

# TURRIALBA

REVISTA INTERAMERICANA DE CIENCIAS AGRICOLAS

VOLUMEN 39

TRIMESTRE OCTUBRE-DICIEMBRE 1989

NUMERO 4

CODEN: TURRAB 39(4)429-555

Crecimiento y esporulación de <i>Moniliophthora roreri</i> en diversas fuentes de nitrógeno y carbono. F. Herrera, J.J. Galindo, C. Ramírez	429
Budwood deterioration and germplasm transfer in <i>Theobroma cacao</i> . L.H. Purdy	435
El género <i>Theobroma</i> en el Territorio Federal Amazonas (Venezuela). I. Notas etnobotánicas y consideraciones agronómicas. P. Sánchez, K. Jaffé, M.C. Muller	440
El género <i>Theobroma</i> en el Territorio Federal Amazonas (Venezuela). II. Distribución geográfica. P. Sánchez, K. Jaffé	446
Pollination biology of <i>Theobroma</i> and <i>Herrania</i> (Sterculiaceae). IV. Major volatile constituents of steam-distilled floral oils as field attractants to cacao-associated midges (Diptera: Cecidomyiidae and Ceratopogonidae) in Costa Rica. A.M. Young	454
La primera aparición de la "Escoba de Bruja" en la principal área productora de cacao del Brasil. J.L. Pereira, A. Ram, J.M. Figueiredo, L.C. de Almeida	459
Metodología para evaluar la susceptibilidad a moniliasis en cultivares de cacao ( <i>Theobroma cacao</i> ). J.A. Sánchez, L.C. González	461
Thermal characteristics and composition of fats from <i>Theobroma</i> species. S. Chaiseri, D.H. Arruda, P.S. Dimick, G.A. Enríquez	468
Especies de <i>Phytophthora</i> aisladas de cacao en México y su distribución geográfica. R. Montes-Belmont, L. de los Santos	473
Multivariate analysis and the classification of agricultural systems in a major tropical area of cacao production (Barlovento, Venezuela). M. Barrios, L. Arias, J.J. San José	477
Conservación de las semillas del cacao ( <i>Theobroma cacao</i> ). J.E. Sánchez, A.A. Velázquez	483
Método de inoculación y evaluación de la resistencia a <i>Phytophthora palmivora</i> en frutos de cacao ( <i>Theobroma cacao</i> ). W. Phillips-Mora, J.J. Galindo	488
Meiosis in <i>Theobroma cacao</i> . L.J. Glicenstein, P.J. Fritz	497
Variation in the cultural characteristics of isolates of <i>Crinipellis perniciosa</i> in Trinidad. H.A. Laker	501
Quantitative changes in polyphenol oxidase and protein during <i>Theobroma cacao</i> seed development. M.K. Wong, P.S. Dimick	506
Un modelo econométrico del mercado internacional del cacao desde la perspectiva de los países centroamericanos. H. Robinson	511
<i>Theobroma cacao</i> DNA: Protocols for RFLP analysis. M.L. Mirazón, G. Gora-Maslik, L. McHenry, P.J. Fritz	519
Rescate <i>in vitro</i> de embriones provenientes de semillas aplanadas de cacao ( <i>Theobroma cacao</i> ). T. Palma, V.M. Villalobos	525
Relación entre la posición de la semilla en frutos de cacao ( <i>Theobroma cacao</i> ), su longitud y el diámetro y altura de las plántulas. W. Phillips-Mora	530
World cocoa marketing systems, problems and priorities: An importer's perspective. J.J. Scheu	534
Relação cacau/chocolate derivada dos produtos chocolatados exportados pelo Brasil, 1970-1985. F. Monteiro de Andrade, H. Estrela Barroco	542
Notas y comentarios	549
Reseña de libros	555



INSTITUTO INTERAMERICANO DE COOPERACION PARA LA AGRICULTURA

San José, Costa Rica

CR ISSN 0041 - 4360

## Crecimiento y Esporulación de *Moniliophthora roreri* en Diversas Fuentes de Nitrógeno y Carbono<sup>1</sup>

F. Herrera\*, J.J. Galindo\*\*, C. Ramírez\*\*

### ABSTRACT

The effect of different sources of N and C on vegetative growth and sporulation, *in vitro*, of *Moniliophthora roreri*, causal agent of moniliasis disease of cocoa was investigated. Nitrogen sources studied were asparagine, aspartic acid, proline, phenylalanine, urea, sodium nitrate and ammonium chloride at concentrations of 15, 75 and 150 mg N L<sup>-1</sup>; C sources were maltose, saccharose, lactose, glucose, galactose, xylose and arabinose at 0.2, 2 and 4 g C L<sup>-1</sup>. The fungus produced the maximum colony diameter and the highest sporulation area with urea at 75 and 150 mg N L<sup>-1</sup>, whereas the maximum spore density per cm<sup>2</sup> and per colony was observed with asparagine at 150 and 75 N L<sup>-1</sup> respectively. In regard to N, it was found that the colonies of the fungus *M. roreri* attained maximum vegetative growth and the greatest sporulation zone with urea at 75 mg and 150 mg of N L<sup>-1</sup>, while the greatest production of conidia per cm<sup>2</sup> of sporulation zone and per colony was observed with asparagine at 150 mg and 75 mg N L<sup>-1</sup> respectively. In regard to C, the greatest colony diameter and sporulation zone was found with maltose at 2 g C L<sup>-1</sup>. The number of conidia produced with the sources of C were considerably lower than the ones obtained with N sources.

### INTRODUCCION

**L**a moniliasis del cacao (*Theobroma cacao* L.) ataca los frutos y reduce seriamente la producción. El agente causal, *Moniliophthora roreri*, ha sido poco estudiado y un mejor conocimiento sobre su biología permitiría complementar los estudios patológico y epidemiológicos necesarios para reducir las pérdidas causadas por esta enfermedad.

No se conocen las condiciones apropiadas de crecimiento, *in vitro*, así como la composición de los substratos en el medio de cultivo ni la temperatura y luminosidad necesarios para una abundante esporulación. En los medios de cultivo se debe suprir nutrientes esenciales como fuente de carbono y nitrógeno en

### COMPENDIO

El efecto sobre el crecimiento y esporulación de colonias del hongo causante de la moniliasis del cacao, *Moniliophthora roreri* de diferentes fuentes de N y de C fue estudiado *in vitro*. Como fuente de N se usaron: asparagina, ácido aspártico, prolina, fenilalanina, urea, nitrato de sodio y cloruro de amonio en dosis de 15, 75 y 150 mg de N L<sup>-1</sup> así como fuente de C la maltosa, sacarosa, lactosa, glucosa, galactosa, xilosa y arabinosa en dosis de 0.2, 2 y 4 g de C L<sup>-1</sup>. Con respecto al N se encontró que las colonias del hongo *M. roreri* alcanzaron el máximo crecimiento vegetativo y la mayor área esporulada con urea a 75 y 150 mg de N L<sup>-1</sup>, mientras que la mayor producción de conidios por cm<sup>2</sup> de área esporulada y por colonia se observó con asparagina a 150 y 75 mg N L<sup>-1</sup> respectivamente. Con relación al C, se encontró el mayor diámetro de las colonias y de la zona esporulada con maltosa a 2 g C L<sup>-1</sup>. La producción de conidios con la fuente de C fue marcadamente inferior a la obtenida con las fuentes de N, posiblemente por el N limitante en el medio.

concentración y tipo adecuados para optimizar el crecimiento vegetativo y la esporulación. Dada la enorme diversidad de los hongos no es posible hacer generalizaciones sobre las condiciones de crecimiento (5).

El nitrógeno es requerido para sintetizar aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, vitaminas y aminoazúcares (3, 12). Los hongos pueden utilizar el nitrógeno en forma de nitratos, nitritos, amonio y aminoácidos u otras moléculas orgánicas como las bases púricas o pirimídicas, sus precursores o productos de su catabolismo. Aunque la mayoría de los hongos pueden utilizar estas fuentes con facilidad, algunos requieren fuentes específicas de N (3, 12). Así ningún patrón de utilización de N puede recomendarse para todos los hongos.

Phillips y Galindo (14), observaron diferencias en el crecimiento micelial de *M. roreri* con diversas fuentes de N. Simonson y Liberta (15) estudiaron la esporulación de *Sistotrema brinkmannii* en 20 fuentes de nitrógeno en concentraciones desde 0.005% hasta 0.25%, y observaron la mayor esporulación con ácido

1 Recibido para publicación el 26 de enero 1990.

\* Estación Experimental Fabio Baudrit, Universidad de Costa Rica, Barrio San José. Alajuela, Costa Rica

\*\* Programa de Mejoramiento de Cultivos Tropicales, CATIE, Turrialba 7170, Costa Rica

aspártico (0.025%), fenilalanina (0.1%), prolina (0.005%) y asparagina (0.01%). Moore-Landecker (12), informó que la asparagina permitía el mejor crecimiento de los hongos, seguida de la glicina, ácido glutánico y ácido aspártico.

La habilidad de los hongos de utilizar el carbono en sus diversas formas varía mucho según la fuente de carbono (12). La D-glucosa, D-fructosa y D-manosa son los monosacáridos que permiten el crecimiento del mayor número de hongos; de los disacáridos comunes son la maltosa, celobiosa, sacarosa y lactosa (12).

Phillips y Galindo (14) observaron mayor crecimiento lineal de colonias de *M. roreri* al aumentar la concentración de sacarosa en el medio de cultivo base a pH 6.5 e incubados a 28°C. En estudios similares Simonson y Liberta (15) observaron la mayor esporulación de *S. brinkmannii* con sacarosa al 0.05%, maltosa, xilosa, celobiosa al 0.1% y galactosa al 0.25%

El presente trabajo se realizó con el propósito de conocer el efecto de diferentes concentraciones y fuentes de C y N sobre el crecimiento y esporulación de *M. roreri*, para seleccionar aquellas más favorables con el fin de incluirlas en medios de cultivo de uso rutinario.

#### MAATERIALES Y METODOS

Para evaluar el efecto de varias fuentes de N y C sobre el crecimiento lineal y la esporulación de *M. roreri*, se utilizó un medio basal mineral, al cual se agregó la fuente y concentración en estudio. El medio basal mineral ha sido empleado por Ko y Hora (10) en estudios con *Rhizoctonia solani* (estadio imperfecto del basidiomicete *Thanatephorus cucumeris*), al cual se adicionó 0.1 g L<sup>-1</sup> de extracto de levadura (14), modificación empleada en previas investigaciones con *M. roreri*. Los componentes del medio basal mineral son en g L<sup>-1</sup>: K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1; MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 0.5, KCl 0.5 FeSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O (10 mg), agar 20, glucosa 5 (o las diferentes fuentes y concentraciones de carbono) y extracto de levadura 0.1. En una primera fase del experimento se evaluaron siete fuentes de N, a saber asparagina, ácido aspártico, prolina, fenilalanina, urea, nitrato de sodio y cloruro de amonio a 15, 75 y 150 mg N L<sup>-1</sup>. En un segundo experimento, se evaluaron las fuentes de C: maltosa, sacarosa, galactosa, glucosa, arabinosa, xilosa, lactosa a tres concentraciones 0.4, 2 y 4 g de C L<sup>-1</sup> además se incluyó un testigo sin C y otro con C de glucosa a 1.5 g L<sup>-1</sup>. El pH de los medios esteriles se corrigió a 6.5 con NaOH 0.1 N estéril. Se agregaron 25 ml de medio a platos de Petri. Cada plato fue inoculado al centro con un disco de 5 mm de diámetro obtenido de la periferia de colonias del hongo *M. roreri* (aislamiento 873) de 15 días de edad. Los cultivos se incubaron por 16 días

a 25°C y luz continua de 50 lumen m<sup>2</sup> en una incubadora modelo 805 (Precision Scientific Co, Chicago, Estados Unidos de América)

El diseño experimental fue de irrestricto al azar igualmente repetido (6 veces) con arreglo factorial 7 x 3 y un tratamiento adicional. Cada unidad experimental consistió de un plato Petri. Se evaluaron las siguientes variables: diámetro de las colonias y diámetro de la zona esporulada. En ambos casos se tomaron las lecturas cada 48 horas a partir del momento que apareció el crecimiento vegetativo y la zona esporulada. Para determinar el número de conidios por cm<sup>2</sup> se tomó un disco de 5 mm de diámetro del centro del radio de la zona esporulada de cada colonia y se depositó en un Beaker de 50 ml con 10 ml de solución Tween 80 al 0.001%, se agitó durante 5 min. e inmediatamente después se colocó una muestra en un hematocímetro para contar los conidios de acuerdo a la metodología descrita por French y Herbert (7). Además se determinó el número total de conidios por colonia. Otras observaciones cualitativas que se anotaron cada tres días fueron la forma, color y zonación de las colonias.

#### RESULTADOS

##### Efecto de las fuentes y de las dosis de nitrógeno

###### Diámetro de las colonias y la zona esporulada

Se observaron diferencias significativas en el diámetro de las colonias y de la zona esporulada según la fuente de N, dosis y tiempo de incubación, al igual que las respectivas interacciones. En todos los tratamientos el diámetro de las colonias aumentó con el tiempo de incubación, mientras que el diámetro de la zona esporulada siguió este comportamiento sólo en las fuentes de N, urea, asparagina, ácido aspártico y cloruro de amonio (Cuadro 1).

En los medios con urea, el mayor diámetro de las colonias se observó a partir de los siete días de incubación mientras que con la asparagina y ácido aspártico (75 mg N L<sup>-1</sup>) solo superaron el tratamiento sin N a partir de los 13 días de incubación. El desarrollo de la zona esporulada con urea, asparagina, ácido aspártico y cloruro de amonio fue mayor que en el tratamiento sin N, a partir del noveno día de incubación. Con el resto de las fuentes y dosis de N el diámetro de las colonias y su zona esporulada fue similar o menor al obtenido en las colonias que no recibieron nitrógeno (Cuadro 1).

A los 16 días de incubación el diámetro máximo de las colonias y la zona esporulada se obtuvo con urea, y los mismos aumentaron conforme se aumentó la dosis de N. Les siguieron en crecimiento las colonias que crecieron en medios con 75 mg de N L<sup>-1</sup> como asparagina o ácido aspártico (Cuadro 1).

Cuadro 1. Efecto de fuentes y dosis de N sobre el crecimiento y esporulación de *Moniliophthora roreri* en medio de cultivo sólido.

Fuente	N g L <sup>-1</sup>	Diámetro <sup>1</sup> (mm)		Producción total conidios X10 <sup>6</sup>
		Colonia	Zona esporulada	
Urea	15	72	52	76.8 d
	75	75	62	407.7 c
	150	78	67	1 002.4 b
Asparagina	15	61	29	72.4 d <sup>3</sup>
	75	66	54	1 299.0 a
	150	54	48	944.3 b
Ácido Aspártico	15	28	27	15.5 e
	75	67	52	231.2 d
	150	56	40	145.3 d <sup>3</sup>
Cloruro de amonio	15	61	33	2.7 e
	75	50	39	0.0 e
	150	55	44	9.0 e
Prolina	15	54	26	3.3 e
	75	52	23	13.2 e
	150	42	18	1.2 e
Nitrato de sodio	15	27	17	0.0 e
	75	43	22	0.6 e
	150	48	24	1.1 e
Fenilalanina	15	33	14	2.9 e
	75	25	13	8.2 e
	150	21	17	8.0 e
Medio básico <sup>2</sup>	0	49	17	0.9 e

1 Datos tomados a los 16 días de crecimiento. Promedio 6 rep.

2 g L<sup>-1</sup> (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1; MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.5, KCL 0.5, FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O (10 mg), agar 20, glucosa 5 y extracto de levadura 0.1)

3 Promedios con la misma letra no presentan diferencias significativas entre sí, según la prueba de Duncan (P: 0.05)

#### Producción de conidios

La mayor producción de conidios por cm<sup>2</sup> de área esporulada (54.5 millones) se obtuvo en las colonias que recibieron 150 mg L<sup>-1</sup> seguido de 75 mg L<sup>-1</sup> (34.6 millones) de N de asparagina. Cuando se aplicó 150 mg L<sup>-1</sup> de N como urea, en contraste se obtuvo para el mismo parámetro 26.7 millones y en las colonias crecidas en ausencia de N se obtuvo apenas 0.3 millones por cm<sup>2</sup> de área esporulada (Cuadro 1).

Al analizar la producción de conidios por colonia, el comportamiento de las diversas fuentes de N varió ligeramente, la mayor producción de conidios correspondió a la asparagina 75 mg N L<sup>-1</sup> con 1 299 millones, seguido de la asparagina y urea (150 mg N L<sup>-1</sup>) con 1 000 y 944 millones, respectivamente. La mayor

producción de conidios por colonia se obtuvo con la asparagina a 75 mg N L<sup>-1</sup> posiblemente debido a una mayor área esporulada (Cuadro 1).

#### Descripción y morfología de las colonias

En las colonias que recibieron asparagina, urea y ácido aspártico, la zona de esporulación se inició con formación de tejido estromático denso y blanco intenso que fue oscureciéndose hasta tornarse pardo claro, rodeada de una zona amarilla clara con cierta tonalidad rosada y un borde blanco poco denso.

Con fenilalanina, prolina, nitrato de sodio, cloruro de amonio y en el testigo sin N, el crecimiento micelial fue lento, la zona esporulada fue rala, de bordes indefinidos y color pardo amarillento

**Efecto de la fuente y dosis de carbono***Diámetro de las colonias y la zona esporulada*

El crecimiento de las colonias y la zona exporulada varió según la fuente de C, dosis y tiempo de incubación.

