de plántulas se obtuvo pesando cada plántula sometida previamente a 48 horas en un horno de secado a 80°C en el laboratorio.

## 6.2.3 Diseño experimental

Las plántulas evaluadas en este ensayo correspondieron a las mismas del experimento II, del capítulo III de este estudio: “*Efecto de la simbiosis de HFMA con plántulas de cacao sobre el tizón o muerte regresiva de plántulas*”. Este abarcó un diseño experimental de bloques completamente al azar con cinco repeticiones y seis tratamientos según la Tabla 1.

**Tabla 1.** Tratamientos experimentales para evaluación del impacto de la simbiosis de *R. irregularis* sobre el tizón de plántulas en plántulas de cacao.

Tratamiento	Descripción	Ausencia (-) y/o Presencia (+)
1	Control <i>R. irregularis</i>	- HFMA + <i>P. palmivora</i>
2	Control <i>P. palmivora</i>	+ HFMA (Glomygel®) - <i>P. palmivora</i>
3	<i>Trichoderma asperellum</i>	+ <i>Trichoderma</i> sp. + <i>P. palmivora</i>
4	<i>Rhizophagus irregularis</i> aislado Glomygel	+ HFMA (Glomygel®) + <i>P. palmivora</i>
5	<i>Rhizophagus irregularis</i> aislado Canadá (CAN)	+HFMA (línea CAN) + <i>P. palmivora</i>

La unidad experimental correspondió a 10 plántulas de cacao con 30 dds. La inoculación de *R. irregularis* se llevó a cabo al momento de la siembra. El patógeno fue inoculado a los 30 dds, siguiendo la metodología seleccionada en la etapa 2, experimento II, del capítulo III. El ensayo tuvo una duración aproximada de dos meses.

El análisis de los datos se realizó por medio de la varianza y una prueba de comparación múltiple de Tukey. El manejo agronómico de las plántulas experimentales se realizó con base en el protocolo del Anexo 3 del capítulo III.

#### **6.2.4 Análisis estadístico**

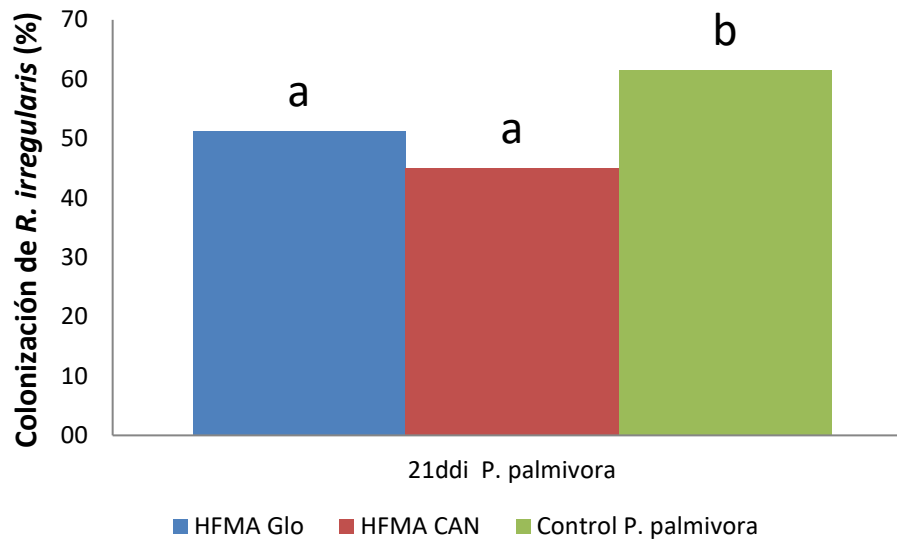
El análisis de los datos se realizó por medio de la varianza y una prueba de comparación múltiple de Tukey para las variables porcentaje de colonización, altura, diámetro del tallo y materia seca de plántulas. Esto se llevó a cabo empleando el programa estadístico R<sup>®</sup>. El manejo agronómico de las plántulas experimentales se realizó con base en el protocolo del Anexo 3 del capítulo II.

### **6.3 Resultados**

Los resultados obtenidos en las evaluaciones son una estimación del grado de colonización (%) por parte del hongo FMA *R. irregularis* en las plántulas de cacao evaluadas en esta disertación, y su impacto en variables indicadoras de crecimiento de ellas, tales como altura, diámetro de tallos y peso seco de plántulas. Los diferentes resultados representan promedios de mediciones de cada variable estimada según tratamiento.

#### **6.3.1 Porcentaje de colonización**

La colonización (%) por *R. irregularis* en las raíces de plántulas de cacao fue significativa para los tres tratamientos en el tiempo de evaluación (21 ddi *P. palmivora*) (Fig. 2). En general se obtuvieron porcentajes de colonización superiores al 50% por todos los tratamientos evaluados. Sin embargo, bajo el tratamiento “control *P. palmivora*” (+*R. irregularis* aislado Glomygel® -*P. palmivora*), se obtuvieron los mayores porcentajes de colonización con niveles promedio de 62% (Fig. 2). La frecuencia de *R. irregularis* en las raíces con los dos inóculos del HFMA fue marcadamente menor bajo la presencia de *P. palmivora*, con 51% y 45% para HFMA Glo (*R. irregularis* aislado Glomygel®) y HFMA CAN (*R. irregularis* aislado Canadiense) respectivamente (Fig. 2).



**Figura 2.** Colonización (%) de *R. irregularis* en plántulas de cacao a los 0 y 42 días después de inoculación (ddi) de *P. palmivora*.

