

Selección de plantas de cacao resistentes a la moniliasis usando savia del floema y fluidos embrionarios de frutos jóvenes

Enrique Arévalo G.¹
Cecilia Ortiz B.¹
Luis Zúñiga C.¹
Janet Gonzales V.¹

Introducción

La moniliasis del cacao, causada por el hongo *Moniliophthora roreri* (Cif & Par) Evans et ál., ocasiona pérdidas anuales que varían entre países y regiones llegando a niveles mayores al 90% (Barros 1977). *M. roreri* infecta solo frutos, en cualquier estado de crecimiento, siendo más susceptibles antes de los 90 días. El primer indicador de su ataque es la aparición de manchas con apariencia de madurez precoz sobre la mazorca, sin otro síntoma externo; las manchas se vuelven de color pardo y después crecen hasta cubrir toda la superficie del fruto. En condiciones favorables, las manchas se cubren con una capa de micelio blanco que tiene gran cantidad de esporas. Las esporas pueden permanecer adheridas a la superficie de la mazorca durante mucho tiempo en forma de polvo blanco, siendo una fuente de inóculo de fácil dispersión. Algunos frutos infectados pueden no mostrar síntomas externos, pero al abrirlos se encuentra en ellos líquido en abundancia, que resulta de la degradación de tejidos por el patógeno (Evans 1981, Arévalo 1992).

Se ha logrado cierto control de la enfermedad con la aplicación de sustancias químicas a base de cobre (Ram 1989). El control cultural (remoción de frutos infectados) tiene poco éxito si la incidencia es alta, pues el patógeno tiene una gran capacidad de esporulación sobre frutos infectados, ocasionando una alta presión de inóculo. El mejoramiento genético aún no encuentra resultados exitosos en el control de la moniliasis, a pesar del esfuerzo de varios países en la búsqueda e identificación de genotipos resistentes.

En el Perú, son escasos los trabajos orientados a la obtención de genotipos resistentes; sin embargo, en los últimos años se hicieron trabajos de selección recurrente del cacao en las cuencas del Ucayali y Huallaga, estableciendo Bancos de Germoplasma donde la base genética de resistencia es incipiente. En Ecuador se reportan algunos genotipos tolerantes a la enfermedad. En este esfuerzo, uno de los factores limitantes de la búsqueda de plantas resistentes es el tiempo que demanda este proceso, por lo que se hace necesario buscar metodologías que ayuden a acelerar la obtención de genotipos resistentes.

Diversas técnicas han sido usadas para la evaluación de resistencia de genotipos de cacao, como las inoculaciones artificiales con suspensión de esporas aplicadas al fruto. La técnica de extraer savia del floema de la planta de cacao para evaluar el porcentaje de germinación de basidiosporas de *Moniliophthora perniciosa*, correlacionando ésta con la resistencia, es una posibilidad para acelerar el proceso de búsqueda de plantas resistentes (Bastos 1996, Bastos y Albuquerque 2000). Aún no se cuenta con un método rápido y eficiente para evaluar genotipos tolerantes o resistentes a la moniliasis; luego de algunas modificaciones, se probó la técnica de extracción de savia del floema y fluido embrionario de semillas de frutos jóvenes de cacao, partiendo de la premisa de que la germinación de esporas de *M. roreri* en estos fluidos podría asociarse a algún tipo de resistencia o tolerancia al patógeno (Ortiz et ál. 2004). La finalidad del presente trabajo consiste en explicar esta metodología.

¹ Instituto de Cultivos Tropicales. ICT-NAS/CICAD-OEA/USDA-ARS. Bda. del Shilcayo, Tarapoto, San Martín, Perú. e.arevalo.ict@terra.com.pe

Extracción y conservación de savia del floema

Para la extracción de savia de la planta de cacao luego de su selección, primeramente se desinfecta y flamea el área de perforación en el tronco o rama (Fig. 1).