Se alcanzó el máximo crecimiento de las colonias a partir del sexto día de incubación en el medio con 2 g L<sup>-1</sup> de C de maltosa. En los tratamientos sin carbono el diámetro de las colonias fue similar al obtenido en el resto de los tratamientos, excepto lactosa, con la cual el hongo *M. roreri* no esporuló (Cuadro 2)

*Producción de conidios*

No se observaron diferencias significativas entre fuentes y dosis de C, aunque las colonias que recibieron maltosa mostraron una mayor tendencia a una mayor producción de conidios.

El inicio de la esporulación varió entre fuentes de C. Con glucosa se inició al sexto día, con arabinosa, galactosa, maltosa, sacarosa y xilosa a los 8-9 días y con lactosa no hubo esporulación.

*Morfología colonial*

En general al inicio el micelio fue hialino y ralo, posteriormente en la parte central se definió el tejido

Cuadro 2. Efecto de fuentes y dosis de C sobre el crecimiento y esporulación de *Moniliophthora roreri* en medio de cultivo sólido.

Fuente	C g L <sup>-1</sup>	Diámetro <sup>1</sup> (mm)		Producción total conidios X 10 <sup>4</sup>
		Colonias	Zona esporulada	
Maltosa	0.4	54	28	9.5 a <sup>3</sup>
	2.0	74	31	1.6 a
	4.0	60	23	6.3 b
Sucrosa	0.4	42	23	6.3 b
	2.0	49	19	4.3 bc
	4.0	49	23	6.3 b
Galactosa	0.4	61	15	2.7 cd
	2.0	40	18	3.9 bc
	4.0	37	16	3.1 cd
Glucosa	0.4	47	18	3.9 bc
	2.0	36	19	4.4 bc
	4.0	28	15	2.7 cd
Arabinosa	0.4	38	19	4.3 bc
	2.0	29	18	3.9 bc
	4.0	34	14	2.3 cde
Xilosa	0.4	34	15	2.7 cd
	2.0	31	13	2.0 cde
	4.0	19	10	1.2 de
Lactosa	0.4	19	0	0.0 e
	2.0	16	0	0.0 e
	4.0	15	0	0.0 e
Medio básico <sup>2</sup>	-	-	17	3.4 cd

1 Datos tomados a los 16 días de crecimiento. Promedio 6 rep.

2 g L<sup>-1</sup> (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1; MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.5 KCL 0.5, FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O (10 mg), agar 20, glucosa 5 y extracto de levadura 0.1).

3 Promedios con la misma letra no presentan diferencias significativas entre sí, según la prueba de Duncan (P: 0.05).

estromático de aspecto denso y de color blanco. Al transcurrir la incubación se tornó pardo claro y luego se oscureció conforme se producían y maduraban los conidios. En las colonias que recibieron lactosa, el micelio no presentó el crecimiento circular típico, sino que creció ramificadamente sin llegar a unirse entre sí.

#### DISCUSION

Los resultados muestran que *M. roreri* es capaz de utilizar diversas fuentes de C y N en medios de cultivo de manera diferencial al igual que otros hongos (3, 12). En términos generales la demanda de N depende en gran medida de la fuente de C (D-glucosa) utilizable para los hongos (3). En los medios se agregó poco ( $0.1 \text{ g L}^{-1}$ ) extracto de levadura, como fuente de aminoácidos y de vitaminas (1). Este complementó el N, C y vitaminas en los medios en los cuales se evaluaron las diversas fuentes de N, pero fue la única fuente de N al probar las fuentes de C. El extracto de levadura tiene 43% de N de aminoácidos (1), así en este último caso concentración de N fue menor pero suficiente para diferencias del patrón de utilización de los carbohidratos.

El crecimiento de los hongos se debe evaluar preferiblemente mediante el peso seco y el contenido de N o de proteínas (2, 4). Sin embargo se acepta, por reproducible, rápido y no destructivo, la medición del crecimiento radial de los hongos en medios sólidos (2, 3, 4). En realidad el crecimiento de las hifas es exponencial y el crecimiento lineal de las colonias se debe a la ramificación de las mismas.

En cuanto a la utilización de las fuentes de N es importante tomar en cuenta la relación C/N puesto que la misma puede influir en el patrón de esporulación (13). Esta varió, sin tomar en cuenta el aporte de N del extracto de levadura de 333/1 a 33 3/1. Generalmente se estima que las condiciones que favorecen el crecimiento vegetativo no son las mismas que favorecen el crecimiento reproductivo (5, 9). De esta manera el aumento de la esporulación, que se dio conforme se aumentó la concentración de fuentes de N que se utilizaron con eficiencia (asparagina), no parece deberse a un deterioro del status nutricional del medio, sino más bien a la posible producción de mortógenos en el micelio viejo de la colonia tal como se ha reportado para otros hongos (11). La mayoría de los aminoácidos son absorbidos como tales; una vez absorbidos son metabolizados para formar otros aminoácidos por transaminación. A su vez los mismos pueden servir como fuente de carbono al acoplarse los ácidos orgánicos derivados al ciclo de Krebs (3).

La concentración de un substrato indujo un comportamiento diferente de *M. roreri*. Por ejemplo la

urea como fuente de N, favoreció más el crecimiento vegetativo que la formación de esporas, lo cual también se ha observado con otros hongos (12).

El mayor crecimiento vegetativo con esta fuente puede deberse a su rápida hidrólisis por la enzima ureasa, de amplia distribución en los hongos, a amonio, fórmula de muy rápida utilización por los hongos (12). Esto fue en parte confirmado por los tratamientos con cloruro de amonio en los que el hongo creció de manera semejante, aunque en menor cuantía, no así cuando se agregó al medio de cultivo nitrato de sodio. Sin embargo no es fácilmente explicable la diferencia entre la urea y el cloruro de amonio, al menos que el  $\text{NH}_4^+$  haya bajado el pH a niveles más bajos que la urea (3). En el presente trabajo no se cuenta con evidencia experimental sobre el pH final resultante de la utilización de este y ninguno de los sustratos, lo cual limita la interpretación de los resultados. El nitrato para ser asimilado requiere de la acción de la enzima nitrato reductasa (asimilatoria) (3) y además es un proceso que consume energía, lo cual podría explicar el menor crecimiento del hongo. Esta característica respalda la posibilidad que el mismo pertenezca a los Basidiomicetos, según lo propone Evans (6).

La asparagina favoreció el crecimiento vegetativo y la producción de conidios que confirma los resultados de Phillips y Galindo (14), quienes observaron un mayor crecimiento lineal de *M. roreri* al aumentar la dosis de cloruro de amonio y asparagina. Esta última, junto con el ácido aspártico se mencionan como excelentes fuentes de N para los hongos (3, 12). Simonson y Liberta (15) también encontraron alta producción de esporas en el Basidiomicete *S. brinkmannii* al usar asparagina al 0.01% como fuente de N.

Con respecto al C, los resultados sugieren que el hongo respondió más a la fuente que a la dosis de C, lo que coincide con observaciones realizadas en otros hongos (8, 12). Tanto el crecimiento vegetativo como la esporulación fueron menores en comparación a los obtenidos con las diversas fuentes de N posiblemente porque el crecimiento se vio limitado por el N y no por el C, pues la cantidad de N en el medio basal, como extracto de levadura, fue relativamente baja. Además posiblemente la diversidad de los aminoácidos y otras moléculas orgánicas disponibles en el extracto podría no ser de tan rápida asimilación como una fuente única, ya sea un aminoácido o el cloruro de amonio. Esta explicación es atractiva pues las relaciones C/N teóricas en este medio fueron similares a la relación C/N en los medios donde se evaluaron las fuentes de N (a las menores dosis) y con glucosa como fuente de C, donde hubo una esporulación mayor. Sin embargo fue posible establecer la utilización diferencial de las diferentes fuentes de C por el hongo. Por ejemplo, la maltosa fue la fuente de carbono que

permitió el mayor crecimiento micelial, área esporulada y tendencia a una mayor producción de conidios, que coinciden con las observaciones de Phillips y Galindo (14); por otro lado la lactosa no parece ser utilizada por el hongo.

El menor crecimiento vegetativo de *M. roreri* en presencia de glucosa con respecto a la maltosa y la sacarosa es un resultado no esperado, pues la glucosa es de más fácil asimilación ya que su utilización no requiere de la acción de enzimas hidrolíticas.

La esporulación fue mejor cuando se probaron las fuentes de N que las de C, pues en el primer caso existía una buena fuente de C, glucosa en el medio base. En el segundo caso el nutrimento base fue el extracto de levadura en concentración limitada y los cultivos posiblemente se vieron limitados por el N y C en el caso que la fuente de C no se utilizó. Esto no impidió

sin embargo identificar a la maltosa como una fuente óptima de C. Sin embargo la inducción de morfógenos con esta fuente de N pudo haberse afectada puesto que el crecimiento vegetativo del hongo, en las fuentes de C utilizadas fue denso.

Aunque en este estudio el máximo crecimiento se dió a los 16 días de incubación, fue posible observar diferencias consistentes a partir de los 11-13 días por lo que se podría reducir el mismo a unos días para efectos de incubación rutinaria del hongo.

En conclusión, el hongo *M. roreri* aprovechó diferentes fuentes y concentraciones de carbono y nitrógeno de manera diferencial. La urea y la asparagina a 150 y 75 mg N L<sup>-1</sup> como fuente de nitrógeno y la maltosa como fuente de carbono a 2 g de C L<sup>-1</sup> fueron los que más estimularon el crecimiento y esporulación de *M. roreri*.

#### LITERATURA CITADA

1. BRIDSON, E.Y.; BRECKER, A. 1970 Design and formulation of microbial culture media. In Methods in Microbiology, Ed. by J.R. Norris, D.W. Ribbons. New York, Academic Press, v. 3A, p. 229-295.
2. CALAM, C.I. 1969 The evaluation of mycelial growth. In Methods in Microbiology. Ed. by J.R. Norris, D.W. Ribbons. New York, Academic Press v. 1, p. 567-591.
3. COCHRANE, V.W. 1958 Physiology of fungi. New York, Wiley. 524 p.
4. CODNER, R.C. 1969. Solid and solidified growth media in microbiology. In Methods in Microbiology. Ed. by J.R. Norris, D.W. Ribbons. New York, Academic Press. p. 427-454.
5. DAHLBERG, K.R.; VAN ETIEN, J.I. 1982 Physiology and biochemistry of fungal sporulation. Annual Review of Phytopathology 20:281-301.
6. EVANS, C.H. 1986. A reassessment of *Moniliophthora roreri* (*Monilia*) pod rot of cacao. Cocoa Grower's Bulletin (England) 37:34-43.
7. FRENCH, R.E.; HERBERT, I.T. 1982 Métodos de investigación fitopatológica. San José, C.R., IICA. 289 p.
8. HAWKER, L.E. 1968. Environmental influences on reproduction. In The fungi. Ed. by G.C. Ainsworth, A.S. Sussman. New York, Academic Press. p. 435-459.
9. JAMES, S.W.; MCLAGHLIN, D.J.M. 1988. The influence of carbohydrate source and concentration and light on fruit body development in *Clavicipitaceae*. Mycologia 80:89-98.
10. KO, W.; HORA, F.K. 1972. A selective medium for the quantitative determination of *Rhizoctonia solani* in soil. Phytopathology 61:707-710.
11. MCLEAN, K.M.; PROSSER, J.I. 1987. Development of vegetative mycelium during colony growth of *Neurospora crassa*. Transactions of the British Mycological Society 88:489-495.
12. MOORE-LANDECKER, E. 1972 Fundamentals of the fungi. Englewood Cliffs, N.J., Prentice Hall. 428 p.
13. ORRISEJOFOR, J.J. 1986 Carbon and nitrogen nutrition in relation to growth and sporulation of *Fusarium oxysporum* f. sp. *elaioides*. Transactions of the British Mycological Society (England) 87:519-524.
14. PHILLIPS, W.; GALINDO, J.J. 1985 Effect of light, temperature, carbon and nutrition sources on growth and sporulation of *Monilia roreri* Cif y Par. Phytopathology 75:1 178.
15. SIMONSON, G.L; LIBERTA, G.A. 1973 Effects of carbon and nitrogen sources on sporulation of *Sistotrotrema brinkmannii*. Mycologia 65:972-974.

# Budwood Deterioration and Germplasm Transfer in *Theobroma cacao*<sup>1</sup>

L.H. Purdy\*

## ABSTRACT

Propagation failures at the cacao quarantine facility in Miami prompted study to determine the causes. Fungi were isolates from budsticks from CATIE, Turrialba, Costa Rica. Various treatments of budsticks were applied at CATIE and Miami, and buds were placed in rootstocks in Miami, CATIE, and Gainesville. A low percentage of buds survived in Miami and Gainesville for two months, and only 22% survived at CATIE. The five most common fungi associated with cacao budsticks were: *Botryodiplodia*, *Theobromae*, *Fusarium decemcellulare*, *Fusarium oxysporum*, *Pestalotiopsis* spp., and *Phomopsis* spp. Certain fungi were found to be residents of the woody vascular cylinder of apparently healthy cacao. Fungi within and on cacao budsticks become active as a result of moisture loss by budsticks following their removal from donor trees. In as few as two days, certain fungi invaded the woody vascular cylinder. Moisture loss from budsticks can be reduced or delayed by applying molten paraffin to the ends of budsticks and to the petiole stubs if they remain attached. Petioles should be cut to remove leaves 10-15 days before removing budsticks from donor trees. If patch or chip buds cannot be used, the side veneer graft resulted in high survival of germplasm.

## INTRODUCTION

Germplasm of *Theobroma cacao* L. collected in its center of origin, the Amazon Basin, is moved to quarantine or to germplasm collections where it is propagated by budding or grafting for conservation and eventual use for cacao improvement. Clonal accessions are transferred by air shipment to quarantine facilities as budsticks, 20-30 cm, that are hardened stem pieces with stem diameters of 0.5-1.0 cm with dormant buds in leaf axils [Plate 1, (4)].

Guidelines for the safe movement of cacao germplasm have been published (2). Following arrival at the destination, propagation of the germplasm is by grafting or budding to a rootstock plant. Thus, propagation of cacao germplasm from its collection in the wild, entry into quarantine, establishment in germplasm collections, and its increase for various

Las fallas en las labores de propagación, ocurridas en la estación de cuarentena de cacao localizada en Miami, Florida, indujeron a estudiar las causas de tales fallas. Para ello, se aislaron algunos hongos obtenidos de estacas procedentes del CATIE, Turrialba, Costa Rica. Se establecieron varios tratamientos experimentales tanto en CATIE como en Miami; se colocaron yemas en portainjertos en CATIE, Miami y Gainesville, Florida. Un bajo porcentaje de yemas sobrevivieron en Miami y en Gainesville y solamente el 22% en CATIE. Los cinco hongos más frecuentemente asociados con yemas injertadas fueron: *Botryodiplodia*, *Theobromae*, *Fusarium decemcellulare*, *Fusarium oxysporum*, *Pestalotiopsis* sp., y *Phomopsis* sp. Algunos hongos estaban localizados en el cilindro vascular leñoso y en el portainjerto se reactivan como resultado de la pérdida de humedad de las estacas portainjertos, al ser separadas de los árboles donantes. En períodos tan cortos como dos días, algunos hongos invadieron el cilindro vascular leñoso. La pérdida de humedad en el portainjerto puede ser reducida o demorada con la aplicación de parafina derretida a los cortes del portainjerto y a las porciones de los pecíolos que pudieran haber quedado adheridos; estos debieran ser podados para remover las hojas, 10 ó 15 días antes de cortar las estacas portainjertos de los árboles donantes. Si no se pueden utilizar yemas en injertos de escudete o bien en injertos de aproximación, se comprobó que el injerto de cuña lateral fue eficaz en preservar el germoplasma deseable de cacao.

purposes is dependent on vegetative propagation by budding or grafting. Occasionally clones of cacao have been moved to quarantine as rooted plants (1), but this practice is hazardous from the standpoint of the movement of pathogens, and is discouraged for transfer of germplasm (2).

Low percentages (5%) of survival of cacao clones from Ecuador, after attempted propagation in England, caused serious concern (1). Likewise, germplasm received at the cacao quarantine facility of the United States Department of Agriculture, Subtropical Horticulture Research Station, Miami, Florida, also had low rates of survival (personal communication from P.K. Soderholm). Budsticks received appeared healthy, and were grafted onto rootstock plants of various age and in various growth stages. Connection of grafts with rootstocks appeared to take place, but often the entire graft died and fungal growth developed on its surface, indicating that fungi were associated in some way with the failures of propagation. According to Wellman (9), there are more than 100 pathogens associated with diseases or disorders of cacao, but deterioration of cacao budwood was not included. Purdy and Soderholm (3) reported that five fungal species were associated with budwood that failed to become established on rootstock plants. The fungi they mentioned were also among the more than

<sup>1</sup> Received for publication 15 November 1989

This research was supported in part by the American Cocoa Research Institute, 7900 Westpark Drive, Suite A-320, McLean, Virginia, 22101, USA

I acknowledge with gratitude the cooperation of personnel at CATIE, Turrialba, Costa Rica, and the U.S. Department of Agriculture, Subtropical Horticulture Research Station, Miami, Florida.

\* Plant Pathology Department, University of Florida, Gainesville, Florida, 32611, USA.

80 fungi associated with cacao that exhibited die-back symptoms (8). Turner described the many stresses to which cacao is subjected that are in some way related to die-back, and concluded that it is not so much the resistance of the trees to fungal infection but resistance to those conditions under which they (the trees) become susceptible and predisposed to attack by fungi. Cacao die-back is a stress-related syndrome resulting from various stresses, and with which many different fungi are associated.