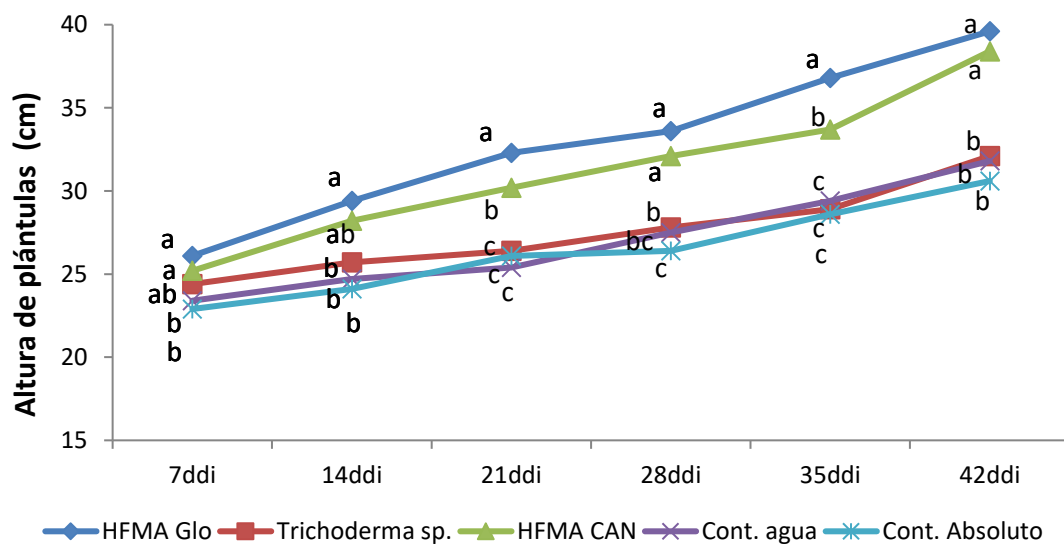
### 6.3.2 Parámetros de crecimiento

Las variables de crecimiento altura y peso seco de plántulas respondieron con significancia estadística ( $p < 0.05$ ) a los tratamientos de inoculación de los hongos FMA comparado con el tratamiento control absoluto sin inoculación (Tabla 2; Fig. 3 y 5). Las mayores alturas de plántulas fueron obtenidas con los tratamientos de inoculación de *R. irregularis*, obteniendo alturas promedio de 30,1 cm con el tratamiento HFMA Glo y 28,9 cm con HFMA CAN, en comparación con 21,9 cm obtenidas en plántulas del control absoluto (Fig. 3).

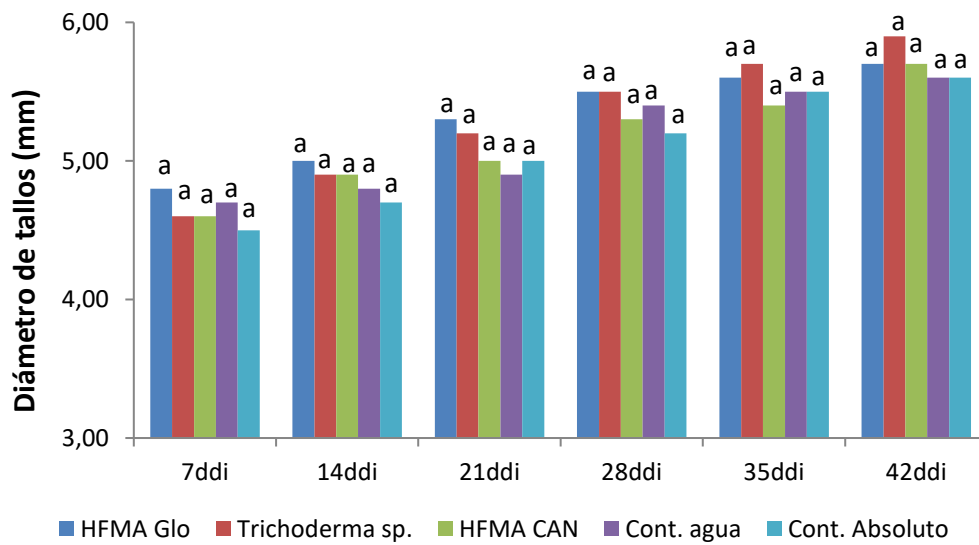
Para la variable diámetro de tallos de plántulas de cacao no se presentaron diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos (Fig. 4). La inoculación de *R. irregularis* no significó un factor de variación para el diámetro de tallos obtenido en este trabajo (Tabla 2).

**Tabla 2.** Parámetros de crecimiento de plántulas de cacao bajo los tratamientos experimentales. Altura de plántulas (cm), diámetro de tallos (mm) y peso seco de plántulas (g). La significancia estadística de tratamientos fue determinada por ANOVA. Tratamientos seguidos por el símbolo \* difieren estadísticamente por el test de Tukey ( $p < 0.05$ ). Valores medios para cinco réplicas +/- error estándar de la media.

Parámetros de crecimiento de plántulas de cacao			
Tratamiento	Altura de plántula (cm)	Diámetro de tallo (mm)	Peso seco (g)
<b>7ddi</b>			
HFMA Glo	26,1 a	4,8 a	35,4 a
HFMA CAN	25,2 a	4,6 a	32,6 b
<i>Trichoderma</i> sp.	24,4 ab	4,6 a	30,6 bc
Control Agua	23,4 b	4,7 a	29,5 c
Control Absol	22,9 b	4,5 a	28,9 c
<b>21ddi</b>			
HFMA Glo	32,3 a	5,3 a	40,8 b
HFMA CAN	30,2 ab	5,0 a	45,6 a
<i>Trichoderma</i> sp.	26,4 b	5,2 a	34,4 c
Control Agua	25,4 b	4,9 a	31,3 d
Control Absol	26,1 b	5,0 a	30,8 d
<b>42ddi</b>			
HFMA Glo	39,6 a	5,7 a	58,0 b
HFMA CAN	38,4 a	5,8 a	61,3 a
<i>Trichoderma</i> sp.	32,1 b	5,9 a	50,6 c
Control Agua	31,8 b	5,6 a	41,8 d
Control Absol	30,6 b	5,6 a	43,9 d