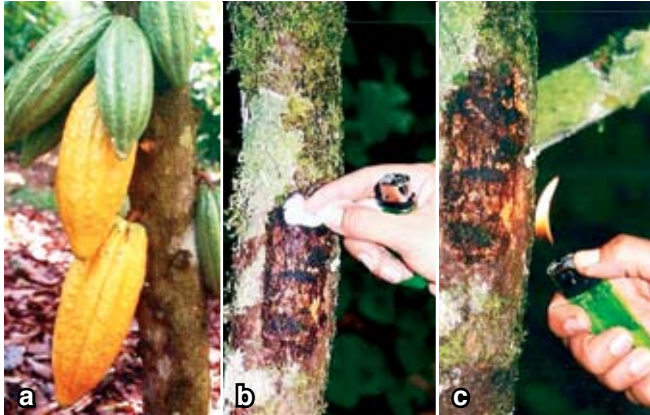


Figura 1. a) Planta de cacao seleccionada; b) y c) desinfección y flameado del área de perforación.

Con una navaja desinfectada se extrae la corteza superficial y con un berbiquí manual previamente desinfectado se hace una perforación de 5 x 1 cm aproximadamente. Luego, se coloca un tubo de ensayo de 30 ml al cual se acondiciona una manguera plástica resistente (15 x 0,6 cm), cuyo extremo libre se introduce en la cavidad del tronco, y se sella con plastilina (Fig. 2).

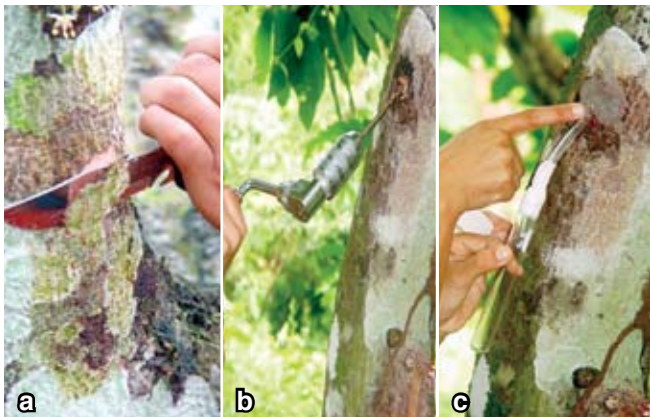


Figura 2. a) Eliminación de la corteza superficial; b) perforación del tronco con la ayuda de un berbiquí manual; c) introducción del tubo acondicionado con una manguera y su fijación en el árbol.

Finalmente, el tubo se rotula con el nombre de la muestra. Es importante señalar que todo el material debe esterilizarse. Después de 48 horas el tubo de ensayo se retira, la savia recolectada se filtra a través de filtros de jeringa Millipore 0,2 μm y se almacena a 4 °C.

Se recomienda realizar tres repeticiones por muestra.

Extracción y conservación del fluido embrionario de semillas de frutos

Para la extracción del fluido embrionario, se seleccionan y recolectan frutos de cacao de aproximadamente 2 meses de edad y de diferentes clones. Los frutos recolectados se llevan al laboratorio, se lavan y se parten longitudinalmente por la parte central.

El fluido embrionario, ubicado en los orificios de las semillas inmaduras de cacao, se extrae con la ayuda de una jeringa hipodérmica y posteriormente se filtra a través de filtros Millipore de 0,2 μm y se almacena a 4 °C. Es importante señalar que todo el material utilizado, al igual que en el caso anterior, debe ser correctamente esterilizado. Por cada clon se recolectan en promedio seis frutos (Fig. 3)