Cacao germplasm is transferred a) from natural habitats to a collection site, b) from germplasm collections to quarantine, and c) from quarantine to various sites for reproduction. Local transfer of clonal plant materials for vegetative reproduction also falls under the broad definition of germplasm transfer, but most often the removal from donor trees to grafting or budding to rootstocks is minimal, usually the same day (4).

Soria (7) cited the short viability of budwood as the "greatest difficulty" associated with germplasm collection, because budwood may die if too much time elapses between its collection and application to a rootstock plant. When budsticks are removed from donor trees they immediately begin to lose moisture from the exposed cut surfaces. This is compounded by the removal of leaves resulting in moisture loss through the petiole stubs that are attached to the budstick. If the cut ends of budsticks are dipped into molten paraffin, moisture loss may be slowed. Nevertheless, when budsticks are removed from the donor trees they are subjected to the most serious moisture stress possible, yet the budwood is expected to survive.

Budwood deterioration, like cacao die-back, appears to be a stress-related syndrome, and stresses to which budwood are subjected seem to predispose it to fungi that destroy its viability. Purdy and Soderholm (3) demonstrated that species in five genera of fungi were associated with dying or dead budwood. In research reported here, additional fungi have been associated with cacao budwood, and procedures to prolong budwood viability and increase propagation success are presented.

#### MATERIALS AND METHODS

Experiments to identify the cause of budwood deterioration included treatments applied at CATIE, Turrialba, Costa Rica, and at the U.S. Department of Agriculture, Subtropical Horticulture Research Station, Miami, Florida. For experiment 1, treatments were: a) Benlate + Dithane M-45 (1:10) applied to budsticks as an undiluted dust; b) Kocide 101 applied undiluted as a dust; c) an antisenescent chemical (aminoxy acetic acid, 0.01 M and 0.001 M)

in which budsticks were soaked for 30 minutes. Non-treated UF 29 was the control.

For experiment 2, Benlate + Dithane M-45 was applied as in experiment 1. Bayleton was applied to budsticks as a dust. Budsticks were soaked for 30 minutes in an antisenescent growth-promoting mixture consisting of 50 mg indole butyric acid; 25 mg 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone; 10 mg streptomycin sulfate; 50 g sucrose; 50 mg spermine, dissolved in one liter water. An additional treatment included in experiment 2 was girdling of budwood five and 15 days before its removal from the donor tree. Budwood of SCA 6, SCA 12, and UF 29 were included in experiment 2 as controls.

Hardened budsticks of UF 29 were cut from trees in the field at CATIE, leaf petioles were cut about 0.5 cm from the stem, and treatments were applied in the field immediately, and after one hour in the laboratory. One set of budwood was carried to Miami as cabin baggage and the treatments were applied at the cacao quarantine facility in Miami. In addition, a duplicate set of untreated budwood was mailed to Miami, and treatments were applied after its arrival. Ends of budsticks were dipped in a mixture of molten paraffin and bee's wax, wrapped in damp newspaper, and placed in a plastic bag for transport to Miami. Budwood that remained at CATIE was treated, wrapped in newspaper, and placed on the laboratory bench for seven days. Propagation of treated budwood at CATIE was by patch budding and grafting, whereas at Miami only a wide-angle approach graft was used.

Isolation of fungi associated with the budsticks was done a) in the field immediately after treatments were applied, b) in the laboratory about one hour after treatment, c) in Miami, and d) in Gainesville. Small pieces of budsticks were surface-sterilized by immersion in 70% ethyl alcohol for two minutes, followed immediately by immersion in 5% sodium hypochlorite for 10 minutes, and then the treated stem pieces were allowed to dry under sterile paper towels. One end of treated budsticks about 1.2 mm thick was removed, and then cross-sections (0.5 mm thick) of stems were cut and placed on 1.5% water agar slants in screw-top vials that were transported to Gainesville for identification of the fungi. Similar isolations were made in Miami.

The alcohol treatment was eliminated for subsequent experiments and budsticks were surface-sterilized by immersion in 10% chlorox for 10 minutes, and then rinsed twice in sterile deionized water. To determine if fungi reside in the woody vascular cylinder of cacao, budsticks were immersed in 10% chlorox for 10 minutes after which the soft cortical tissues were removed; the remaining woody vascular cylinder was immersed in 10% chlorox for

10 minutes, and then rinsed twice in sterile deionized water. One end of surface-sterilized budsticks, or woody vascular cylinders, was removed and thin cross-sections were then cut and placed on the isolation medium. Three or more budsticks of each treatment, or clone, were sampled by placing three to four cross-sections on the isolation medium. There were five replicates for each budstick.

Isolation media were 1.5% water agar, and a selective medium of potato dextrose agar, streptomycin sulfate, tergitol NP-10, and chlorotetracycline (PDASTC). Fungi that grew from the tissue pieces were transferred to PDA for later identification.

The bark of budsticks several days old adhered tightly to the wood and patch buds could not be used in Miami, so the angled approach graft was used in experiments 1 and 2. The advantage of a side veneer graft (10) over the angled approach graft was demonstrated and the technique was adopted. Initially, side veneer grafts were wrapped in clear plastic grafting tape, but emerging buds had difficulty in growing if the tape was not removed from directly over the bud. This problem was solved by using budding rubbers to wrap the grafted stem piece, making certain that the bud was not covered by the budding rubber. The rubber-wrapped graft was then covered with tightly-wound parafilm that deteriorated in about two to three weeks so that the bud could emerge and begin growth. The budding rubber was removed later.

Propagation attempts in Miami with budsticks with origins in the vicinity of Belem, Brazil, Apartado, Colombia, and Port of Spain, Trinidad resulted in only a 10% success rate. Isolations as described were made from these budsticks and from budsticks of nine clones in Gainesville from the cacao germplasm collection at Mayaguez, Puerto Rico.

To determine if certain fungi isolated from budwood could invade the vascular cylinder of cacao, sections of cacao stems from trees growing in a greenhouse in Gainesville, with the leaf petiole cut about 0.25 to 0.5 cm from the stem, were inoculated with five fungi isolated from cacao budwood. The cacao stem pieces were placed in paper troughs and covered with suspensions of spores and mycelium of *Botryodiplodia theobromae*, *Fusarium decemcellulare*, *Fusarium oxysporum*, *Pestalotiopsis* spp., and *Phomopsis* spp. that had grown on PDA. After 20 minutes, the stem pieces were removed from the suspensions and wrapped immediately in moist sterile paper towels, placed in a plastic bag, and kept on the laboratory bench at 22-25°C. Isolation was after 0, 2, 4, 8, and 16 days on PDASTC from non-surface-sterilized stems, surface-sterilized stems with the cortex in place, and twice-sterilized stems with the cortex removed.

## RESULTS

All budwood in experiment 1 grafted in Miami failed to survive, whereas 22% survived in Turrialba. Also, 73% of patch buds from budwood in experiment 1 survived in Turrialba. Patch buds were not used in Miami. There seemed to be greater survival with the application of Benlate + Dithane M-45 and girdling five or 15 days before removal of budwood from the tree. But only 12% of grafts in Miami and 10% of those in Gainesville survived for only two months. No treatment was any better than any other with respect to survival of budwood grafted in Miami. Undiluted Kocide 101 applied to budsticks as a dust was phytotoxic.

From the dead and dying grafts in experiment 1 and 2, fungi in 15 genera were isolated, and in descending order of frequency of isolation they were:

<i>Pestalotiopsis</i>	<i>Colletotrichum</i>
<i>Phomopsis</i>	<i>Torula</i>
<i>Fusarium</i>	<i>Gleocladium</i>
<i>Botryodiplodia</i>	<i>Gleosporium</i>
<i>Paecilomyces</i>	<i>Stilbum</i>
<i>Verticillium</i>	<i>Stachybotrys</i>
<i>Anthromyces</i>	<i>Sphaeropsis</i>
<i>Trichoderma</i>	

*Botryodiplodia* isolates fit the description of *B. theobromae*, and several isolates of *Fusarium* were identified to species: *F. decemcellulare*, *F. graminearum*, *F. moniliformae*, *F. oxysporum*, *F. subglutinans*, and *F. semitectorum*.

A total of 60 budwood pieces of four clones received in Miami from the vicinity of Belem, Brazil were sampled for fungi. The most frequently isolated fungus was *Botryodiplodia theobromae* from 31 budsticks pieces, followed by *Fusarium* spp. from 21, *Diplodia* spp. from nine, *Phomopsis* spp. from three, and *Aspergillus* spp., *Pestalotiopsis* spp., and *Trichoderma* spp. each from one budstick. All budsticks were very dry, and were rotted badly on the ends and nodes. Nodal rot presumably developed through the basal portions of the petioles that were attached to the budwood when it was packed for shipment.

Eight TSH clones from Trinidad to Miami failed to survive following grafting to rootstock plants. Almost pure cultures of *Botryodiplodia theobromae* developed from "wood only," chlorox, and nonsterilized treatments of four clones (TSB 654, TSH 728, TSH 1082, and TSH 1188). The other four clones developed no growth from the "wood only" treatment, but several unidentified fungi developed from the other treatments.

*Botryodiplodia theobromae* was isolated 32 times, and *Fusarium* spp. were isolated seven times from the

woody vascular cylinder from budsticks of five clones collected at the Tulenapa Experiment Station of the Instituto Colombiano Agropecuario near Apartado, Colombia. Other fungi isolated from cross sections that retained cortical tissues were *Gleosporium* spp., *Virgrospora* spp., and *Trichoderma* spp.

Budsticks of nine cacao clones in the Cacao Germplasm Collection in Mayaguez, Puerto Rico were transported to Gainesville where species in 12 genera of fungi were isolated from nonsterilized, surface-sterilized with cortex, and surface-sterilized after the cortex was removed. *Pestalotiopsis* spp. was isolated 11 times from woody vascular cylinders, 33 times from the surface-sterilized treatment with the cortex in place, and only nine times from nonsterilized budwood. In contrast to the fungal residents of budwood from other locations, *Botryodiplodia theobromae* was isolated two times each from woody vascular cylinders and the surface-sterilized treatments, and once from nonsterilized budwood. Fungal genera in descending frequencies of isolation were: *Pestalotiopsis*, *Trichoderma*, *Fusarium*, *Rhizopus*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Cephalosporium*, *Botryodiplodia*, *Phoma*, *Phomopsis*, and *Nigrospora*.

Four of the five fungi applied to stem pieces of greenhouse-grown cacao trees invaded the woody vascular cylinder in only four days after inoculation. These fungi, *B. theobromae*, *F. Decemcellulare*, *F. oxysporum*, and *Phomopsis* spp., were also isolated after eight and 16 days. However, it is most interesting that *Pestalotiopsis* spp. did not invade the vascular cylinder even after 14 days, but as with the other four fungi, it was isolated from surface sterilized budwood with the cortex in place after only two days. There were no fungi isolated from the woody vascular cylinder of the controls, but nine common airborne fungi were isolated from the surface-sterilized controls with the cortex in place, and from the non-sterilized treatment.

In a comparison of propagation methods, almost 100% successful propagation resulted from patch buds, chip buds, approach grafts, and side veneer grafts, when the budwood was removed from the donor tree and immediately applied to a flushing rootstock plant. Budwood used in the comparison was green, green/brown, and brown, with brown being hardened portions of stems. In addition, buds of grafts wrapped with plastic grafting tape, or budding rubbers and covered with parafilm, had equally high rates of survival.

#### DISCUSSION

The low survival rate of cacao germplasm following attempts to propagate it at shipment destinations has resulted in considerable concern about germplasm

conservation and utilization. There may be several reasons why propagation failed, but it was logical to consider fungi as causal agents because of their association with dead or dying buds and grafts. There were many fungi associated with propagation failures. Several fungi have been isolated from the woody vascular cylinders of cacao budsticks, and seemingly they are residents in or on apparently healthy budsticks selected for germplasm transfer. Two hypotheses are proposed: a) that there are fungal residents of healthy cacao stems, and b) that if these fungi are not residents of healthy cacao stems, then they have the capability to invade the wood of cacao stems in as few as two days after the stem (budstick) is removed from the tree.

Fungicides applied to budsticks after their removal from trees failed to increase survival. Similar observations were made by Allen (1) regarding applications of fungicides to budsticks and, in addition, he stated that fungicides may even reduce budwood viability. There may be benefit from girdling of budsticks before removing them from trees, but results presented here are inconclusive.

Fungi isolated from cacao stems or cacao budsticks are saprophytes, or weak parasites, that flourish on almost any substrate. In association with a growing plant, they may be surface contaminants that fail to induce a response from the plant on which they reside. Also, they may invade a plant through various openings, but again they may fail to induce a response from the invaded plant. However, the plant with these resident fungi becomes symptomatic rapidly when the fungi are stimulated into rapid growth by some change in the host plant, such as the removal of the budstick from the donor tree.

Time and location may influence the predominating fungal species associated with cacao. For example, almost pure cultures of *Botryodiplodia theobromae* were isolated from the woody vascular cylinder of cacao from Trinidad, and this species was almost common in budwood from Belem and Apartado, whereas *Pestalotiopsis* spp. was most common in budwood from Costa Rica.

The most serious water stress begins with the cutting of budsticks from the tree, and is compounded further by the cutting of the leaf petioles somewhere near the basal pulvinus. These cut surfaces lose moisture rapidly and probably never heal to form a barrier to moisture loss. It is a recommended practice that the cut ends of budsticks be dipped into molten paraffin to retard moisture loss (2). However, there are no procedures used to retard or reduce loss of moisture through cut petioles. Moisture loss, by whatever means it occurs, obviously affects the physiological status of the budstick, either through a direct influence on fungi present in or on budsticks,

or by an affect on the budwood *per se*. The resulting interaction between the saprophytic fungi that are facultative parasites and the cacao budwood results in loss of budwood viability. This pathological condition occurs if a budstick is stressed by loss of moisture, but the condition is avoided if the moisture stress is insufficient to trigger an increased activity by the resident fungi. This latter situation apparently occurs if buds or grafts are placed in rootstocks during the same day that budsticks are removed from donor trees (4).

All of the fungi observed to be associated with cacao budwood and its loss of viability were also reported to be associated with cacao dieback (8). Turner discussed the various stresses that induce the dieback syndrome, and water stress may be most important. Likewise, the most important stress associated with budwood failures is loss of water from budsticks.

To transfer cacao germplasm, apparently healthy budsticks are selected from an apparently healthy tree. Certain procedures may prolong viability of cacao budwood so that germplasm transfer can be completed as a result of its successful propagation. It may be beneficial if budsticks are girdled 10-15 days before the budwood is removed from the donor tree, although Soria (5, 6) stated otherwise. A J Kennedy, formerly Head, Cocoa Research Unit, University of the West Indies, St. Augustine, Trinidad (personal communication), pointed out that leaf petioles cut 10-15 days before removal of budsticks induced natural abscision of the petiole stub and development

of a natural scar that prevents moisture loss at the point of leaf attachment. Also, the stub of the petiole when attached to the stem becomes a substrate for fungi on the surface of the stem, and it could provide nutrients for fungi within the stem. When wrapped with plastic grafting tape, parafilm, or other water-holding material, a moist chamber is created, within which fungi that normally do not affect cacao flourish, enter the axillary bud, and destroy it.

Several methods of budding or grafting offer reasonable potential for success providing that the time from removal of the budstick from the donor tree to its application to a rootstock plant is as short as possible. The most effective grafting technique establishes maximal contact between the cambium of the rootstock and the cambium of the scion. The side veneer graft provides this relationship. Regardless of the budding or grafting method, only vigorous healthy rootstock plants should be used (4).

For cacao germplasm collected in its center of origin, budsticks must be removed from a tree when it is encountered, so any pre-removal practice cannot be used. Everything possible should be done to reduce moisture loss from budsticks, such as dipping cut stem ends and cut ends of petiole stubs into molten paraffin. It is important to reduce to a minimum the number of days from removing budsticks from donor trees to grafting or budding to a rootstock plant by arranging in advance the most rapid transport channels possible (6).

#### LITERATURE CITED

- 1 ALLEN, J.B. 1987. London cocoa trade Amazon project Final Report. Phase 2. Cocoa Growers' Bulletin no. 39 94 p.
- 2 FRISON, E.A.; FELIU, E. (eds.) 1989. FAO/IBPGR technical guidelines for the safe movement of cocoa germplasm. Rome, International Board for Plant Genetic Resources, Food and Agriculture Organization of the United Nations. 29 p.
- 3 PURDY, L.H.; SODERHOLM, P.K. 1985. The nature of scionwood deterioration in *Theobroma cacao*. Phytopathology 75:1 278.
- 4 SHEPARD, R.; CHONG, C.F.; TAYLOR, J.G. 1981. Experience with nursery budgrafting on cocoa estates in Malaysia. Cocoa Growers' Bulletin 32: 20-29.
- 5 SORIA, J. 1961. Storage of living cacao budwood for transportation. Inter-American Cacao Center Annual Report 1960-61 Cacao 6(3):15
- 6 SORIA, J. 1974. Cacao (*Theobroma cacao*). In Handbook of Plant Introductions in Tropical Crops Ed by J. Leon. Rome, FAO Agricultural Studies, Food and Agriculture Organization of the United Nations. p 98-105
- 7 SORIA, J. 1975. Recent cocoa collecting expeditions Chapter 15. In Crop genetic resources for today and tomorrow. Ed by O.H. Frankel, J.G. Hawkes Cambridge University Press International Biological Programme 2.
- 8 TURNER, P.D. 1967. Cocoa dieback - a review of present knowledge. FAO Plant Protection Bulletin 15:81-101.

9. WELLMAN, F.L. 1977 Dictionary of tropical American crops and their diseases. The Metuchen, London, Scarecrow Press. 495 p.
10. YOUNG, M.J.; SAULS, J. 1984 Propagation of fruit-crops. Florida Cooperative Extension Service, University of Florida. 31 p.