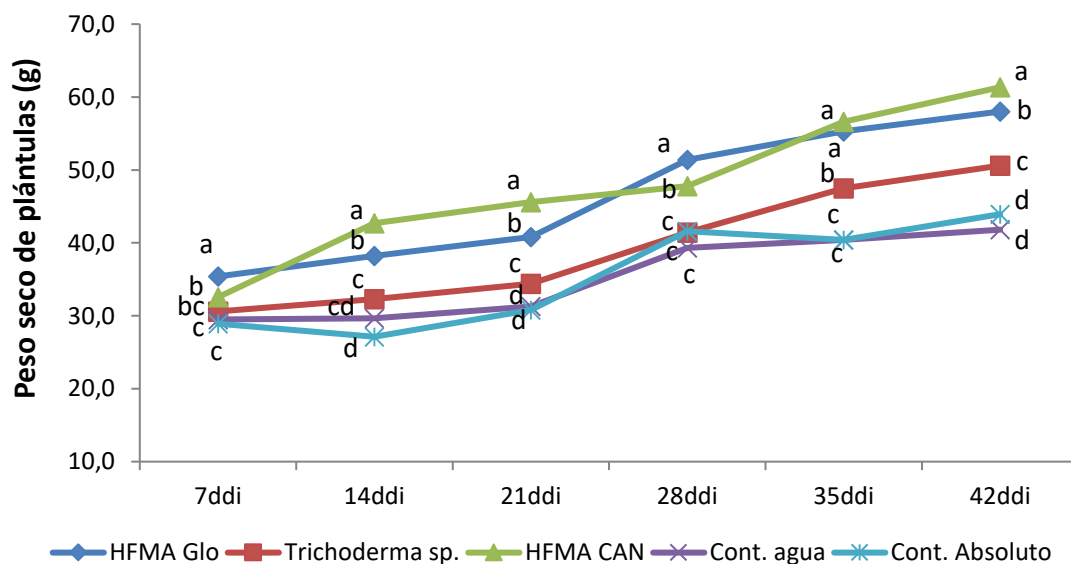


**Figura 3.** Altura de plántulas de cacao (cm) bajo el efecto de inoculación (ddi) de *R. irregularis*.



**Figura 4.** Diámetro de tallos de plántulas de cacao (mm) bajo el efecto de inoculación (ddi) de *R. irregularis*.

En cuanto al peso seco de plántulas de cacao, los valores medios para esta variable presentaron diferencias significativas entre los tratamientos evaluados (Tabla 2). Plantas inoculadas con *R. irregularis* obtuvieron un mayor peso seco o biomasa seca comparado con los tratamientos sin inoculación de HFMA (Fig.5).



**Figura 5.** Peso seco de plántulas de cacao (g) bajo el efecto de inoculación (ddi) de *R. irregularis*.

## 6.4 Discusión

La obtención de plántulas de cacao más vigorosas, de mayor crecimiento y con una mejor respuesta de defensa ante la “marchitez de plántulas” en vivero por la inoculación con HFMA como *R. irregularis*, tal como se evidenció en este trabajo (Cap. III y IV), puede contribuir a optimizar el proceso productivo de cacao en general, desde esta etapa inicial de cultivo. Así, plántulas de mayor vigor y sanidad sembradas en campo, determinan mayor productividad de los árboles en las futuras plantaciones. De igual forma, la obtención de plántulas micorrizadas con mejor crecimiento y desarrollo durante esta etapa de producción, puede reducir los tiempos de permanencia y mantenimiento en vivero y por tanto, la reducción de costos de producción.

El manejo de hongos HFMA y su inoculación en sistemas agrícolas, se ha reconocido como una tecnología novedosa, eficaz y ecológicamente pertinente que plantea alternativas de desarrollo como práctica biológica promisoría para el sector agrícola y forestal en Colombia (Ballesteros *et al.*, 2004). La simbiosis de plantas de cultivo con estos hongos representa un beneficio a nivel nutricional y de protección fitosanitaria en la defensa contra patógenos tan agresivos como *Phytophthora* spp., de forma tal que hace parte del manejo integrado de suelos, enfermedades y propagación vegetal.

Esto, es apropiado para las condiciones propias de la zona de estudio dónde los suelos se caracterizan por ser fuertemente ácidos, que dificultan la disponibilidad de fósforo y de otros elementos, y por la expresión natural del patógeno en las plántulas del tratamiento control como se evidenció en este estudio. Limitantes agronómicas que han sido poco estudiadas en la región en relación con el beneficio que puede obtenerse con estos hongos HFMA.

### 6.4.1 Porcentaje de colonización

En este estudio, se evaluaron los niveles de colonización de *R. irregularis* y su efecto en el crecimiento de plántulas de cacao, bajo los tratamientos experimentales descritos en la Tabla 1. Esto debido a que no se conoce si los efectos de este hongo FMA depende del grado o nivel de colonización en plántulas de cacao. En este sentido, es necesario tener en cuenta que el nivel de colonización depende de varios factores tales como densidad de raíces del hospedero, la identidad del hongo FMA

involucrado (Ballesteros *et al.*, 2004) y de la planta incluso a nivel varietal (Ceballos, 2016).

Este último factor se ha evidenciado en diversos ensayos donde se ha comprobado que las condiciones edafo-climáticas son esenciales en la respuesta de la simbiosis también (Smith y Read, 2008). En este trabajo, encontramos que los niveles de colonización por *R. irregularis* en las raíces de plántulas de cacao fueron notoriamente mayores comparados con lo reportado por Ballesteros *et al.* (2004), donde inocularon los HFMA *G. fasciculatum* y *Acaulospora* sp. por separado en un vivero experimental en Tumaco (Colombia) y alcanzaron porcentajes de colonización no superiores al 35%. Esto indica la fuerte relación de asociación específica entre el HFMA *R. irregularis* y el material vegetal clonal de cacao IMC67 a nivel de vivero, promisorio para ser aplicada a nivel de producción comercial. Esto es muy significativo, teniendo en cuenta que IMC67 es el material más ampliamente utilizado en viveros del país para ser establecido como patrón en los lotes productivos de los cacaocultores.