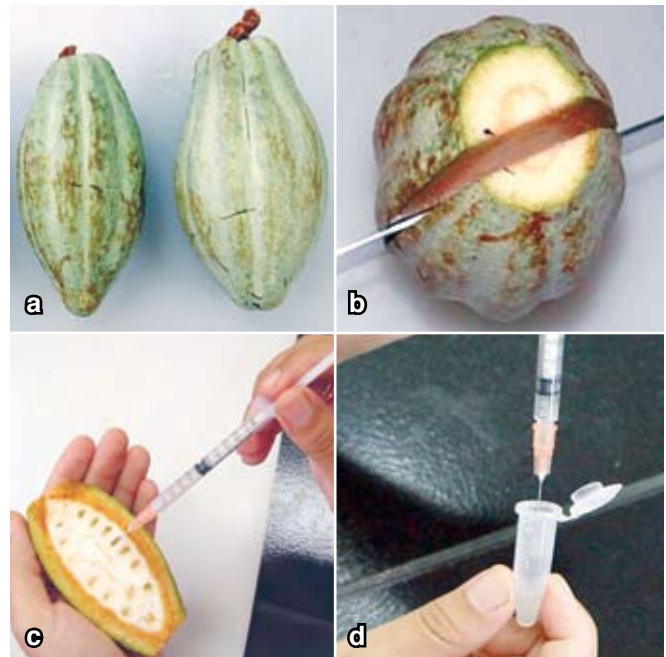


Figura 3. a) Frutos seleccionados de clones conocidos; b) corte central longitudinal del fruto; c) extracción del fluido embrionario con la ayuda de una jeringa; d) acondicionamiento del fluido extraído en un tubo Eppendorf para su posterior uso.

Cultivo y preparación de la suspensión de esporas de *M. royeri*

A partir de un aislamiento de *M. royeri* en medio V8MAA (200 ml jugo V-8, 20 g maltosa; 1 g asparagina; 17 g agar) de 15 días, se prepara una suspensión de esporas a la concentración de 1×10^7 conidias/ml a la que se agrega 0,01% de Tween[®] 20 (Fig. 4).

Pruebas de germinación de esporas

Para las pruebas de germinación de esporas de *M. royeri* en la savia y fluido embrionario obtenidos, se depositan

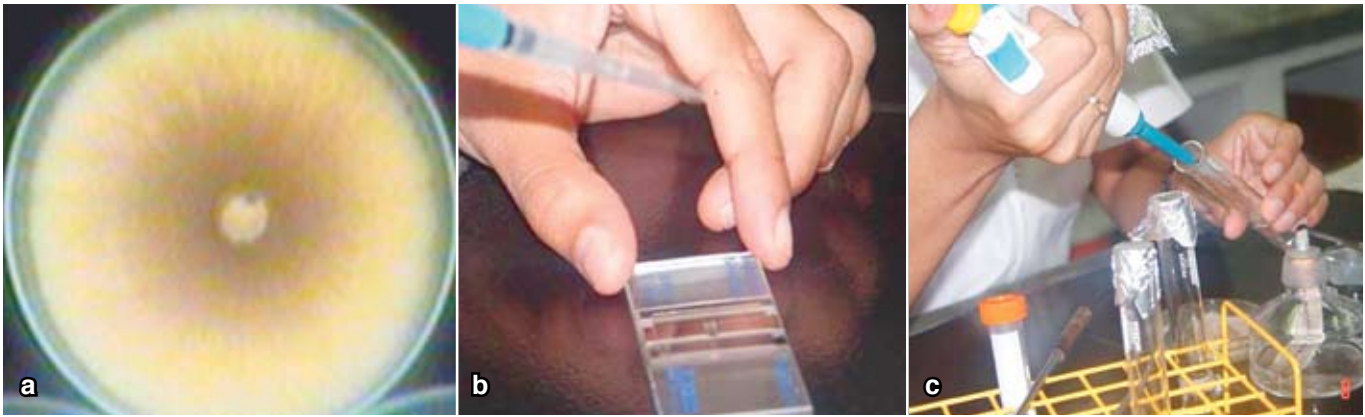


Figura 4. a) Aislamiento de *Moniliophthora roreri* de 15 días de edad; b) cuantificación de esporas; c) preparación de la suspensión de esporas.

gotas de 10 μ l de la suspensión de esporas del hongo en 4 puntos equidistantes de una placa de Petri con medio YEA (extracto de levadura-agar, pH 6,0), servido 24 horas antes de la prueba. Sobre cada una de las gotas de esporas se coloca, con la ayuda de una pipeta, la misma cantidad de savia o fluido embrionario. Las placas se incuban a temperatura ambiente (28 °C). El porcentaje de germinación de esporas se registra 24 horas después, colocando sobre cada punto prueba una gota de azul de lactofenol y sobre esta una laminilla, para visualizar y detener la actividad del hongo. La lectura de la germinación se realiza bajo un microscopio compuesto (Fig. 5).