## El Género *Theobroma* en el Territorio Federal Amazonas (Venezuela). I. Notas Etnobotánicas y Consideraciones Agronómicas<sup>1</sup>

P. Sánchez\*, K. Jaffé\*\*, M.C. Muller\*\*\*

### ABSTRACT

In order to assess the agronomic potential of *Theobroma* species in the Brazilian Amazonas territory, we collected live plants and botanical samples of cacao (*Theobroma cacao*), copo-azú (*T. grandiflorum*), montero cacao (*T. subincanum*), himare (*T. bicolor*), and kayani (*T. af gileri*). In each case, indigenous names and uses were recorded. Improved agronomic and phytosanitary practices for the commercially exploitable cacao species in the region are suggested, in view of forthcoming projects. Recommendations are also given for more efficient use of the resources involved.

### INTRODUCCION

**E**n su totalidad el gran bosque Amazónico es el más extenso del mundo (10), en nuestro caso, el área referida se ubica al sur del río Orinoco y tiene una superficie de 180 000 km<sup>2</sup> (15), presentando extensos sistemas montañosos. En razón a su ubicación, configuración espacial, distribución geográfica y las características culturales, sociales y económicas de sus pobladores, se han creado expectativas estatales

### COMPENDIO

A los fines de conocer el potencial agronómico de especies del género *Theobroma* en el Territorio Federal Amazonas, se colectaron muestras vivas y/o botánicas de cacao (*Theobroma cacao*), copo-azú (*Theobroma grandiflorum*), cacao montero (*Theobroma subincanum*), himare (*Theobroma bicolor*) y kyani (*Theobroma af gileri*). Para cada caso se especificó los usos y nombres autóctonos asignados por cada etnia indígena en particular. Para cacao, que es la especie del género explotada comercialmente, se presentan algunas consideraciones agronómicas y fitosanitarias, orientadas a mejorar las actividades de los programas cacaoteros de la región. Finalmente, se aportan sugerencias respecto al buen uso de los recursos en beneficio del hombre y su entorno.

que han generado proposiciones de actividades con miras a su futuro desarrollo. Esta actitud ha generado comentarios polarizados, destacando la fragilidad del ecosistema y la necesidad de formular estrategias claras e integrales con carácter participativo de las instituciones competentes.

Respecto al género *Theobroma*, se sabe que es de origen tropical (2, 3, 4, 5, 7, 13, 14, 16, 17) distribuido entre los 18° de latitud norte y 15° de latitud sur, restringido a zonas de alta precipitación y ubicado en el estrato medio de los bosques húmedos tropicales que mantienen una vegetación siempre verde. Algunos trabajos (2, 3, 4, 5, 6, 7, 12, 17) señalan como posible centro de origen de este género las cuencas de los ríos Amazonas y Orinoco.

En el caso específico del Territorio Federal Amazonas, Venezuela, se evidencia que hasta la fecha se

1 Recibido para publicación el 18 de enero 1990.  
Las expediciones que permitieron la realización del presente trabajo fueron parcialmente financiadas por el Proyecto CIRF-FAO (PR 3/11 IBPGR-Cocoa).

\* Fonaiap-Ceniap, Maracay, Edo. Aragua, Venezuela  
\*\* Departamento de Biología de Organismos, Universidad Simón Bolívar, Apartado 89000 Caracas 1080A, Venezuela  
\*\*\* Fundación Terramar Caicás, Venezuela

han realizado un considerable número de expediciones, con participación de destacados especialistas (8), pero orientadas básicamente a colectas botánicas de carácter genérico, cuyos materiales se mantienen en colecciones con fines de estudio y referencia. El muestreo no ha sido específico para *Theobroma* y en todo caso carente de orientación relativa a la propagación, evaluación y conservación de las especies con fines de mantenerlos y usarlos como fuente de material germoplásmico. Ello es de especial interés si consideramos que los bosques Amazónicos tienden a ser transformados de su estado natural, para utilizarlos con otros propósitos. Relativos al género y al territorio, se cuenta con información de su existencia antes de la llegada de los españoles (12) además de informes más recientes (1, 9, 11, 13), orientados fundamentalmente hacia los aspectos de promoción, diagnóstico, potencialidad de la región y desarrollo del cultivo del cacao en las comunidades indígenas.

En el presente trabajo reportamos los usos que le dan los indígenas a las especies de *Theobroma* encontrados en la zona, y se analizan los aspectos agronómicos generales de *Theobroma cacao* L. por ser la especie con mayor potencial para cultivos comerciales.

#### Areas exploradas y especies reportadas

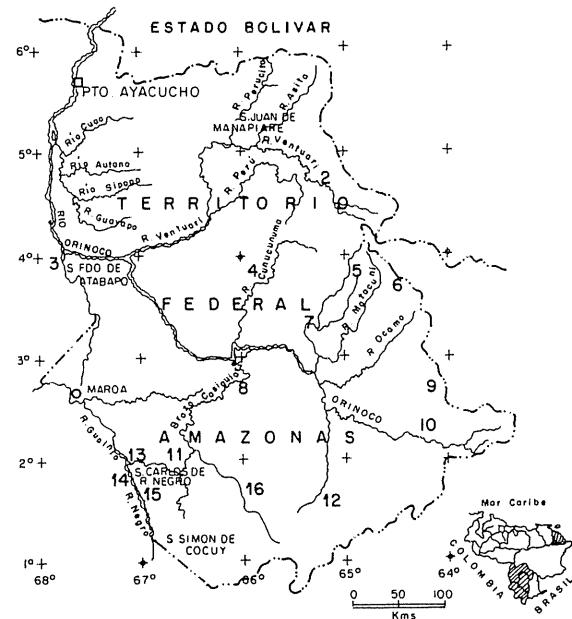
Es importante señalar que el Territorio Federal Amazonas, presenta acentuada dificultad de acceso y que, las distancias entre las áreas exploradas en este trabajo da una idea de su magnitud, aspecto que se visualiza en el Mapa 1. La vegetación es predominantemente selvática y la geografía actúa como indicadora de la diversidad de ambientes. Pudimos colectar las siguientes especies: *Theobroma cacao* "Cacao", *Theobroma subincanum* "Cacao montero o Maveni", *Theobroma grandiflorum* "Copo-Azú, Bareehua o Mamakuke' okuey", *Theobroma bicolor* "Himare" y *Theobroma a. f. gileri* "Kayani".

#### Notas etnobotánicas

En la cuenca del Orinoco han tenido asiento diferentes comunidades indígenas, que a través de los años han cambiado su distribución (Mapa 2), su integración con el medio y su comportamiento. Por ello la tentativa de revisar e incorporar a este trabajo la información etnobotánica, generada de la relación hombre-planta a través del tiempo, en una zona que cada día es más proclive a los cambios de usos y costumbres, traería la subsecuente pérdida de hábitos en información de los usos milenarios que los indígenas venezolanos han dado a las especies del género *Theobroma*. En el Cuadro 1 se especifica los nombres comunes del material reportado para cada étnia en particular.

#### Ye'cuana

1. Toki: En esta comunidad a la especie *Theobroma cacao* la conocen comúnmente como "cacao". El único uso que le dan es chupar el musílago que recubre las almendras. También se colectó *T. subincanum*, conocida como "cacao montero o maveni". Con el musílago que recubre las almendras preparan un refresco azucarado o simplemente lo ingenier chupando la semilla. Además se observaron plantas del género *Herrania*, conocida en la comunidad como "wata-yaca"; de ella sólo chupan el musílago.
2. Wasihiña: Esta comunidad es muy similar al caso anterior en cuanto a usos, nombres y tipos de cacao. No informaron del refresco que preparan en Toki con el musílago de "maveni". Al igual que en el caso anterior, se encontró *Herrania* a las que dan el mismo nombre y uso que en Toki.
3. Culebra: Está ubicada a orillas del Río Cunucunuma y los indígenas de la comunidad conocen a la especie *T. subincanum* como "maveni". En este caso no informaron de ningún uso. *Herrania* sp.



Mapa 1. Areas exploradas en el Territorio Federal Amazonas: San Pedro de Cataniapo (1), Cakuri (2), San Fernando de Atabapo (3), Culebra (4), Wasihiña (5), Simarawoschi (6), Toki (7), Capibara (8), Parima-b (9), Coyowateri (10), El Porvenir (11), Río Mava (12), Pto. Solano (13), S.C. de Río Negro (14), Chawaine (15), Río Siapa (16) y Pantonogueyteri (17).

también es conocida como "wata'yaca" y es utilizada para la cura de enfermedades respiratorias ingiriendo el musilago o preparando infusiones a base de las raíces maceradas.

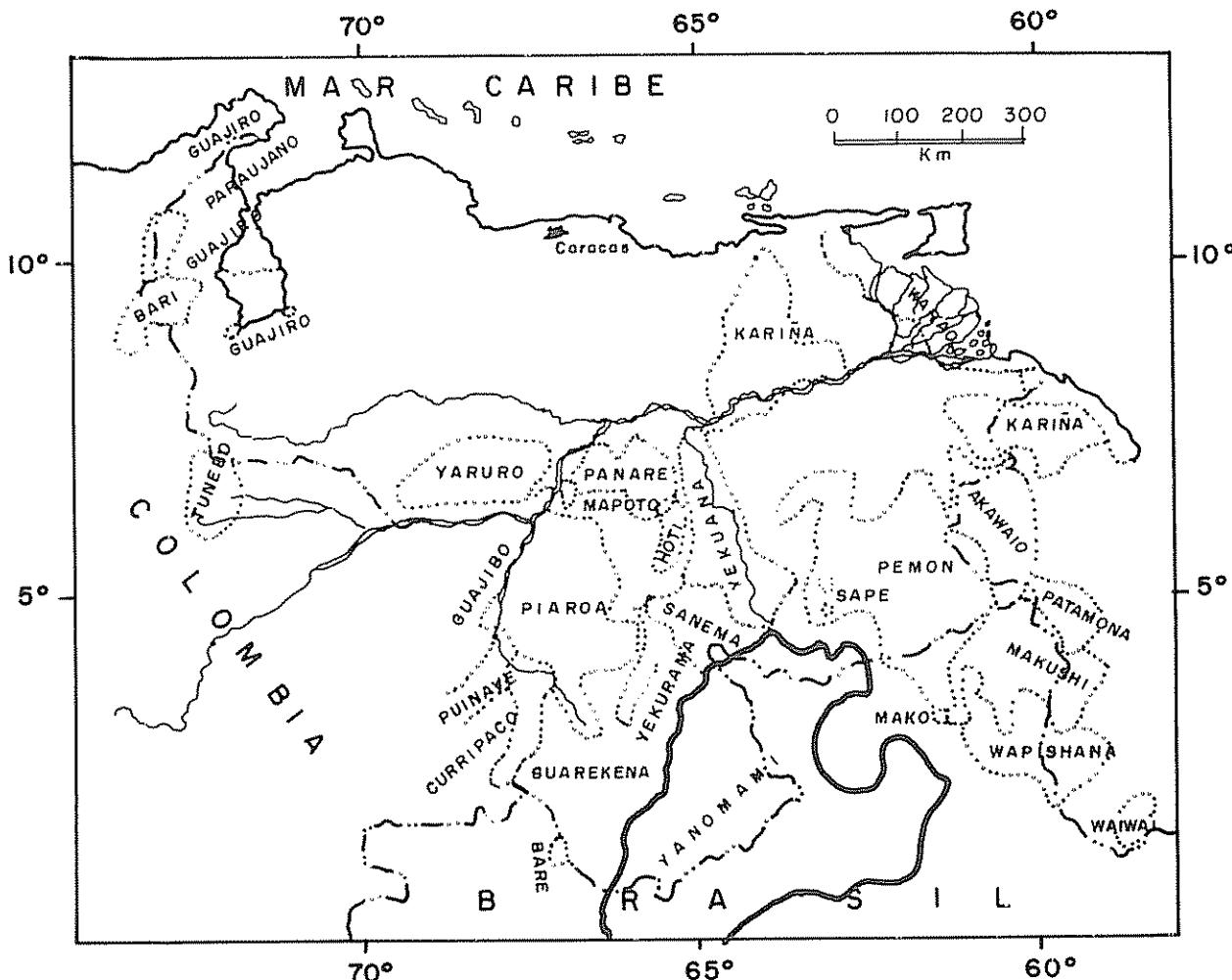
#### Yanomami

A *Theobroma cacao* lo conocen comúnmente como "Pohoroa" (Pohoro o Pohorke lu). Del fruto aprovechan al musilago que recubre las almendras, el cual ingieren chupando. Preparan un guarapo a partir del musilago y de las semillas, machucándola y mezclándola con agua.

Otro uso importante que la comunidad da a esta planta es el de iniciar el fuego. Utilizan los chupones jóvenes y una vez secos le queman la punta conservando en ella restos de carbón. Estas varitas son frotadas sobre otro pedazo de madera, también de cacao, que tiene una concavidad donde ajusta perfectamente la varita descrita anteriormente. Adyacente al acople colocan pequeños trozos de hojas secas y en la medi-

da que giran rápidamente la vara, frotan la madera. El calor producido por la fricción, ayudado por aire soplando sobre el punto de fricción, eventualmente produce fuego. Actualmente están sustituyendo a las varas de cacao por las de onoto para el mismo fin.

En Coyowateri se recolectó la especie *Theobroma bicolor* conocida en esta étnia como "himare" (hemare). De esta especie chupan el musilago azucarado que recubre las almendras. A las almendras las zanchochan o tuestan al fuego en hojas de platanillo, para luego comerlas sin otro tipo de procesamiento. En esta misma comunidad también se colectó *Herrania* spp. la cual es conocida como "Muruachi" (Marueshi). Del fruto chupan el musilago que recubre las almendras o preparan un guarapo similar al indicado para el cacao. Usan la ceniza de hojas y ramas para curar las heridas. En Parima-b, solo chupan el musilago azucarado de *Herrania* ya que no se encuentra cacao.



Mapa 2. Mapa etnográfico de Venezuela según Roberto Lizarralde 1982

### Bares-Baniwa-Curripaco

En San Carlos de Río Negro, como en los casos anteriores los indígenas chupan el musilago del cacao. Antiguamente, las almendras de cacao secas, las maceraban y aplicaban sobre las quemaduras por su efecto curativo. También, en el caso de los Bares y Baniwa, preparaban una pasta de cacao con las almendras y cuando la mujer estaba próxima a la primera menstruación, le colocaban sobre la cara una capa delgada de esa pasta y le mantenían en oscuridad hasta que le pasara el primer período menstrual. Con ello la mujer tratada tendría la piel más suave y no le saldrían manchas en la cara. En este lugar, se colectó la especie *Theobroma grandiflorum*, conocida vulgarmente como "Copo-azu". Los indígenas chupan el musilago de las almendras y también preparan refrescos y helados que gustan mucho a la comunidad. En la congregación de las Hermanas Nazarenas han preparado chocolate con las almendras de esta especie y comentan que es muy agradable.

Otra especie colectada en esta área fue *Theobroma subincanum* conocida comúnmente como "Cacao Montero" o "Cacao de monte". De esta planta los indígenas solo chupan el musilago.

### Consideraciones agronómicas

En vista de la importancia y del posible establecimiento de siembras de cacao a gran escala con fines comerciales en el territorio, consideramos de utilidad las siguientes observaciones:

Es necesario a fin de programar el establecimiento de plantaciones de cacao, hacer evaluaciones detalladas referentes a la vocación de la zona y del estado actual del cultivo. Sin embargo, por las características edafoclimáticas y de la vegetación existente, que actúa como indicadora, es de esperar que haciendo una adecuada selección de tierras, y de semillas para el establecimiento del cacaotal, este pueda adaptarse y producir satisfactoriamente, siempre y cuando disponga de condiciones aptas para su desarrollo.

Lo antes dicho implica que para alcanzar una explotación cacaotera rentable se debe contar con un personal conocedor del cultivo, con alcances en las etapas de desarrollo, beneficio, comercialización y aprovechamiento del producto final. En razón de haberse iniciado la explotación comercial del cultivo en la región, se comentan algunas observaciones sobre las áreas visitadas.

1. Los viveros: aunque de ubicación estratégica y con aceptable entrada de luz, manifiestan acentuadas fallas en la germinación de las semillas, marcadas diferencias en el crecimiento, vigor de las plantas y síntomas foliares que permiten presumir deficien-

cias nutricionales. Considerando la importancia del material de siembra, debería enfatizarse en las comunidades lo relativo a la adecuación de la semilla, preparación de la mezcla del material enraizante y/o evaluación del sistema de siembra adaptados a la región.

2. Las zonas exploradas que se han iniciado en el cultivo del cacao, adolecen de adecuado seguimiento y cuidado de las plantaciones; un caso lamentable, es el referido a los incendios forestales que han causado severos daños en cacaotales recién establecidos.
3. Las plantaciones establecidas están sembradas con criterios aceptables en cuanto al trazado en líneas y distancias de siembras (3 x 3 m en cacao y sombra temporal). Sin embargo, preocupa lo referente a la carencia casi total de árboles que suministren la sombra permanente. Desafortunadamente ésta es la situación de las plantaciones establecidas. Las comunidades no han trabajado en forma sincronizada y no le han dado un adecuado manejo a las áreas bajo cultivo; por ello las plantas manifiestan acentuadas diferencias en crecimiento y además al estar obligadas a crecer en condiciones adversas, son atacadas en alto grado por plagas y enfermedades. Por otro lado, al carecer de sombra hay mucha entrada de luz y las malezas proliferan con mayor facilidad, aumentando las labores y los costos de producción.