#### **6.4.2 Parámetros de crecimiento**

En esta investigación, se evidenció un crecimiento significativo de las plántulas inoculadas con *R. irregularis*, medido a través de las variables altura, materia seca y diámetro del tallo de plántulas de cacao. Sin embargo, aunque no se evidenciaron diferencias significativamente a nivel de esta última variable, si se expresó en la altura y materia seca de las plántulas (Tabla 2, Fig 3 y 5). Esto en concordancia con Ballesteros *et al.* (2004) quienes evaluaron plántulas de cacao inoculadas con hongos FMA nativos, reportando mayor crecimiento en variables de altura y diámetro, atribuyendo con esto una reducción en el tiempo durante la etapa de vivero y por tanto, reducción de aplicaciones de productos de síntesis química y de costos de producción en vivero. En este estudio se presentó un aumento en la altura y materia seca de las plántulas por efecto de la inoculación de *R. irregularis* (Tabla 2, Fig 3 y 5), lo cual podría significar una reducción del tiempo en condiciones de vivero comercial y así representar una ventaja en la producción de plántulas.

Varios estudios han mostrado resultados sobre los beneficios de los hongos FMA a nivel de crecimiento de plántulas de cacao donde se compara frecuentemente la altura

y materia seca de plántulas micorrizadas versus no micorrizadas, atribuyendo los resultados contrastantes obtenidos a diferencias en la absorción de P (Ballesteros *et al.*, 2004; Sudradjat, 2014; Suparno *et al.*, 2015), producción de hormonas, etc.

Para la variable diámetro del tallo de las plántulas, no se evidenciaron diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos empleados (Tabla 1) en todos los tiempos de evaluados. Esto contrasta con lo reportado por Erazo (2013) quién encontró diferencias entre tratamientos de inoculación de HFMA nativos y el tratamiento sin inoculación en esta variable de crecimiento en plántulas de cacao.

## 6.5 Conclusiones

Bajo las condiciones experimentales presentadas en este estudio, el hongo FMA *R. irregularis* tuvo un efecto significativo sobre variables de crecimiento en plántulas de cacao del clon IMC67, representado en mayor altura y ganancia de materia seca del material vegetal evaluado durante la etapa de vivero. Además, los porcentajes de colonización obtenidos por esta especie simbiote en las raíces de las plántulas, fueron mayores comparados con otros estudios en diferentes regiones del país. Esto indica que *R. irregularis* es una tecnología novedosa que podría contribuir beneficiosamente y de manera significativa a la producción de cacao en el contexto de las potencialidades y planes de expansión productiva en la Orinoquía Colombiana.

## 6.6 Bibliografía

- Ballesteros W., A. Unigarro, C.E. Cadena, J.A. Cadena. 2004. Evaluación de hongos formadores de micorrizas vesículo arbusculares en la etapa de almacigo de cacao (*Theobroma cacao* L.) en Tumaco. Informe técnico del proyecto. Revista de Ciencias Agrícolas. Fecha de consulta 12- 01- 2013. <http://revistas.udenar.edu.co/index.php/rFACIA/article/view/504/528>
- Erazo G. 2013. “Evaluación de la efectividad de las micorrizas arbusculares nativas sobre el desarrollo y estado nutritivo en plantas de vivero de cacao (*Theobroma cacao* L.) en el cantón santo domingo”. Escuela Politécnica del Ejército Departamento de Ciencias de la Vida, Santo Domingo.
- Sieverding, E. 1991. Vesicular-arbuscular mycorrhiza management in tropical agroecosystems. Deutsche Gesellschaft fur Technische Zusammenarbeit, Bremer, Germany. p. 5 – 10.
- Suparno A, Prabawardani S, Yahya S y Taroreh N.A. 2015. Inoculation of Arbuscular Mycorrhizal Fungi Increase the Growth of Cocoa and Coffee Seedling Applied with Ayamaru Phosphate Rock. Jour of Agricul Science. 7(5):199-210.
- Sudradjat S. 2014. Arbuscular Mycorrhizal Fungi Increase Growth of Cocoa Seedlings Applied with Papuan Crandallite Phosphate Rock. Europ Jour of Scient Research. 127(3): 260-268.

## 7. Conclusiones Generales

Esta disertación representa el primer estudio descriptivo general sobre la afectación de *P. palmivora* en el sistema productivo de cacao, a nivel de vivero y campo, en el trópico ácido colombiano y el efecto de interacción del hongo FMA *R. irregularis* con el patosistema *P. palmivora* - plántulas de cacao, analizando algunos indicadores de resistencia inducida en plantas y parámetros morfológicos de crecimiento.

Morfotipos asociados a hongos FMA del género *Rhizophagus* se encontraron asociados a la rizósfera de plantas de cacao en condiciones de campo en la zona de estudio, lo que indica que este género de HFMA es ocurrente y establece una asociación simbiótica con plantas de este sistema productivo. Su abundante presencia local corroboró la importancia de este género de HFMA en cacao en la zona de estudio.

En plantas adultas de cacao, la genética del hospedero determinó la distribución de la incidencia de *Phytophthora* spp. en campo, donde el manejo genético de la enfermedad, causada por este agente fitopatógeno, no es suficiente para su control ni eficiente en términos temporales y económicos para su establecimiento según reportes.

En vivero, con la inoculación y establecimiento de la simbiosis entre *R. irregularis* y plántulas de cacao, se observó una reducción significativa en la intensidad del tizón de plántulas (*P. palmivora*) en cacao, expresada en menor aparición y desarrollo de lesiones en las plántulas. A nivel fisiológico, se observó un incremento en la actividad GPX y de deposición de calosa en los tejidos de estas. Los resultados de este estudio sugieren que *R. irregularis* contribuye en la activación de una respuesta sistémica de defensa más rápida en las plántulas de cacao frente a la infección por *P. palmivora*, resultando en una menor expresión de la enfermedad bajo las condiciones experimentales dadas.

Los resultados expuestos en este trabajo no son extrapolables a otros patosistemas que contengan agentes causales u hospederos clonales de cacao ajenos a los

empleados aquí y sólo serían aplicables al producto comercial y aislado de *R. irregularis* inoculados en este estudio.