Conclusiones

La selección de plantas de cacao resistentes a la moniliasis relacionando la germinación de esporas de *M. roreri* en la savia del floema o en los fluidos embrionarios de semillas jóvenes de estas plantas de cacao se presenta como una opción rápida que podría ayudar a seleccionar plantas en el campo. Cuando usamos el fluido embrionario existe una mayor relación, debido a que *M. roreri* afecta particularmente los frutos. Sin embargo, falta ajustar aún más el método para que pueda arrojar resultados enteramente confiables.

Literatura citada

- Arévalo, GE. 1992. Estudio de la Moniliasis del Cacao causada por *Moniliophthora roreri* (Cif & Par.) Evans et al. en la Selva Norte del Perú. Tesis Msc. Escuela de Graduados de la Universidad Nacional Agraria de la Molina. Lima, Perú. 93 p.
- Barros, O. 1977. Investigaciones sobre el hongo *Monilia roreri* Cif. & Par., causante de la pudrición acuosa de las mazorcas del cacao, sus daños y su control. El Cacaotero Colombiano 3:42-52.
- Bastos, CN. 1996. Utilização da seiva de *Theobroma cacao* para avaliação e indução de resistência a *Crinipellis pernicioso*. Fitopatología Brasileira, Brasília-DF, v. 21, p. 389.
- Bastos, CN; Albuquerque, PSB. 2000. Witches' broom disease assessment for resistance in cocoa clones using phloem sap. Fitopatología Brasileira 25:556-558.
- Evans, HC. 1981. Pod rot of cacao caused by *Moniliophthora* (*Monilia*) *roreri*. Phytopathological Paper No. 24, 44 p.
- Ortiz, BC; Arévalo, GE; Adriaola J; Zúñiga CL. 2004. Evaluación de la resistencia de genotipos de cacao a la moniliasis usando la savia del floema y frutos. Instituto de Cultivos Tropicales, NAS-ICT/CICAD-OEA. Resumen del XVIII Congreso Peruano de Fitopatología del 22 al 27 de Agosto del 2004- Huaraz. p. 68.
- Ram, A. 1989. Biology, Epidemiology of moniliasis (*Moniliophthora roreri*) of cacao. Thesis Ph D. Imperial College of Science and Technology. Ascot, England. 310 p.

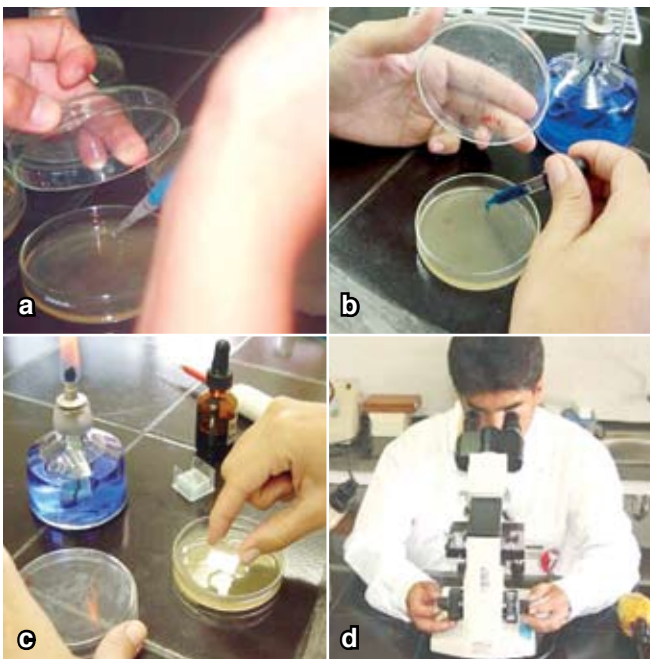


Figura 5. a) Colocación de una gota de suspensión de esporas de *Moniliophthora roreri* en medio YEA; b) gota de azul de lactofenol para detener la germinación; c) laminilla de vidrio para facilitar la observación; d) lectura del porcentaje de germinación bajo el microscopio.