Impacienta lo antes señalado por la inversión efectuada, el tiempo dedicado al trabajo y el avanzado estado de las plantaciones. Por tal razón urgentes medidas que tiendan a evitar mayores pérdidas y a tomar previsiones para el desarrollo de las futuras actividades. Considerando entre las de alta prioridad, sistema de siembra y el estudio y evaluación del sombrío permanente más adaptado al medio.

Existe, un desconocimiento casi total en lo relativo a las podas y la necesidad de efectuar esta labor desde temprana edad del cacaotal. Esto es de carácter indispensable si se consideran sus bondades al momento de la cosecha y en el control de plagas y enfermedades.

4. Los suelos, aunque variables en las diferentes comunidades, presentan por lo general una buena estructura y en casi todos los casos tienen niveles aceptables de materia orgánica en descomposición. Por las observaciones de campo se puede inferir que son suelos de adecuada permeabilidad y que además, por la topografía y ubicación, es difícil que las zonas sembradas sufran inundaciones prolongadas.
5. En atención a las malas hierbas se puede indicar que existe predominio de malezas de hoja ancha y

Cuadro 1. Especies reportadas y nombres comunes según las etnias en donde se colectaron.

Nombre científico	Nombre común	Etnia
<i>T. cacao</i>	Cacao	Ye cuana, Piaroa, Bare y Curripaco
	Pojoroa	Yanomami
<i>T. subincanum</i>	Cacao montero	Bare, Baniwa y Curripaco
	Joa	Yanomami
	Maveni	Ye'cuana
<i>T. bicolor</i>	Himare	Yanomami
<i>T. grandiflorum</i>	Copo azú	Bare, Baniwa y Curripaco
	Bareehua	Piaroa
	Mamakuke' okuey	Ye'cuana
<i>T. af. gileri</i>	Kayani	Ye'cuana

que, el principal método de control utilizado es el mecánico, mediante el uso del machete. Esta práctica es ajustada al medio en razón de utilizar mano de obra familiar y evitar el uso de agroquímicos que en la actualidad no son (recomendados) en la región. No obstante el indígena requiere de entrenamiento en esa práctica, a fin de evitar heridas en los tallos dado el alto riesgo de la entrada de patógenos dañinos al cultivo.

6. Finalmente, señalamos que las especies más apreciadas en el territorio *Theobroma cacao* y *Theobroma grandiflorum*, son plantadas en áreas colindantes a las comunidades y lo hacen siguiendo sus métodos tradicionales de siembra y mantenimiento de conucos.

#### Consideraciones fitosanitarias

En todas las áreas visitadas en donde se encontró cacao (*T. cacao*), a la vez se comprobó la existencia de plagas y enfermedades que han sido reportadas en Venezuela y en otros países cacaoteros vecinos, como factores responsables de grandes pérdidas. Esto es una alerta ante la cual se deben tomar acciones preventivas y con más razón por tratarse de amplias zonas selváticas que, podrían constituirse en grandes reservas de agentes perjudiciales al cultivo, debido al desconocimiento por parte del indígena de la importancia de esta situación.

Resulta de interés y preocupación en el Territorio Federal Amazonas la enfermedad conocida como "Escoba de Brujas" causada por el hongo *Crinipellis*

perniciosa. Aunque la severidad de esta enfermedad varía según el clima y los materiales genéticos cultivados, se le considera como una de las enfermedades más importantes en los países en donde se le ha detectado. En nuestro caso, se encontró en las cercanías del alto Cuntinamo (Wasihíña) sobre *T. cacao* y en el alto Orinoco (Coyowateri) en ramas jóvenes de *T. subincanum*, en ambos casos se observaron abundantes escobas secas y verdes sobre las ramas terminales. Destacamos que en el primer caso se trata de un pequeño lote de plantas viejas dentro de la selva y en el segundo de plantas de crecimiento espontáneo, dispersas por toda la zona. Esto significa, que la enfermedad se presenta en condiciones naturales con muy poca intervención humana para ambos casos. Se ratifica que esta enfermedad es de alto riesgo para los programas cacaoteros que se pretenden desarrollar en el territorio, en consecuencia, se deberían iniciar estudios básicos y aplicados, así como labores de enseñanza y entrenamiento para que los indígenas actúen con acierto ante esta problemática.

En determinadas zonas, también se detectaron frutos momificados en diferentes estados de desarrollo que en algunos casos pudo deberse al efecto de microorganismos fitopatógenos. En mazorcas se observaron manchas pardas y de consistencia blanda, que por la sintomatología podemos asumir que se trata de la enfermedad conocida como "Pudrición Parda", causada por el hongo *Phytophthora* sp. Este hongo es muy agresivo y suele atacar frutos en diferentes estados de desarrollo y/o cualquier otra parte de la planta

En relación a insectos plagas, uno de los problemas más generalizados es el relativo a los "Comejenes" (Termitidae-*Nasutitermes* spp.). Un caso extremo se observó en la comunidad de Toki, en una plantación de siete años de edad, el 100% de las plantas mostraban colonias y galerías de termitas sobre tallos y ramas principales. Otra plaga generalizada es *Selenothrips rubrosinctus*, que se encontró en todas las áreas visitadas atacando frutos y hojas; presentándose el daño más significativo en este último caso. Las plantaciones con excesiva entrada de luz, muestran daños muy marcados sobre el área foliar

Las plantas de cacao de Cakuri, Toki y Coyowateri presentan daños del ataque de "Gota" *Steirastoma* spp. sobre troncos y ramas principales. El caso de mayor gravedad se observó en Cakuri, en donde el 100% de las plantas, de un área cultivada a plena exposición solar, manifestaban este problema.

En menor grado se observaron Afidos, Lepidópteros desfoliadores, Pseudococcidos, Pentatomidos y Cercopidos. En la actualidad, a estos grupos de insectos se les puede ubicar como plagas potenciales.

También es generalizado, en cacao y especies afines, el daño de los frutos causado por mamíferos silvestres que se alimentan de las almendras o procuran el musilago que las recubre. En este caso además del daño directo, hay que considerar su efecto indirecto al causar heridas por donde entran microorganismos nocivos.

Una maleza aérea importante para el cacao de la zona son las plantas parásitas representadas fundamentalmente por "Guate-pajarito" (Lorantaceae); éstas son muy abundantes en las cercanías de San Carlos de Río Negro sobre *T. cacao* y *T. grandiflorum*. Este es un problema de importancia para los futuros programas de desarrollo cacaotero regionales.

En conclusión, se destaca la importancia y los alcances de los problemas fitosanitarios en el Territorio Federal Amazonas; tomando en cuenta que son aspectos complejos que requieren de recursos financieros y de personal especializado para el estudio y seguimiento de esta problemática. Por ello, instituciones especializadas deben ofrecer asesoramiento técnico y adiestramiento al personal nativo en lo relativo a la protección del cultivo.

#### Sugerencias para el éxito de cualquier programa cacaotero en la región

1 Tomar en consideración los hábitos agrícolas del indígena Amazonense a fin de compatibilizarlos con las actividades implícitas en los programas cacaoteros.

- 2 Integrar armónicamente el cultivo al bosque y no eliminar éste para la siembra del cacao.
- 3 Brindar un eficiente e intensivo asesoramiento técnico, con personal debidamente entrenado en el cultivo y en el manejo de los bosques.
- 4 Adiestrar a los indígenas en lo relativo al almacenamiento y comercialización de las almendras de cacao.
- 5 Generar información técnica regional mediante investigación con énfasis en los siguientes aspectos:
  - 5.1 Evaluación de materiales de siembra autóctonos y foráneos a objeto de promover los más promisorios.
  - 5.2 Determinación de los sistemas de siembra más adaptados al territorio, para cacao y para plantas asociadas, que suministren la sombra temporal y permanente.
  - 5.3 Manejo de plagas y enfermedades, según la problemática y cultura de las comunidades indígenas.
  - 5.4 Bondades y usos de las diferentes especies del género existente en el Territorio.

#### LITERATURA CITADA

- 1 BORTHOMIRTH, A. 1986. Informe sobre gira efectuada al T.F. Amazonas del 23-02-86 al 07-03-86 s.n.t
- 2 BRAUDEAU, J. 1975. El cacao. Instituto Francés del Café y del Cacao, Editorial Blume
- 3 CARLETTI, G.A. 1973. Expedición Internacional al Amazonia Ecuatoriana para colectar material botánico de cacao. Revista Theobroma (Bra) 3(3).
- 4 CUATRECASAS, J. 1964. Cacao and its allies a taxonomic revision of the genus Theobroma. Bulletin of the United States National Museum Smithsonian Institution. Washington.
- 5 ENRIQUEZ, G.A. 1983. Colecciones de cacao criollo en la parte sur de Centro América. Presentado en la Reunión del IBPGR, Miami. Fló.
- 6 FONDO NACIONAL DEL CACAO 1977. El cacao en Venezuela. Caracas
- 7 HARDY, F. 1961. Manual del cacao. San José, C.R. IICA
- 8 HUBER, O.; WURDACK, J. 1984. History of botanical exploration in Territorio Federal Amazonas. Venezuela, Smithsonian Institution Press
- 9 KORTA, J. 1986. Un viaje por las Misiones del Orinoco. Pto Ayacucho, Ven.
- 10 LUGO, E.A. 1988. Uso de las zonas bocosas de América Latina Tropical. Interciencia 13(6).
- 11 MORONTA, D. 1986. Diagnóstico de área para el cultivo de cacao en las comunidades de: San Juan de Manapiare, La Esmeralda, Toki, Wuasihña, Isla Chiquire, Teneua, Caño Negro, Pozo Terecay, Cakuri y Valle Guanay. Pto Ayacucho, Ven.

- 12 RAMOS, P.D 1946. Tratado de límites de 1750 y la expedición de Iturriaga al Orinoco. Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Universidad de Valladolid España.
- 13 SANCHEZ, P.A.; VELASQUEZ, V. 1986. Diagnóstico para determinar la factibilidad de cultivar cacao (*Theobroma cacao*) en el Territorio Federal Amazonas Caucagua, Ven
- 14 TROPICAL AND SUBTROPICAL Agriculture. 1961. New York MacMillan Comp. v. 2, p. 819-863.
- 15 IRUJILLO, B. 1987. Criterios agronómicos concernientes a la intervención del medio físico amazónico: Uso y manejos de sus ecosistemas. Revista La Iglesia en Amazonas (Ven) 38:35-46.
- 16 URPI, J.M. 1958. Notas sobre el posible origen y la variabilidad del cacao cultivado en la América Tropical. Turrialba (C.R.) Vol. 8
- 17 WOOD, G.A. 1982. Cocoa. Longman Group Ltd.

## El Género *Theobroma* en el Territorio Federal Amazonas (Venezuela). II. Distribución Geográfica<sup>1</sup>

P.A. Sánchez\*, K. Jaffé\*\*

### ABSTRACT

We report on the distribution of cocoa (*Theobroma cacao*), copo-azú (*T. grandiflorum*), cacao montero (*T. subincanum*), himare (*T. bicolor*) and Kayani (*T. af. gileri*) in Venezuela. Collection areas are indicated, giving their altitude and geographical coordinates. Some genetic characteristics of cocoa are presented. Based on our information and that from literature, we reanalyze the geographical distribution of each species, and conclude that the biogeographical center of origin of *T. cacao* is not the Amazon basin, but that it has been introduced to the area, possibly by the Yanomami Indians.

### INTRODUCCION

Es conocido que el género *Theobroma* es de origen tropical (2, 3, 4, 5, 7, 13, 14, 16, 17), distribuido en América entre los 18° de latitud Norte 15° de latitud Sur, restringido a zonas de alta precipitación ubicado en el estrato medio de los bosques húmedos tropicales que mantienen una vegetación siempre verde. Algunos trabajos (2, 3, 4, 5, 6, 7, 12, 17) señalan como posible centro de origen de este género a las cuencas de los ríos Amazonas y Orinoco.

El Territorio Federal Amazonas ocupa una superficie de 180 000 km<sup>2</sup> (10), y se le ubica dentro del

### COMPENDIO

Se reporta la distribución de cacao (*Theobroma cacao*), copo-azú (*Theobroma grandiflorum*), cacao montero (*Theobroma subincanum*), himare (*Theobroma bicolor*) y Kayani (*Theobroma af. gileri*) en Venezuela. Se especifica la ubicación del área muestreada, altitud y coordenadas geográficas. Para cacao, se muestran algunos caracteres genéticos. Con base en la información recopilada y referencias bibliográficas, se analiza la biodistribución de cada especie. Se concluye que el centro de origen biogeográfico de *T. cacao* no es la cuenca Amazónica, sino más bien, esta especie fue introducida en la zona por los indígenas, probablemente por los Yanomami.

gran bosque amazónico, el más grande del mundo (15). En nuestro caso es evidente que hasta la fecha se han realizado un considerable número de expediciones, con participación de destacados especialistas en ciencias biológicas (8); pero orientadas básicamente a colectas botánicas de carácter genérico, cuyos materiales se mantienen en colecciones con fines de estudio y referencia. En cacao, el muestreo no ha sido específico. Ello es de especial interés si consideramos que los bosques amazónicos tienden a ser transformados de su estado natural, para ser utilizados con otros propósitos. Relativos al rubro y al territorio, se cuenta con información de su existencia antes de la llegada de los españoles (12), además se han escrito informes (1, 9, 11, 13), orientados fundamentalmente hacia los aspectos de promoción, diagnóstico, potencialidad de la región y desarrollo del cultivo de cacao en las comunidades indígenas.

<sup>1</sup> Recibido para publicación el 18 de enero 1990.

\* Fonaiap - Ceniap - Maracay.

\*\* Departamento de Biología de Organismos Universidad Simón Bolívar Apartado 89000, Caracas 1080A

Este trabajo, presenta los datos del material de *Theobroma* colectado en nuestras expediciones a la zona y se discute la distribución de cada especie

#### Areas exploradas y especies reportadas

Es importante señalar que el Territorio presenta acentuada dificultad de acceso y que las distancias entre las áreas exploradas da una idea de su magnitud, (18). La vegetación es predominantemente selvática y

la geografía actúa como indicadora de la diversidad de ambientes. En este trabajo, reportamos la colecta de las siguientes especies: *Theobroma grandiflorum* "copo-azú, Bareehua o Mamakuké okuey", *Theobroma bicolor* "himare", *Theobroma af. gileri* "kayani" y *Herrania* sp. En todos los casos se han tomado datos de campo y muestras botánicas con fines de colección y estudio taxonómico de las especies colectadas. El Cuadro 1 indica el área y sus características, donde fue encontrada cada una de las especies colectadas.

Cuadro 1. Areas exploradas y especies reportadas en el Territorio Federal Amazonas, Venezuela.

Comunidades exploradas	Altitud (m)	Coordenadas geográficas	Especies localizadas
S P de Cataniapo	100	5° 32'N; 65° 24'W	<i>T. grandiflorum</i>
Cakuri	300	4° 32'N; 65° 24'W	<i>T. cacao</i> <i>T. grandiflorum</i> <i>Herrania</i> sp
S.F. de Atabapo	90	4° 05'N; 67° 40'W	<i>T. cacao</i>
Culebra	175	3° 28'N; 65° 44'W	<i>T. subincanum</i> <i>Herrania</i> sp
Wasihíña	300	3° 45'N; 64° 59'W	<i>T. cacao</i> <i>T. subincanum</i> <i>Herrania</i> sp.
Simarawoshi	710	3° 48'N; 65° 12'W	<i>Herrania</i> sp.
Toki	180	3° 00'N; 65° 12'W	<i>T. cacao</i> <i>T. subincanum</i> <i>Herrania</i> sp.
Río Mavaca	200	1° 59'N; 65° 06'W	<i>T. af. gileri</i>
Capibara	240	2° 36'N; 66° 12'W	<i>T. cacao</i> <i>T. subincanum</i> <i>Herrania</i> sp.
El Porvenir	200	2° 06'N; 66° 27'W	<i>T. cacao</i>
Pto. Solano	170	1° 59'N; 66° 58'W	<i>T. cacao</i>
S.C de Río Negro	150	1° 55'N; 67° 02'W	<i>T. cacao</i> <i>T. grandiflorum</i> <i>T. subincanum</i>
Chawaine	120	1° 45'N; 67° 02'W	<i>T. cacao</i> <i>T. grandiflorum</i> <i>T. subincanum</i>
Río Siapa	200	1° 49'N; 65° 44'W	<i>T. subincanum</i>
Pantonoguey-teri	200	2° 20'N; 64° 65'W	<i>T. bicolor</i> <i>T. cacao</i>

### Consideraciones genéticas y distribución

Basado en los objetivos del proyecto y el interés particular por el reservorio genético existente en el Amazonas Venezolano, subdividiremos esta parte en consideraciones sobre la especie *Theobroma cacao* y sobre otras especies del mismo género.

#### *Theobroma cacao*

Aún cuando no se ha realizado un estudio exhaustivo para identificar genéticamente los materiales de *T. cacao* colectados en el Territorio, se puede inferir que todas las colectas tienen un origen común, ello, en razón de presentar semejanzas evidentes en: color de los brotes; forma, color y tamaño de las hojas, tamaño y color de las flores; forma, color, textura, tamaño y color de los cotiledones; rango de los índices de los frutos y semillas; proporcionalidad de los pesos; grosor de la corteza del fruto y presencia de surcos y costillas poco pronunciadas (Cuadro 2).