## 8. Recomendaciones Generales

Se sugiere evaluar más detalladamente la interacción entre el patosistema analizado en este trabajo y la inoculación de *R. irregularis* a nivel de vivero para entender mejor la funcionalidad de este hongo FMA frente a la enfermedad provocada por la inoculación de *P. palmivora*. Futuras investigaciones deben enfocarse en evaluar respuestas de defensa adicionales que aborden indicadores más detallados a niveles moleculares y/o genéticos para entender los mecanismos de defensa inducida por este hongo FMA.

Los avances en el conocimiento básico de la interacción *R. irregularis* – plántulas de cacao como el presentado aquí, sumado a la identificación de marcadores asociados con resistencia inducida, así como la generación de modelos predictivos de respuesta de interacciones particulares, podría tener implicaciones prácticas en el control biológico y manejo integrado de enfermedades causadas por *Phytophthora* sp. en cacao en la fase de vivero. Por lo tanto, es necesario explorar estos frentes de trabajo para entender más a fondo los mecanismos que rigen la resistencia inducida por *R. irregularis* en plántulas de cacao.

Por último, con base en los resultados de este trabajo, se proyecta la posible utilidad del uso de inoculantes que contengan el hongo FMA *R. irregularis* para el control de la enfermedad causada por *P. palmivora*. Estos inoculantes compuestos por propágulos de este hongo FMA, perteneciente al género *Rhizophagus* que fue representativo en la zona de estudio según los resultados obtenidos en la caracterización de los HFMA locales, pueden contribuir significativamente en el manejo preventivo de la enfermedad a nivel de viveros comerciales. La transferencia de esta tecnología novedosa puede ser aplicada en la zona de estudio y otras regiones cacaoteras del país, sin embargo, debe tenerse en cuenta los recursos de HFMA locales presentes en cada región.

Lo anterior teniendo en cuenta la importancia de la aplicación de HFMA autóctonos en

bioinoculantes, que pueden presentar mayor adaptación a las condiciones físico-químicas y microbiológicas del suelo, así como una mayor promoción de la biodiversidad local de suelos cacaoteros.

## 9. Bibliografía General

- Alkan N, Gadkar V, Yarden Q, Kapulnik Y. 2006. Analysis of quantitative interactions between two species of arbuscular mycorrhizal fungi, *Glomus mosseae* and *G. intraradices*, by real-time PCR. *Applied and Environmental Microbiology* 72: 4192–4199.
- Anderson R.D. y D.I. Guest. 1990. The control of black pod, canker and seedling blight of cocoa, caused by *Phytophthora palmivora*, with potassium phosphonate. *Austra. Plant. Pathol.* 19(4): 127-129
- Angelard, C., A. Colard, H. Niculita-Hirzel, D. Croll, I. R. Sanders. 2010. Segregation in a Mycorrhizal Fungus Alters Rice Growth and Symbiosis-Specific Gene Transcription. *Current Biology* 20: 1216-1221
- Angelard, C. y I. Sanders. 2011. Effect of segregation and genetic exchange on arbuscular mycorrhizal fungi in colonization of roots. *New Phytologist* 189: 652-657
- Arcos, A.L., L.A. Narro. 2009. Calosa como herramienta de selección para tolerancia del maíz al aluminio. *Manual de laboratorio.* México, D.F.: CIMMYT.
- Arnold, A.E., L.C. Mejía, Kylo, D. Rojas, E. Maynard, Z. Robbins, N. Herre, E.A. 2003. Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100: 15649–15654.
- Bowers, J. H., B. A. Bailey, P. K. Hebbar, S. Sanogo, R. D. Lumsden. 2001. The impact of plant diseases on world chocolate production. En: *Plant Health Progress*, <http://www.apsnet.org/publications/apsnetfeatures/Pages/WorldChocolateProduction.aspx>; consulta: junio 2016.
- Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry*.73: 248-250.
- Ceballos, I.C., M. Ruiz, C. Fernández, R. Peña, A. Rodríguez, I.R. Sanders. 2013. The In Vitro Mass-Produced Model mycorrhizal fungus, *Rhizophagus irregularis*, significantly increases yields of the globally important food security crop cassava. *Plos One* 8(8): e70633. doi:10.1371/journal.pone.0070633
- Ceballos, I.C., C. Fernández, A. Rodríguez, I.R. Sanders. 2014. Within-species genetic differences in *Rhizophagus irregularis* induce a wide range of growth

responses of cassava in the field and in the presence of a native AMF community. 33rd New Phytologist Symposium. P 79.

- Chant, S.R. 1957. A Die-back of Cacao Seedlings in Nigeria caused by a Species of *Phytophthora*. Nature 180, 1494-1495.
- Conrath U, Beckers GJM, Flors V, Garcia-Agustin P, Jakab G, Mauch F, Newman MA, Pieterse CMJ, Poinssot B, Pozo MJ, Pugin A, Schaffrath U, Ton J, Wendehenne D, Zimmerli L, Mauch-Mani B. 2006. Priming: getting ready for battle. Mol Plant Microbe Interact 19 : 1062 – 1071
- Cordier C, Pozo MJ, Barea JM, Gianinazzi S, Gianinazzi-Pearson V. 1998. Cell defense responses associated with localized and systemic resistance to *Phytophthora* induced in tomato by an arbuscular mycorrhizal fungus. Mol Plant Microbe Interact 11 : 1017 – 1028
- Declerck, S., D. G. Strullu, J. A. Fortin. 2005. In Vitro Culture of Mycorrhizas. New York, NY: Springer-Verlag, Berlin Heidelberg. doi: 10.1007/b138925
- Drenth, A. y D. Guest. 2004. *Phytophthora* in the Tropics, pp. 29-41. En: André Drenth, A. y David I. Guest (Eds.), Diversity and Management of *Phytophthora* in Southeast Asia, 1ra. Ed. Australian Centre for International Agricultural Research. Monograph No. 114, 238pp
- Drenth, A. y B. Sendall. 2004. Isolation of *Phytophthora* from Infected Plant Tissue and Soil, and Principles of Species Identification, pp. 94-102. En: André Drenth A. y I. Guest (Eds.), Diversity and Management of *Phytophthora* in Southeast Asia, 1ra. Ed. Australian Centre for International Agricultural Research. Monograph No. 114, 238pp
- Drenth, A. G. Wagels, B. Smith, B. Sendall, C. O'Dwyer, G. Irvine y J. A. G. Irwin. 2006. Development of a DNA-based method for detection and identification of *Phytophthora* species. Austral Plant Pathol. 35: 147–159
- Dugassa, G.D., V. Alten y F. Schonbeck. 1996. Effects of arbuscular mycorrhiza on health of *Linum usitatissimum* L. infected by fungal pathogens. Plant and Soil 185:173-182.
- Elsen A, Gervacio D , Swennen R , De Waele D. 2008. AMF-induced biocontrol against plant parasitic nematodes in *Musa* sp.: a systemic effect. Mycorrhiza 18 : 251 – 256
- Engelberth, J., E.A. Schmelz, H.T. Alborn, Y.J. Cardoza, J. Huang and J.H. Tumlinson. 2003. Simultaneous quantification of jasmonic acid and salicylic acid

in plants by vapor-phase extraction and gas chromatography-chemical ionization-mass spectrometry. *Analytical Biochemistry* 312 (2003) 242–250.

- Evans, H.C., Holmes, K.A., Thomas, S.E., 2003. Endophytes and mycoparasites associated with an indigenous forest tree, *Theobroma gileri*, in Ecuador and a preliminary assessment of their potential as biocontrol agents of cocoa diseases. *Mycological Program* 2: 149–160
- Feddermann, N., Finlay, R., Boller, T., and Elfstrand, M. 2010. Functional diversity in arbuscular mycorrhiza – the role of gene expression, phosphorous nutrition and symbiotic efficiency. *Fungal Ecol.* 3, 1–8. doi: 10.1016/j.funeco.2009.07.003
- Fernández, A. 2003. Actividad peroxidasa, polifenoloxidasa, fenilalanina, amonio liasa y glucanasa en somaclones y mutantes de arroz. *Revista de Protección Vegetal*, 18: 183-188.
- Gallou, A., H.P. Mosquera, S. Cranenbrouck, J.P. Suárez, S. Declerck. 2011. Mycorrhiza induced resistance in potato plantlets challenged by *Phytophthora infestans*. *Physiological and Molecular Plant Pathol.* 76:20-26.
- Garzón, M. 2013. Análisis de la competitividad agrícola del municipio de Arauca (Arauca): corregimiento de Todos los Santos. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá D.C.
- Gerdermann, J. W. y T.H Nicolson. 1963. Spores of mycorrhizal species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Transactions of the British Mycological Society.* 46: 235-244.
- Gernns H , von Alten H , Poehling HM. 2001. Arbuscular mycorrhiza increased the activity of a biotrophic leaf pathogen - is a compensation possible? *Mycorrhiza* 11 : 237 – 243
- Giovannetti, M. y B. Mosse. 1980. An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New Phytologist.* 84: 489–500
- Glazebrook. 2005. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Ann Rev Phytopathol* 43:205–227
- Graham, J.H. 2011. What do root pathogens see in mycorrhizas?. *New Phytol.* 149: 357–359
- Gregory, P. H., ed. 1974. *Phytophthora* disease of cocoa. London: Longman.
- Hanada, R., A. W. Pomella, W. Soberanis, L. Loguercio, J.O. Pereira. 2009.

- Biocontrol potencial of *Trichoderma martiale* against the black-pod disease (*Phytophthora palmivora*) of cacao. *Biological control* 50:143-149.
- Hao, P., C. Liu, Y. Wang, R. Chen, M. Tang, B. Du, L. Zhu, G. He. 2008. Herbivore-induced callose deposition on the sieve plates of rice: an important mechanism for host resistance. *Plant Physiol.* 146: 1810-1820.
  - Harley, J.L., S.E. Smith. 1983. *Mycorrhizal Symbiosis*. London, UK, Academic Press.
  - Haskins, F.S. 1955. Changes in the Activities of Several Enzymes during Germination and Seedling Development in Corn (*Zea mays* L.). *Plant Physiology*, 30 (1): 74–78.
  - Herre, E.A., D. Kyllö, S. Mangan, R. Husband, L.C. Mejía, A.H. Eom. 2005. An overview of arbuscular mycorrhizal fungal composition, distribution and host effects from a tropical moist forest, pp. 205-225. En: D.F. Burslem, M. A. Pinard and S. E. Hartley (eds.). *Biotic Interactions in the Tropics: Their Role in the Maintenance of Species Diversity*, 1a ed. Cambridge University.
  - Hijri, M. y I.R Sanders. 2005. Low gene copy number shows that arbuscular mycorrhizal fungi inherit genetically different nuclei. *Nature* 433: 160–163.
  - ICA (Instituto Colombiano Agropecuario). 2012. Manejo fitosanitario del cultivo del cacao (*Theobroma cacao* L.) Medidas para la temporada invernal. Bogotá.
  - ICA (Instituto Colombiano Agropecuario). 2013. El ICA apoya Plan Nacional de Renovación de Cacao. En: ica comunica, <http://www.ica.gov.co/Periodico-Virtual/Prensa/2013/El-ICA-apoya-Plan-Nacional-de-Renovacion-de-Cacao.aspx>; consulta: Agosto 2015.
  - Janoušková M, Krak K, Wagg C, Štorchová H, Čaklová P, Vosátka M. 2013. Effects of inoculum additions in the presence of a preestablished arbuscular mycorrhizal fungal community. *Applied and Environmental Microbiology* 79: 6507–6515.
  - Jansa J, Smith FA, Smith SE. 2008. Are there benefits of simultaneous root colonization by different arbuscular mycorrhizal fungi? *New Phytologist* 177: 779–789.
  - Jung, S.C., A. Martínez-Medina, J.A. López-Ráez, and M.J. Pozo. 2012. Mycorrhiza-induced resistance and priming of plant defenses. *J. Chem. Ecol.* 38, 651–664. doi: 10.1007/s10886-012-0134-6
  - Khaosaad T , García-Garrido JM , Steinkellner S , Vierheilig H (2007) Take-all

disease is systemically reduced in roots of mycorrhizal barley plants. *Soil Biol Biochem* 39 : 727 – 734