En algunos casos no se pudo proceder con el registro de todos los datos, en razón de que las áreas visitadas no disponían de árboles con frutos en adecuado estado de desarrollo, dificultándose la toma de los datos respectivos. Los Cuadros 2 y 3 especifican las características externas e internas de los frutos colectados. En atención a estos cuadros, a las observaciones de campo, y a informaciones suministradas por los indígenas, hacemos las siguientes observaciones:

1. Las plantas de cacao (*T. cacao*) se encontraban cercanas a las viviendas, adyacentes a los caminos indígenas activos o abandonados y en áreas donde presumiblemente se desarrolló alguna actividad humana
2. La presencia de algunos caracteres e índices poco deseables desde el punto de vista comercial, posiblemente se deba a que algunas muestras habían perdido turgencia al momento de procesarlas y a que las plantas no reciben ningún tratamiento agronómico especial.

3. En razón de las observaciones efectuadas y por la aparente uniformidad de los materiales colectados, se puede aseverar que no existen problemas de autoincompatibilidad, debido a que tanto en plantas agrupadas como en las aisladas se observaron niveles aceptables de fructificación.

4. En los frutos procesados se observaron semillas altamente degeneradas, presentando musilago con pericarpio incompleto y sin cotiledones, por ello se presume la existencia de acentuadas deficiencias nutricionales en la formación y evolución del fruto desde el mismo momento en que ocurre la polinización, o se presume la incidencia de algún factor genético.
5. Las semillas viables germinan normalmente en condiciones de vivero, los brotes son verde claro con tenues tonalidades de rojo.

Del inicio de la explotación cacaotera en el país se conoce muy poco, sin embargo, es sabido que a la llegada de los españoles, ya existía el cultivo al norte del Orinoco. Quizás esta situación también halla sido igual en el Territorio Federal Amazonas, en donde han tenido asiento diversas comunidades humanas desde hace miles de años.

Ramos (12) en su trabajo, tratado de límites de 1750 y la expedición de Iturriaga, menciona los relatos que verifican la existencia de plantas de cacao en el Territorio antes que llegaran las primeras misiones. Si a esto sumamos la uniformidad genética del material colectado, es posible que las plantas que hemos visto sean descendientes de aquellos materiales y que

Cuadro 2. Características externas de las muestras de *T. cacao* colectadas en el Territorio Federal Amazonas.

Origen	Peso (g)	Tamaño (mm)	Color	Forma de la base	Textura	Grosor de la corteza (mm)
Coyowateri	432	140 x 85	Verde claro	Continua	Moderadamente liso	21-26
Toki	491	150 x 85	Verde claro	Continua	Moderadamente liso	22-27
Porvenir	543	150 x 90	Verde claro	Continua	Moderadamente liso	14-15
San Carlos de Río Negro	340	140 x 70	Verde claro	Continua	Moderadamente liso	11-13
Pto Solano	571	140 x 95	Verde claro	Continua	Moderadamente liso	15-27
Chewaine	430	150 x 80	Verde claro	Continua	Moderadamente liso	12-17
Cakuri	403	140 x 80	Verde claro	Continua	Moderadamente liso	20-23
San Fernando de Atabapo	510	150 x 85	Verde claro	Continua	Moderadamente liso	20-25

Cuadro 3. Características internas de las muestras de *T. cacao* colectadas en el Territorio Federal Amazonas.

Origen	Número de almendras	Peso (g)	Forma de almendras	Color de almendras	Índice de almendras	Índice de mazorca
Coyowateri	36	110	Ligeramente ovaladas	Violeta claro	1.22	22.7
Toki	40	116	Ligeramente ovaladas	Violeta claro	1.16	21.5
Porvenir	40	105	Ligeramente ovaladas	Violeta claro	1.05	23.8
San Carlos de R. Negro	39	74	Ligeramente ovaladas	Violeta claro	0.76	33.8
Pto. Solano	40	124	Ligeramente ovaladas	Violeta claro	1.24	20.1
Chewaine	27	57	Ligeramente ovaladas	Violeta claro	0.85	43.3
Cakuri	17	46	Ligeramente ovaladas	Violeta claro	1.08	54.5
San Fernando de Atabapo	41	106	Ligeramente ovaladas	Violeta claro	1.03	23.6

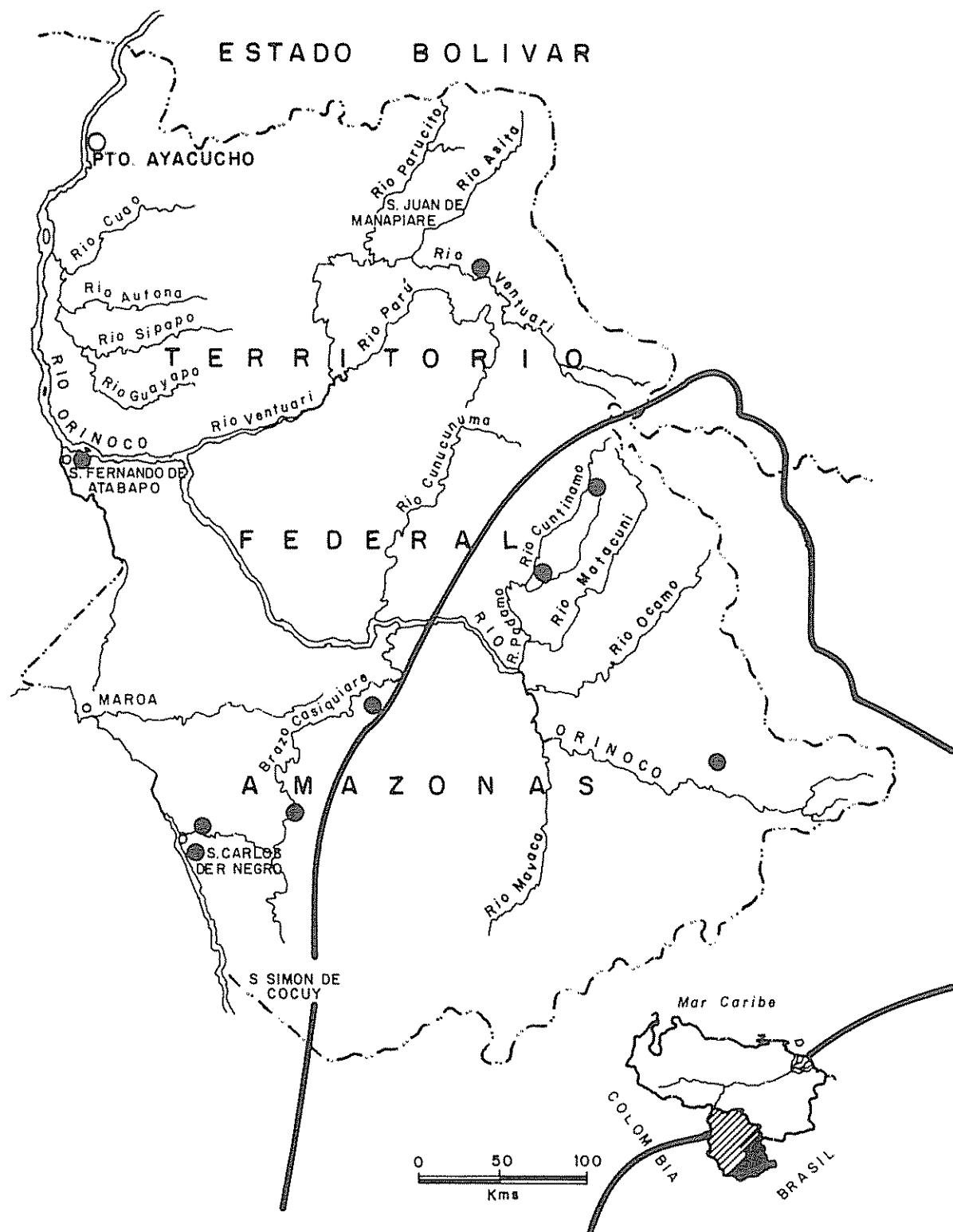
el aislamiento geográfico permitió la inalterabilidad de los caracteres. Además, tal uniformidad nos permite indicar que no existe diversidad intraespecífica y que la cuenca del Río Orinoco podría ser centro de origen de otras especies del mismo género pero no de *Theobroma cacao*. Las plantas muestreadas son de origen foráneo, cuya época y vía de penetración no podemos precisar. En el Mapa 1 se observan las áreas donde se colectaron muestras de *T. cacao* y a la vez se indica la región ocupada actualmente por la etnia Yanomami. Se hace esta acotación en razón de que este grupo indígena ha ocupado desde épocas muy antiguas gran parte del Territorio; para ellos el cacao es una planta muy especial, asignándole el nombre de "Pojoroa" que significa en esa lengua fuego y todavía utilizan su madera para estos fines. Los Yanomami pueden ser considerados como la única etnia en la Amazonia venezolana que conoce a *T. cacao* de antes de la colonización europea. Considerando lo expuesto, presumimos que esta etnia ha tenido un papel muy importante en la diseminación del cacao por la selva amazónica, pudiendo ser considerada la que introdujo el cultivo a la Sierra Parima y al Alto Orinoco, mucho antes de la colonización europea.

Ramos (12) en su trabajo Tratado de límites de 1750 y la expedición de Iturriaga menciona los relatos que verifican la existencia de plantas de cacao en el Territorio antes que llegaran las primeras misiones. Si a esto sumamos la uniformidad genética del material colectado, es posible que las plantas que hemos visto, sean descendientes de aquellos materiales y que el aislamiento geográfico permitió la inalterabilidad de los caracteres. Además, tal uniformidad nos permite indicar que no existe diversidad intraespecífica y que la cuenca del Río Orinoco podría ser centro de origen de otras especies del mismo género pero no de *Theobroma cacao*. Las plantas muestreadas son de origen foráneo, cuya época y vía de penetración no

podemos precisar. En el Mapa 1 se observan las áreas donde se colectaron muestras de *T. cacao* y a la vez se indica la región ocupada actualmente por la etnia Yanomami. Se hace esta acotación en razón de que este grupo indígena ha ocupado desde épocas muy antiguas gran parte del Territorio; para ellos el cacao es una planta muy especial, asignándole el nombre de "Pojoroa" que significa en esa lengua fuego y todavía utilizan su madera para estos fines. Los Yanomami pueden ser considerados como la única etnia en la Amazonia venezolana que conoce a *T. cacao* de antes de la colonización europea. Considerando lo expuesto, presumimos que esta etnia ha tenido un papel muy importante en la diseminación del cacao por la selva amazónica, pudiendo ser considerada la que introdujo el cultivo a la Sierra Parima y al Alto Orinoco, mucho antes de la colonización europea.

#### *Theobroma grandiflorum*

Quatrecasas (4) señala como área de origen de esta planta a las adyacencias del Río Amazonas (Mapa 2), y a otros países donde se ha logrado dispersar. En el caso de Venezuela, indica que se le ha ubicado en Capihuara (Capibara), Alto Casiquiare. Esto lo ratificamos en este trabajo, e incluimos de esta zona a los caseríos y comunidades aledaños a Río Negro en donde se le conoce vulgarmente como "Copo-azú". Hemos ubicado a *T. grandiflorum* también en el Alto Ventuari y en el Alto Cataniapo, lugares muy distantes a los antes señalados. De esto, llama la atención que las etnias en cada caso Ye-cuana y Piaroa, le asignan nombres específicos "Mamakuke-okuey" y "Bareehua" respectivamente, y que según los indígenas le conocen desde épocas muy remotas. En el caso del Cataniapo, que es el más distante del supuesto centro de origen, las plantas se ubicaron en zonas selváticas cercanas a la comunidad de San Pedro de Cata-



Mapa 1. Zonas donde se colectó *Theobroma cacao* y región ocupada por la etnia Yanomami. Las colectas de plantas silvestres se encontraron todas dentro de la región Yanomami.

niapo y los árboles alcanzan gran desarrollo con alturas entre 15 y 20 m. Según los indígenas de avanzada edad, estas plantas son muy antiguas y apreciadas por la comunidad por el sabor agradable del musilago que recubre las semillas.

En atención a lo expuesto y utilizando el mapa de distribución propuesto por Cuatrecasas (4), se muestra una ampliación de rango de distribución, incluyendo solamente las áreas donde se le han encontrado creciendo espontáneamente. De esta nueva biodistribución resalta que posiblemente el centro de origen de esta especie se encuentre en el Alto Cataniapo (Venezuela) y que la dinámica del flujo de las aguas entre el Orinoco, Caño Casiquiare, Río Negro y Amazonas han contribuido, a través de los años, a la actual biodistribución de esta especie. Posiblemente, debido a la dinámica de flujo de aguas antes señaladas, el agua del río Cataniapo pudo haber corrido, en algún momento del pasado, hacia el Amazonas.

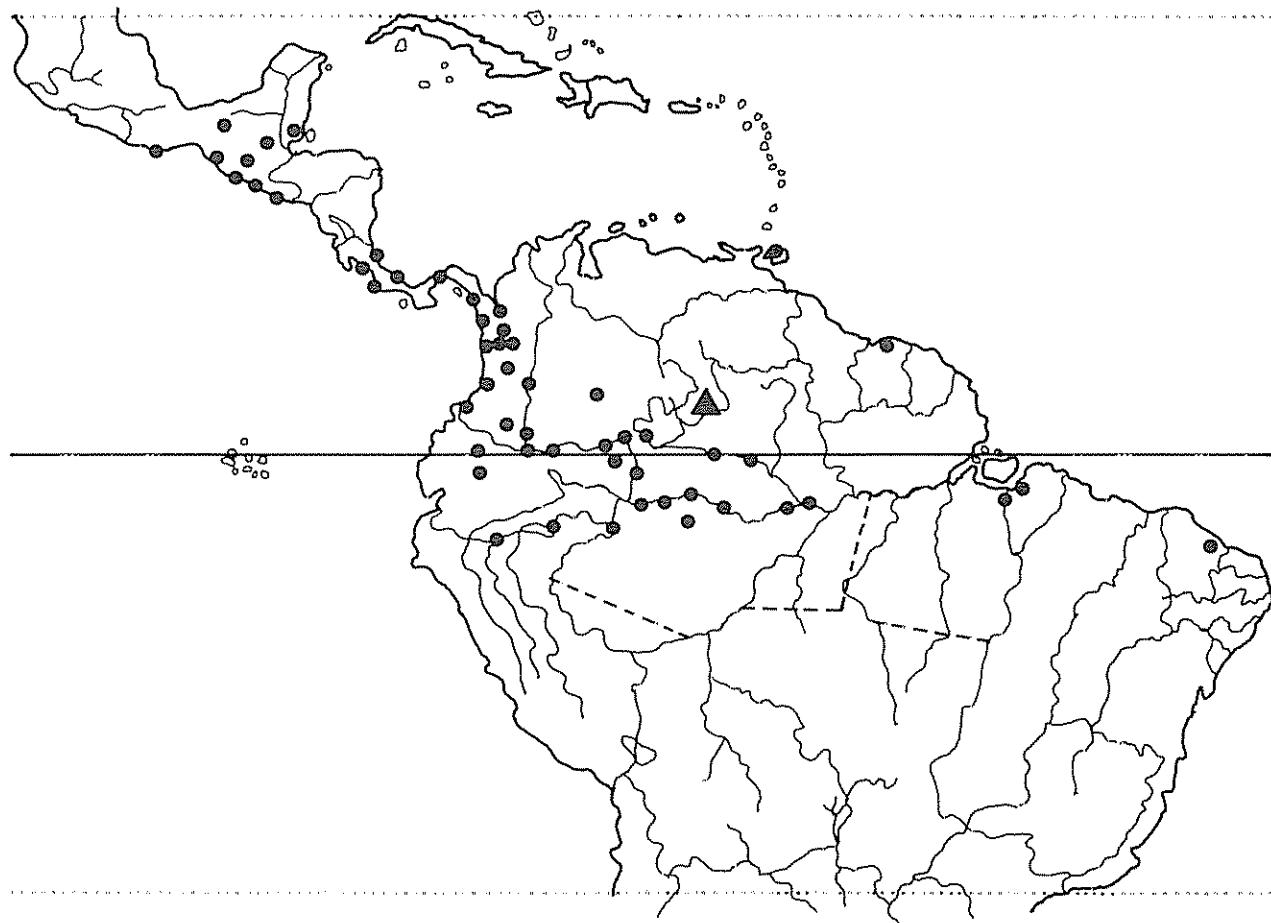
#### *Theobroma subincanum*

Llamado "cacao montero" por los Baré, Baniwa y Curripaco; "joa" por los Yanomami y "maventí" por los Ye'cuanas. Es una especie frecuente y abundante que se encuentra ampliamente distribuida por todo el Territorio. Los árboles crecen en suelos orgánicos o arenosos pero se ubican preferentemente en las cercanías a los ríos o pequeñas corrientes de agua.