- Koch A.M., P. M. Antunes, H. Maherali, M. M. Hart y J. N. Klironomos. 2017. Evolutionary asymmetry in the arbuscular mycorrhizal symbiosis: conservatism in fungal morphology does not predict host plant growth. *New Phytol.* DOI: 10.1111/nph.14465
- Köhl L, Lukasiewicz, E. C, Heijden van der, van der Heijden MG. 2016. Establishment and effectiveness of inoculated arbuscular mycorrhizal fungi in agricultural soils. *Plant, Cell and Environment* 39: 136–146.
- Kuhn, G., M. Hijri, I.R. Sanders. 2001. Evidence for the evolution of multiple genomes in arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature* 414: 745–748.
- Lagrimini, L.M. y S. Rothstein. 1987. Tissue Specificity of Tobacco Peroxidase Isozymes and Their Induction by Wounding and Tobacco Mosaic Virus Infection. *Plant Physiol*, 84: 438-442.
- Lass, R.A. 1985. Diseases. In: Wood, L.R., ed., *Cocoa*. New York, Longman, Inc.
- Liu, J. I. Maldonado, M. Lopez, F. Cheung, C.D. Town, M. Harrison. 2007. Arbuscular mycorrhizal symbiosis is accompanied by local and systemic alterations in gene expression and an increase in disease resistance in the shoots. *Plant J.* 50:529-544.
- Luz, E.D. y M.N., Silva. 2001. Podridão-parda dos frutos, cancro e outras doenças causadas por *Phytophthora* no cacauero. En: Luz, E.D.M.N., Santos, A.F. dos, Matsuoka, K., Bezerra, J.L. (Eds.), *Doenças causadas por Phytophthora no Brasil*. Livraria Rural, Campinas, pp. 175–265.
- Maherali H, Klironomos JN. 2007. Influence of Phylogeny on Fungal. *Science*: 1746– 1748.
- Martínez-Medina A., A. Roldán, J. A. Pascual. 2011. Interaction between arbuscular mycorrhizal fungi and *Trichoderma harzianum* under conventional and low input fertilization field condition in melon crops: Growth response and Fusarium wilt biocontrol. *Applied Soil Ecology* 47: 2 98–105
- McGonigle T., M. Miller, D. Evans, G. Fairchild, J. Swan. 1990. A new method which gives an objective-measure of colonization of roots by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist*. 115:495-501.
- McMahon P. y A. Purwantara. 2004. *Phytophthora* on cocoa pp. 104-115. En:

- André Drenth y David I. Guest (Eds.), Diversity and Management of *Phytophthora* in Southeast Asia, 1ra. Ed. Australian Centre for International Agricultural Research. Monograph No. 114, 238pp
- Mejía, L. C., E.I. Rojas, Z. Maynard, S. Van Bael, A. E. Arnold, P. Hebbar, G. J. Samuels, N. Robbins, E. A. Herre. 2008. Endophytic fungi as biocontrol agents of *Theobroma cacao* pathogens. *Biological Control* 46:4-14.
  - Mensah, J. A., Koch, A. M., Antunes, P. M., Kiers, E. T., Hart, M., and Bucking, H. 2015. High functional diversity within species of arbuscular mycorrhizal fungi is associated with differences in phosphate and nitrogen uptake and fungal phosphate metabolism. *Mycorrhiza* doi: 10.1007/s00572-015-0631-x.
  - Morandi, D.G. y G. Pearson. 1985. Influence of mycorrhizal infection and phosphate nutrition on secondary metabolite contents of soybean roots. INRA, Paris.
  - Munkvold, L., R. Kjoller, M. Vestberg, S. Rosendahl. 2004. High functional diversity within species of arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol.* 164(2):357-364
  - Nikhat, S. y S.A., Naqvi. 2004. Mycorrhiza in management of fruits and vegetables diseases. *Diseases of fruits and vegetables: volume II, India.*
  - Oehl F, Laczko E, Bogenrieder A, Stahr K, Bösch R, van der Heijden M, Sieverding E. 2010. Soil type and land use intensity determine the composition of arbuscular mycorrhizal fungal communities. *Soil Biology and Biochemistry* 42: 724–738.
  - Öpik M, Moora M, Liira J, Zobel M. 2006. Composition of root-colonizing arbuscular mycorrhizal fungal communities in different ecosystems around the globe. *Journal of Ecology* 94: 778–790.
  - Pellegrino E, Bedini S, Avio L, Bonari E, Giovannetti M. 2011. Field inoculation effectiveness of native and exotic arbuscular mycorrhizal fungi in a Mediterranean agricultural soil. *Soil Biology and Biochemistry* 43: 367–376.
  - Pinzón, J., J. Rojas, F. Rojas. 2008. Guía técnica para el cultivo de cacao. Bogotá: FEDECACAO.
  - Pozo, M.J., Cordier C , Dumas-Gaudot E , Gianinazzi S , Barea JM , Azcón-Aguilar C. 2002. Localized vs systemic effect of arbuscular mycorrhizal fungi on defence responses to *Phytophthora* infection in tomato plants . *J Exp Bot* 53 : 525 – 534