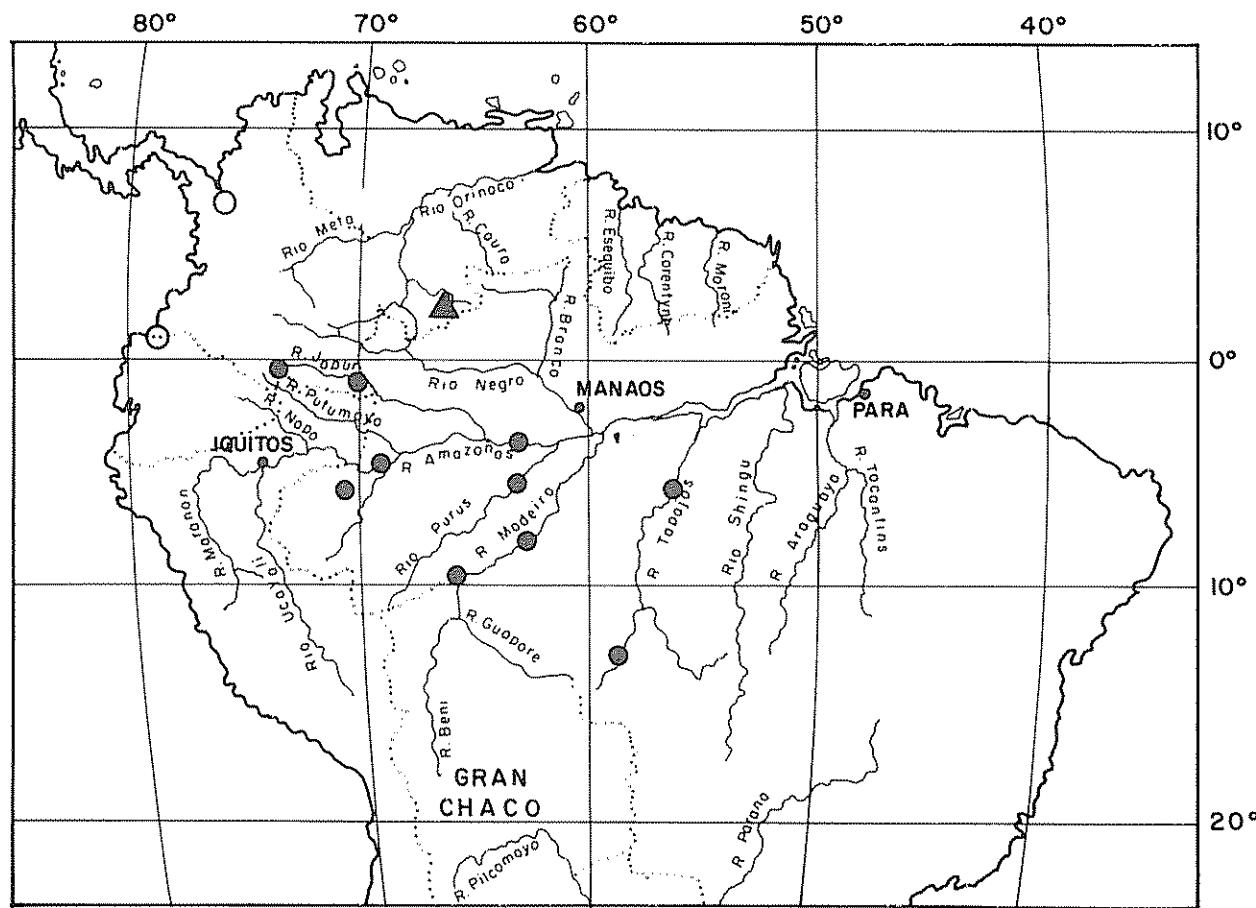
Nuestros datos de distribución de esta especie coincide con lo señalado por Cuatrecasas (4) y esto se muestra en el Mapa 2.

#### *Theobroma bicolor*

Esta especie es conocida como "himare" por los Yanomami. Hasta la fecha no había sido reportada, para Venezuela, como una planta de crecimiento



Mapa 2. Distribución de *Theobroma subincanum* (área 1) y de *Theobroma grandiflorum* (área 2) basado en nuestros datos y los reportados por Cuatrecasas (4).



Mapa 3. Área donde se colectó *Theobroma bicolor* (triángulo negro) y distribución general de esta especie según Cuatrecasas (4).

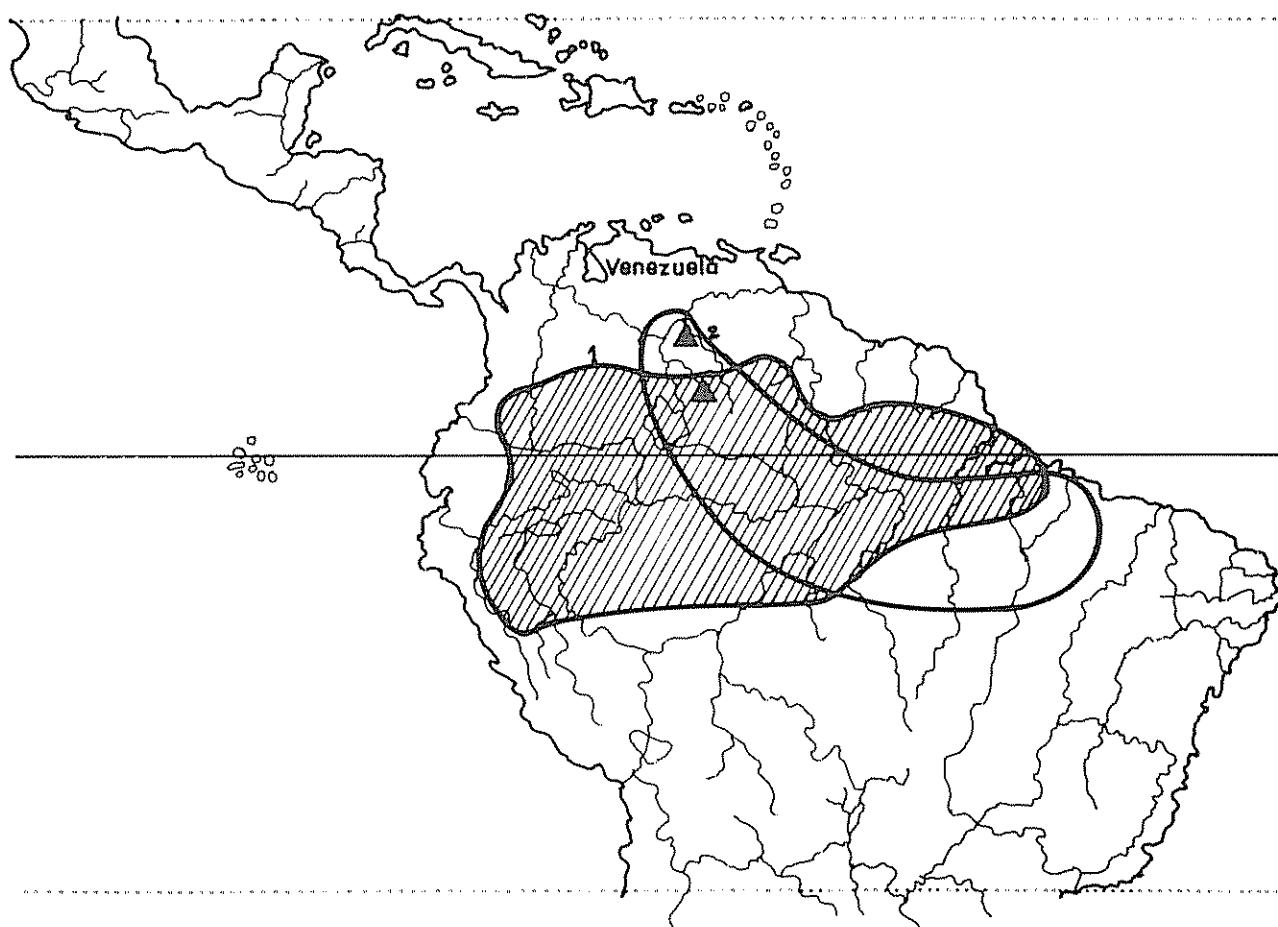
espontáneo en sus selvas tropicales. Aquí señalamos que la hemos encontrado en localidades próximas al nacimiento del Orinoco (Coyowateri) y Pantonogüeyteri. Son plantas muy desarrolladas que alcanzan alturas competitivas con la vegetación selvática; se ubican preferentemente en áreas de colinas moderadas y, por la distribución, ubicación y porte de las plantas podríamos asumir que esta especie es silvestre, dispersándose en la región gracias a los animales salvajes y a los seres humanos. Su amplia biodistribución se muestra en el Mapa 3, donde la información de Cuatrecasas (4) se complementa con nuestros datos.

#### *Theobroma af. gileri*

Cuatrecasas (4) señala que la elevación de los Andes al inicio del terciario ha favorecido la especiación

del género *Theobroma*, por la vía del aislamiento geográfico. Además señala que *T. gileri* es una especie vicaria que quedó ubicada al oeste de la cordillera de los Andes, restringida a los bosques tropicales de Colombia y norte de Ecuador (Mapa 4).

Las características del material muestreado (frutos, hojas, ramas) coincide con esta especie. Nos llama la atención que se encuentre en el Alto Mavaca, al este de la Cordillera Andina, a una distancia considerable de la localidad tipo, separadas de ésta por eficientes barreras geográficas que limitan su dispersión. Las plantas son de crecimiento espontáneo en la selva. A nuestro juicio ésta es una colecta muy interesante y puede tratarse de una nueva especie de *Theobroma*.



Mapa 4. Ubicación en Venezuela de *Theobroma af. gileri* (triángulo negro) y la distribución de esta especie (círculos abiertos) y de *Theobroma microcarpum* (círculos negros) según Cuatrecasas (4).

#### LITERATURA CITADA

1. BORTHOMIRTH, A. 1986. Informe sobre gira efectuada al T.F. Amazonas del 23-02-86 al 07-03-86. s.n.t
2. BRAUDEAU, J. 1975. El cacao. Instituto Francés del café y del cacao, Edit. Blume.
3. CARLETTI, G.A. 1973. Expedición internacional al Amazonia Ecuatoriana para colectar material botánico de cacao. Revista Theobroma. Bra 3(3)
4. CUATRECASAS, J. 1964. Cacao and its allies: a taxonomic revision of the genus *Theobroma*. Bulletin of the United States National Museum Smithsonian Institution, Washington
5. ENRIQUEZ, G.A. 1983 Colecciones de cacao criollo en la parte sur de Centro América. Miami, Fla. Presentado en la Reunión del IBPGR.
6. FONDO NACIONAL DE CACAO. 1977. El cacao en Venezuela. Caracas
7. HARDY, F. 1961. Manual del cacao. San José, C.R., IICA.
8. HUBER, O.; WURDACK, J. 1984. History of botanical exploration in Territorio Federal Amazonas; Venezuela. Washington. Smithsonian Institution Press.
9. KORTA, J. 1986. Un viaje por las Misiones del Orinoco. Pto. Ayacucho, Ven.
10. LUGO, E.A. 1988. Uso de las zonas bosquosas de América Latina tropical. Caracas. Interciencia (Ven.) 13(16).
11. MORONTA, D. 1986. Diagnóstico de área para el cultivo de cacao en las comunidades de: San Juan de Manapiare, La Esmeralda, Toki, Wuasiña, Isla Chiguire, Tencua, Caño Negro, Pozo Terecay, Kakuri y Valle Guanay. Pto. Ayacucho, Ven.
12. RAMOS, D. 1986. Tratado de límites de 1750 y la expedición de Iturriaga al Orinoco. Madrid, España., Consejo Superior de Investigación Científica, Universidad de Valla Dolid.

13. SANCHEZ, P.A.; VELASQUEZ, V. 1986. Diagnóstico para determinar la factibilidad de cultivar cacao (*Theobroma cacao*) en el Territorio Federal Amazonas, Venezuela Caucagua.
14. TROPICAL AND SUBTROPICAL agriculture. 1961 New York. Macmillan Company. v 2, p. 819-863.
15. IRUJILLO, B. 1987. Criterios agronómicos concernientes a la intervención del medio físico amazónico:
16. URPI, J.M. 1958. Notas sobre el posible origen y la variabilidad del cacao cultivado en la América Tropical. Turrialba (C.R.). v. 8.
17. WOOD, G.A. 1982 Cacao. Longman Group Ltd
18. SANCHEZ, P.; JAFFE, K., MULLER, M.C. 1989 El género *Theobroma* en el Territorio Federal Amazonas (Venezuela). I: Notas etnobotánicas y consideraciones agronómicas. Caracas, Ven. 21 p.

## Pollination Biology of *Theobroma* and *Herrania* (Sterculiaceae). IV. Major Volatile Constituents of Steam-Distilled Floral Oils as Field Attractants to Cacao-Associated Midges (Diptera: Cecidomyiidae and Ceratopogonidae) in Costa Rica<sup>1</sup>

A M Young\*

### ABSTRACT

Several distinctive, commercially-available volatile hydrocarbons and terpenoid substances identified from the floral fragrance oils of *Theobroma* species (Sterculiaceae), especially *T. simiarum* Donn. Smith and *T. cacao* Linnaeus, were bioassayed in "Finca Experimental La Lola" near Siquirres, Limón Province, Costa Rica during dry and wet seasons to determine their individual attractiveness to cacao-pollinating midges. Cecidomyiidae exhibited a slightly greater attraction to terpenoid substances tested, most notably geraniol, limonene, whereas Ceratopogonidae, the principal pollinators of *T. cacao*, were attracted in much lower numbers to both sets of substances. Attraction levels of midges to the volatiles tested are of the same order of magnitude observed for attraction of midges to the whole steam-distilled floral fragrance oils of these *Theobroma* species. Field observations indicate that Cecidomyiidae are attracted to the open flowers of both *T. simiarum* and *T. cacao*, while Ceratopogonidae are mostly attracted to *T. cacao*. The data, while preliminary, suggest that both terpenoid substances and hydrocarbons function as attractants for cacao-pollinating Ceratopogonidae and Cecidomyiidae.

### COMPENDIO

En la Finca Experimental La Lola, cerca de Siquirres en la provincia de Limón, Costa Rica, se hicieron pruebas con dos constituyentes volátiles de aceites florales de dos miembros de la familia Sterculiaceae del género *Theobroma*, específicamente de *T. simiarum* Donn. Smith y *T. cacao* Linnaeus para determinar su capacidad para atraer los dípteros que efectúan la polinización del cacao. Este estudio se hizo durante el tiempo seco y la temporada de lluvias. Las Cecidomyiidae mostraron un poco más de atracción hacia las tres sustancias "terpenoid" que se probaron: "geraniol" "linalool" y "limonene" en preferencia a los hidrocarburos. En cambio las Ceratopogonidae, los dípteros que efectúan la mayor parte de la polinización de *T. cacao*, mostraron mucho menos atracción a los dos grupos de constituyentes volátiles que las Cecidomyiidae. Las observaciones registradas en la Finca Experimental La Lola denotan la atracción de las Cecidomyiidae a las flores de *T. simiarum* y de *T. cacao* y la preferencia de las Ceratopogonidae para las flores de *T. cacao*. Estos datos son preliminares, sin embargo parecen indicar que tanto las sustancias "terpenoid" como los hidrocarburos atraen los dípteros Ceratopogonidae y Cecidomyiidae que efectúan la polinización del cacao.

<sup>1</sup> Received for publication 3 December 1989

This research was funded by grants from the American Cocoa Research Institute of The Chocolate Manufacturers of America. I am especially grateful to Drs. Raymond J. Gagne and Willis W. Wirth (Systematic Entomology Laboratory, U.S.D.A., U.S. National Museum) for determinations of the midges. Drs. Barbara and Eric Erickson provided helpful input on the design of field bioassays. Dr. W. Mark Whitten (Florida State Museum) kindly assisted with the data collection during February 1988. My special

thanks to the wonderful residents of La Lola for their hospitality, and to the cacao staff at CATIE, especially Drs. José Galindo and Victor Villalobos for allowing these studies to be conducted at La Lola. I am very grateful to Vivian Corres and Marquerite Pesek, both of the Milwaukee Public Museum, for translating the abstract into Spanish and typing the manuscript, respectively.

\* Invertebrate Zoology Section, Milwaukee Public Museum, Milwaukee, Wisconsin, 53233, USA.

## INTRODUCTION

The steam-distilled floral fragrance oils from various species of *Theobroma* (Sterculiaceae), including *T. cacao* L or "cocoa," contain major volatile constituents undoubtedly involved in the attraction of midge floral visitors and pollinators since the whole steam-distilled fragrances attract these insects (1, 3, 5, 6, 7, 9). In this paper I report field bioassays of major volatile constituents of *Theobroma* species as studied in an abandoned cocoa plantation in Costa Rica. These data suggest that certain volatile substances are more effective as field attractants for midges than others.

## MATERIALS AND METHODS

All bioassays were conducted in the Barker Cacao Forest, an abandoned patch of Matina variety cacao bordering "Finca Experimental La Lola" Madre de Dios, near Siquirres, Limon Province, Costa Rica. This habitat and the bioassay technique (Fig. 1) used are described elsewhere (5, 7, 8, 9). In the present study, two successive bioassays of commercially-available hydrocarbon and terpenoid compounds (Sigma Chemical Company<sup>r</sup>) were conducted between February 11-20, 1988. A third bioassay was conducted June 10-13, 1988. The design of the first two bioassays was as follows: four compounds tested  $\times$  four serial dilutions (1,000, 100, 10, 1 ppm)  $\times$  one replicate each, making up sixteen experimental treatments. Additionally, four "blanks" or controls were used for each bioassay. The third bioassay consisted of testing two compounds (1-pentadecene, limonene) at two serial dilutions (100, 10 ppm) with four replicate traps of each (16 experimental traps), and six blanks. Compounds tested in the first bioassay were: n-pentadecane, 1-pentadecene, geraniol, and linalool; in the second bioassay: citral, citronellol, d-limonene, and tricosane. The choice of these compounds was based upon previous analyses of the major volatile constituents of floral fragrance oils steam-distilled from *T. cacao*, *T. simiarum* Donn. Smith and *T. mammosum* Cuatr. & Leon (1). Based upon this information, these bioassays were designed to determine whether or not these compounds, tested singly in water-filled McPhail traps, using standard dilutions (1), would attract cecidomyiid and ceratopogonid midges and which, if any, of the substances is most effective as an attractant for these insects. The results of the first two bioassays determined the design of the third one, since the last focused on two compounds suspected of being effective attractants, based upon previous results.

As in previous bioassays (5, 7, 8, 9), traps were emptied each morning for several successive days, and

the contents poured through coffee filters to collect trapped insects (Fig. 1). This insect material was then sorted and preserved in 70% ethanol for further taxonomic identifications. As a standard practice, data on flowering was recorded for the cacao trees used for the traps.