- Pozo, M.J. y C. Azcon-Aguilar. 2007. Unraveling mycorrhiza-induced resistance. *Current Opinion in Plant Biol.* 10: 393-398.
- Pozo, M.J., A. Verhage, J. García, C. Azcón-Aguilar. 2009. Priming plant defense against pathogens by arbuscular mycorrhizal fungi. En: Azcón-Aguilar, C., J. Barea, S., V. Gianinazzi, Gianinazzi-Pearson (Eds). *Mycorrhizas: functional processes and ecological impact.* Heidelberg: Springer-Verlag. Pp 1:23-35
- Pozo, M.J., J.A. López-Ráez, C. Azcón-Aguilar, J.M. García-Garrido. 2015. Phytohormones as integrators of environmental signals in the regulation of mycorrhizal symbioses. *New Phytol* 205: 1431-1436
- Pieterse, C.M., J. A. Reyes, S. Van der, C.M. Van Wees. Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nchembio.* 164
- Plenchette, C., C. Clermont-Dauphin, J.M. Meynard, J.A. Fortin. 2005. Managing arbuscular mycorrhizal fungi in cropping systems. *Can. J. Plant Sci.* 85, 31e40.
- Radford, J.E., M. Vesk, P.L. Overall. 1998. Callose Deposition at Plasmodesmata. *Protoplasma*, 201:30-37.
- Ramírez JG. 2016. Pérdidas económicas asociadas a la pudrición de la mazorca del cacao causada por *Phytophthora* spp. y *Moniliophthora roreri* (Cif y Par) Evans *et al.*, en la hacienda Theobroma, Colombia. *Rev de Prot Veg.*; 31(1):42-49.
- Richards, N. 2011. Cocoa nursery manual, plant production and nursery operations for cocoa nurseries in the Philippines. 1 Edition. USDA-ACDI/VOCA. Filipinas.
- Rodríguez, J.N., D. López, T. Serrano, F. García. 2002. Enzima con actividad peroxidasa aislada de la alcachofa (*Cynara scolymus* L.), procedimiento para su aislamiento y purificación y aplicaciones. *Oficina Española de patentes y marcas.* Solicitud de patente. Universidad de Murcia. España.
- Rodríguez, E. y A.G. Vera. 2015. Identificación y manejo de la pudrición parda de la mazorca (*Phytophthora* sp.) en cacao. En: Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria -Corpoica-, [http://digitool.gsl.com.mx:1801/webclient/StreamGate?folder\\_id=0&dvs=1478733468175~59](http://digitool.gsl.com.mx:1801/webclient/StreamGate?folder_id=0&dvs=1478733468175~59). 60 p.; consulta: septiembre 2016.
- Rubini, M.R., R.T. Silva-Ribeiro, A.W.V. Pomella, C.S. Maki, W.L. Araújo, D.R.

- dos Santos, J.L. Azevedo. 2005. Diversity of endophytic fungal community of cacao (*Theobroma cacao* L.) and biological control of *Crinipellis pernicioso*, causal agent of Witches' Broom Disease. *International Journal Biological Science* 1:24–33.
- Schenck N.C. 1981. Can mycorrhizae control root diseases?. *Plant Disease* 65: 230–234.
  - Schopfer P. 2001. Release of reactive oxygen intermediates (superoxide radicals, hydrogen peroxide, and hydroxyl radicals) and peroxidase in germinating radish seeds controlled by light, gibberellins and abscisic acid. *Plant Physiol.* 125:1591-1602.
  - Slezack S, Dumas-Gaudot E, Paynot M, Gianinazzi S. 2000. Is a fully established arbuscular mycorrhizal symbiosis required for bioprotection of *Pisum sativum* roots against *Aphanomyces euteiches*? *Mol Plant Microbe Interact* 13 : 238 – 241
  - Smith S y Read D. 2008. *The Mycorrhizal Symbiosis*. San Diego: Academic Press Elseiver e: 10–90.
  - Somssich, I.E. y K. Hahlbrock. 1998. Pathogen defence in plants a paradigm of biological complexity. *Trends Plant Sci* 3,86–90.
  - Sriwati, R. y R. Muarif. 2012. Characteristic symptoms of *Phytophthora palmivora* on cocoa leaves. *Jurn. Natu.* Vol. 12 No. 2
  - Sriwati, R., R. L. Melnick, R. Muarif , M. D. Strem , G. J. Samuels, B. A. Bailey. 2015. *Trichoderma* from Aceh Sumatra reduce *Phytophthora* lesions on pods and cacao seedlings. *Biol. Control.* 89:33-41
  - Tchameni, S.N., M.E.L. Ngonkeu, B.A.D. Begoude, L. Wakam, R. Fokom, A.D. Owona, J.B. Mbarga, T. Tchana, P.R. Tondje, F.X. Etoa y J. Kuate. 2011. Effect of *Trichoderma asperellum* and arbuscular mycorrhizal fungi on cacao growth and resistance against black pod disease. *Crop Protection* 30: 1321-1327
  - Ten Hoopen, G.M., R. Rees, P. Aisa, T. Stirrup, U. Krauss 2003. Population dynamics of epiphytic mycoparasites of the genera *Clonostachys* and *Fusarium* for the biocontrol of black pod (*Phytophthora palmivora*) and moniliasis (*Moniliophthorororeri*) on cocoa (*Theobroma cacao*). *Mycological Research* 107: 587–596.
  - Tisserant, E., M. Malbreil, A. Kuo, A. Kohler, A. Symeonidi, R. Balestrini. 2013. Genome of an arbuscular mycorrhizal fungus provides insight into the oldest

- plant symbiosis. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 110, 20117–20122.
- Tondje, P.R., K.P. Hebbbar, G. Samuels, J.H. Bowers, S. Weise, E. Nyemb, D. Begoude, J. Foko, D. Fontem. 2006. Bioassay of *Genicolo sporium* species for *Phytophthora megakarya* biological control on cacao pod husk pieces. African Journal of Biotechnology 5, 648–652.
  - Walder, F., Niemann, H., Natarajan, M., Lehmann, M. F., Boller, T., and Wiemken, A. 2012. Mycorrhizal networks: common goods of plants shared under unequal terms of trade. Plant Physiol. 159, 789–797.
  - Whipps, J.M. 2004. Prospects and limitations for mycorrhizas in biocontrol of root pathogens. Canadian Journal of Botany. 82:1 198-227.
  - Zamioudis C. y C. M. J. Pieterse. 2012. Modulation of Host Immunity by Beneficial Microbes. Mol Plant-Microb Interac. 25 (2): 139–150. DOI: 10.1094/MPMI-06-11-0179
  - Zhu H.H y Q. Yao. 2004. Localized and systemic increase of phenols in tomato roots induced by *Glomus versiforme* inhibits *Ralstonia solanacearum*. J Phytopathol 152 : 537 – 542