## RESULTS

During February of 1988, a time of reduced flowering in the Matina cacao compared to June of the same year (Table 1), Cecidomyiidae trapped using fragrance compounds were about five times as abundant as Ceratopogonidae (Tables 2, 3). About



Fig. 1 Testing volatile constituents of cacao floral fragrance in the field. From top to bottom: Barker Cacao Forest where bioassays were conducted; McPhail trap used for testing the attractiveness of volatiles to pollinating midges; method for collecting midges from McPhail Traps by pouring trap contents through filter papers and placing trapped insects into vials.

Table 1. Patterns of floral abundance on trees of *Theobroma cacao* L. (Sterculiaceae), Matina Variety, in The Baker Cacao Forest at Finca Experimental La Lola, near Madre de Dios, Limon Province Costa Rica during separate bioassay studies of floral fragrance oils\*.

Date	Total	Floral Buds			Total	Open Flowers		
		X S.E.		Range		X S.E.		Range
14 Feb 1988	28	1.75	0.89	0-10	2	0.12	0.08	0-1
12 June 1988	1,774	98.55	27.10	0-387	319	17.72	4.71	0-65

\* A total of 20 cacao trees. The trees are tagged so that the same trees are used for every census. For each bioassay of floral fragrance oils, all but two of the McPhail traps were suspended in these tagged trees.

57% of the Cecidomyiidae trapped in two successive bioassays conducted in February, the dry season, were attracted to terpenoid fragrance compounds, especially geraniol and linalool, and about 41% were attracted to the hydrocarbons pentadecane and pentadecene (Table 2). In spite of their very low numbers, almost twice as many ceratopogonids were attracted to terpenoids than to hydrocarbons in the same bioassays (Table 3). Attraction of Cecidomyiidae to a terpenoid, limonene, relative to pentadecene, was very high in the wet season study (Table 4). Few if any midges were found in the "blanks" or control traps, indicating a definite attraction of midges to the

attractant-inoculated traps (Tables 2, 3). While the overall sex ratio for the three most abundant species of Cecidomyiidae in the February bioassays was skewed to about 60% towards females, the species with the greatest likelihood of being a cacao pollinator, *Mycodiplosis ligulata* Gagne, was 100% female in the attractant-baited traps (Table 5). All ceratopogonids trapped in the February bioassays were females.

## DISCUSSION

Young *et al.* (5, 7, 8, 9) demonstrated that low numbers of Cecidomyiidae and Ceratopogonidae are

Table 2. Patterns of specific attractiveness for various species of Cecidomyiidae (Diptera) attracted to volatile compounds identified as major constituents of floral fragrance oils from *Theobroma* species\*.

Midge species	Total numbers of midges in scented McPhail traps:									
	pentadecane	pentadecene	geraniol	linalool	citral	citronellol	limonene	tricosane	blanks	total
<i>Mycodiplosis ligulata</i> Gagne	6	4	3	1	3	2	2	1	0	22
<i>Aphodiplosis triangularis</i> (Felt)	1	9	2	4	0	0	0	0	0	16
<i>Ledomyia</i> sp.	1	2	2	1	1	5	1	1	0	14
<i>Clinodiplosis</i> sp.	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>Mycodiplosis</i> sp	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
<i>Trisopsis</i> sp.	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
<i>Lestodiplosis</i> sp	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
<i>Stromatosema</i> sp	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
Lestremiinae	0	0	1	0	0	0	0	0	1	2
poss <i>Resseliella</i> sp.	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
Cecidomyiidae (undet.)	1	1	0	1	0	0	0	0	0	3
Total	10	16	11	8	4	7	3	2	2	63

\* Bioassays conducted in the Barker Cacao Forest at Finca Experimental La Lola, Madre de Dios, Limon Province, Costa Rica, February 1988

Various other groups of Diptera, represented by 1-2 individuals, include: Culicidae, Sciaridae (*Bradysia* spp.), Chironomidae, Dolichopodidae (*Sciapus* spp., *Chrysotus* spp.)

Table 3. Patterns of specific attractiveness for various species of Ceratopogonidae (Diptera) attracted to volatile compounds identified as major constituents of floral fragrance oils from *Theobroma* species.

Midge species	Total numbers of midges in scented McPhail traps:									
	pentadecane	pentadecene	geraniol	linalool	citral	citronellol	limonene	tricosane	blanks	total
<i>Forcipomyia cinctipes</i> group	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>F. (Warmkeia) louriei</i> (Macfie)	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
<i>F. (Rhyphoforcipomyia) brachyrhynchus</i> Wirth & Waugh	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
<i>F. (Thyridomyia) spp</i>	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
<i>Dasyhelea mutabilis</i> group	0	1	0	0	0	0	0	1	0	2
<i>D. borgmeieri</i> Wirth & Waugh	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
<i>D. grisea</i> group	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>Dasyhelea</i> spp.	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
undet genus & species	0	0	0	0	0	0	0	2	0	2
Totals	2	2	0	0	1	0	1	5	0	11

routinely attracted to steam-distilled floral fragrance oils at various concentrations in the Barker Cacao Forest at La Lola. The observed abundance levels in the present study, using synthetic analogs of major identified volatile substances (as revealed by gas chromatography and mass spectrometry (1)) as attractants in McPhail Traps, are very similar to numbers of midges trapped using the fragrance oil extracts. This is to say that some of the individual substances used, such as pentadecene, pentadecane, limonene and linalool, are individually as effective in attracting cacao-pollinating midges as the whole floral extracts. While terpenoid substances are more typical of floral fragrance oils from *T. simiarum* Donn Smith and *T. speciosum* Wild., and hydrocarbons more characteristic of *T. cacao* L. and *T. mammosum* Cuatr. & Leon (1), both sets of volatiles function in the attraction of Cecidomyiidae and Ceratopogonidae, as revealed by the present study. Both pentadecene and pentadecane were observed to attract various Diptera in La Lola in a previous study using Pherocon IC traps rather than McPhail traps (8).

Field observations in La Lola indicate that Cecidomyiidae are floral visitors to *T. simiarum*, while Ceratopogonidae are much less abundant at the flowers of

this species. Yet both groups of Diptera are attracted to the flowers of *T. cacao*. The role of some species

Table 4. Patterns of specific attractiveness for various species of Cecidomyiidae (Diptera) attracted to pentadecene and limonene, two major volatiles found in *Theobroma* floral fragrance oils\*.

Midge species	Number of midges in traps:		
	pentadecene	limonene	total
<i>Mycodioplosis ligulata</i> Gagne	1	9	10
<i>Aphodiplosis triangularis</i> (Felt)	0	7	7
<i>Lestodiplosis</i> spp (sensu lato)	1	0	1
Cecidomyiidi (undet.)	1	0	1
Totals	3	16	19

\* Bioassay conducted in June 1988, early phase of the rainy season at the study locality

All *M. ligulata* trapped were females; four females and three males, respectively, for *A. triangularis*.

of Cecidomyiidae as effective pollinators of cacao requires confirmation through further field studies (2, 4). Furthermore, adult midges of certain species of both Cecidomyiidae and Ceratopogonidae collected from the flowers of *T. cacao* are mostly female (4, 9), suggesting a sex-related differential attraction of these insects to cacao. Midge species attracted to *Theobroma* flowers possess mouthparts adapted for piercing and chewing pollen grains, and female midges may obtain egg-building nitrogenous substances from pollen. The data presented here suggest that while both hydrocarbon and terpenoid substances in *Theobroma* floral fragrance oils undoubtedly play a role in attracting pollinating midges, subtle-to-considerable differences in the relative amounts of these two sets of volatile substances, as reported in Erickson *et al.* (1), may determine whether Ceratopogonidae, Cecidomyiidae, or other Diptera (such as Phoridae) are the principal floral visitors and pollinators of a particular species of this genus.

Table 5. Sex ratio patterns for midges (Diptera: Cecidomyiidae) attracted to volatile compounds of *Theobroma* floral fragrance oils.\*

Midge species	Number of midges in traps:		
	female	male	total
<i>Mycodiplosis ligulata</i> Gagne	22	0	22
<i>Aphodiplosis triangularis</i> (Felt)	4	12	16
<i>Ledomyia</i> spp.	5	9	14
Totals	31	21	52

\* All but three individuals of the 11 Ceratopogonidae trapped in the bioassays were females

#### LITERATURE CITED

1. ERICKSON, B.J.; YOUNG, A.M.; STRAND, M.E.; ERICKSON JUNIOR, R.H. 1987. Pollination biology of *Theobroma* and *Herrania* (Sterculiaceae) II. Analyses of floral oils. Insect Science and its Application 8:301-310
2. IBRAHIM, A.G.; HUSSEIN, A.M. 1987. Role of insects in the pollination of cocoa flowers. Pertanika 10:103-106
3. STRAND, M.E. 1984. Comparative floral morphology of four *Theobroma* (Sterculiaceae) species in relation to pollination biology. Master's Dissertation, University of Wisconsin, Milwaukee. 78 p
4. YOUNG, A.M. 1985. Studies of cecidomyiid midges (Diptera: Cecidomyiidae) as cocoa pollinators (*Theobroma cacao* L.) in Central America. Proceedings of the Entomological Society of Washington 87:49-79.
5. YOUNG, A.M. 1989. Comparative attractiveness of floral fragrance oils of "Rim" and "Catongo" cultivars of cacao (*Theobroma cacao* L.) to Diptera in a Costa Rican cacao plantation. Turrialba 39:137-142.
6. YOUNG, A.M.; ERICKSON JUNIOR, E.H.; STRAND, M.E.; ERICKSON, B.J. 1987. Pollination biology of *Theobroma* and *Herrania* (Sterculiaceae). I. Floral biology. Insect Science and its Application 8:151-164.
7. YOUNG, A.M.; ERICKSON, B.J.; ERICKSON JUNIOR, E.H. 1987. Steam-distilled floral oils of *Theobroma* species (Sterculiaceae) as attractants to flying insects during dry and wet seasons in a Costa Rican cocoa plantation. Proceedings 10th International Cocoa Research Conference, Santo Domingo, D.R. 10:289-296.
8. YOUNG, A.M.; ERICKSON JUNIOR, E.H. 1987. A trap survey of flying insects in "Finca Experimental La Lola" in Costa Rica. Turrialba 37:337-356.
9. YOUNG, A.M., ERICKSON, B.J.; ERICKSON JUNIOR, E.H. 1989. Pollination biology of *Theobroma* and *Herrania* (Sterculiaceae). III. Steam-distilled floral oils of *Theobroma* species as attractants to flying insects in a Costa Rican cocoa plantation. Insect Science and its Application 10:93-98

# La Primera Aparición de la “Escoba de Bruja” en la Principal Área Productora de Cacao del Brasil<sup>1</sup>

J.L. Pereira\*, A. Ram\*, J.M. Figueiredo\*, L.C. de Almeida\*

## ABSTRACT

Cacao was first introduced into the state of Bahia from the Amazon region in 1746, where today 84.5% of Brazilian cacao is growing. The pathogen of cacao, *Crinipellis perniciosa* (Stahel) Singer, although responsible for severe losses in all cacao producing countries of South America, was absent in this region of Brazil. This is the first record of the occurrence of witches' broom disease in Bahia, the second largest concentration of cacao in the world.

## COMPENDIO

El cacao fue introducido en el estado de Bahía en 1746, proveniente de la región amazónica. Bahía es actualmente la región donde está sembrado el 84.5% del total del cacao brasileño. El patógeno *C. perniciosa*, responsable por severas pérdidas en todos los países sudamericanos productores de cacao, estuvo ausente en esta región hasta recientemente. Esta es la primera vez que se reporta la aparición de la “Escoba de Bruja” en Bahía, área que cuenta con la segunda mayor concentración de cacao en el mundo.

## INTRODUCCION

**L**a principal región productora de cacao (*Theobroma cacao* L.) en Brasil está ubicada en la parte suroeste del estado de Bahía. Geográficamente, esta zona está a 2 000 m de la región amazónica de donde el cacao es nativo, así como su principal patógeno: *Crinipellis perniciosa* (Stahel) Singer. Este patógeno evolucionó conjuntamente con el cacao y es el agente causal de la “Escoba de Bruja” (3). Por lo tanto, la “Escoba de Bruja” ha sido siempre una seria amenaza a la región cacaotera bahiana (5, 6) que produce el 84.5% del cacao brasileño, introducido en la región en 1746.

La primera descripción que se obtuvo de la “Escoba de Bruja” proviene de Went (8); el hongo fue descrito por Stahel (7) en Suriname, basado en sus observaciones iniciales. Desde entonces se ha podido observar una disminución severa en la producción de cacao, no tanto en Suriname como en Bolivia, Colombia, Ecuador, Grenada, Guyana, Perú, Trinidad y Venezuela. La presencia de la enfermedad en la región amazónica de Brasil ha sido causa de preocupación por muchos años.

En 1978, la Comisión Ejecutiva de Planificación del Cultivo del Cacao (CEPLAC) y el Ministerio de Agricultura, de Brasil, establecieron una faja fitosanitaria, con puestos estratégicamente situados en las principales vías y aeropuertos que conducen al estado de Bahía. En adición, otras medidas preventivas fueron puestas en práctica incluyendo información para el público sobre los síntomas de la enfermedad y los peligros relacionados con la introducción de plantas contaminadas. *Theobroma cacao* y *T. grandiflora* (Wild ex Spreng) Schum, también susceptibles a *C. perniciosa*, han sido interceptados a intervalos regulares en puestos de inspección. Sin duda, esta campaña resultó efectiva, ya que el material vegetal incautado e incinerado disminuyó entre 1980 y 1986 de 3147 a 103 toneladas, respectivamente.

## El brote de la “Escoba de Bruja”

El 22 de mayo de 1989, los autores recibieron del personal de extensión agrícola material vegetal deformado para un examen de rutina. Las ramas presentaban una proliferación anormal de yemas, hipertrofia y la formación de ramas jóvenes groseramente hinchadas, características normalmente asociadas a la “Escoba de Bruja”. Al siguiente día, fue recolectado más material en la misma área. El área está ubicada en la Hacienda Conjunto Santana, de aproximadamente 162 ha de cacao, cerca de una villa llamada Banco Central en el Municipio de Urucuca. Se constató nuevamente que los síntomas correspondían a los de la “Escoba de Bruja”. El día 24 de mayo de 1989, después de una nueva búsqueda, unos basidiocarpos fueron encontrados en escobas viejas, confirmando la

1 Recibido para publicación el 6 de diciembre 1989.  
Agradecemos a A.E.S. Magno, asesor técnico del Departamento de Extensión, y a los miembros de la Agencia de Extensión de Urucuca por haber traído a nuestra atención el material original infectado.

\* Fitopatólogos del Centro de Pesquisas do Cacau, CEPEC-CEPLAC, Caixa Postal 7, 45600 Itabuna, Bahía, Brasil.

presencia de *C. perniciosa*. Luego se pudo observar en el campo frutos partenocápicos o chirimoyas (S.E.A. Fonseca, comunicación personal). En el laboratorio, el aislamiento del hongo de un material proveniente de escobas verdes y escobas secas, produjo micelio sa- profítico del patógeno. Con esto, y basado en las evi- dencias anteriormente obtenidas, la presencia del pa- tógeno fue establecida.

Con nuevas inspecciones en el lugar de infección, centenares de escobas fueron encontradas. Las escobas enviadas a los fitopatólogos del Departamento Especial de Amazonia, en Belem do Para, que forma tam- bién parte de CEPLAC, produjeron basidiocarpos des- pués de un mes de incubación. Ramas de cacao inocu- ladas con los esporos de estos basidiocarpos produje- ron escobas (Cleber Bastos Novaes, comunicación per- sonal). La severidad de la enfermedad variaba hasta un máximo de 15 escobas por árbol, en árboles de cacao Forastero tipo común de 30 a 40 años de edad. Actualmente, la extensión de la "Escoba de Bruja" en Bahía parece estar limitada a esta hacienda en una área de 12 ha en la que 112 árboles presentaron esco- bas. Sin embargo, continúan las inspecciones en el campo y se está capacitando personal para reconocer los síntomas de la enfermedad.

Esta es la primera vez que se reporta la aparición de la "Escoba de Bruja" en Bahía, la región con la se- gunda concentración de cacao en el mundo y que por más de 100 años ha sido el área tradicional de cultivo de cacao en Brasil.

#### Possible origen de la introducción

La presencia de *C. perniciosa* en el estado de Bahía no puede ser atribuida a la diseminación por agentes naturales como el viento recientemente examinado por Aragundi *et al.* (2). Los resultados de esos autores mostraron que existen diversos grados de infección.

En la fuente de *C. perniciosa* ellos encontraron 56% de esporos, disminuyendo hasta 8% a 285 m. Por otro lado, la viabilidad de los basidiosporos en el aire es limitada a algunas horas (4). Por lo tanto, el cultivo continuo de cacao y huéspedes alternativos son necesarios para que el patógeno sea diseminado por el viento. Este no es el caso, ya que más de 2 000 km separan el estado de Bahía de la región amazónica.

Por consiguiente, otros procesos de diseminación necesitan ser examinados. Andebrhan (1) mostró la importancia de la diseminación del patógeno por el agua, sin embargo, limitada al follaje. En consecuen- cia, esto abre las posibilidades de que la introducción del patógeno en Bahía haya sido realizada por el hombre. Recientemente, el cacao ha sido considerado un cultivo idóneo e importante para el desarrollo eco- nómico de la región amazónica. Con la expansión de las regiones cacaoteras, comenzó una movilización de personal de zonas tradicionales hacia nuevas áreas. En las pocas ocasiones en que, por curiosidad o por pura ignorancia, productores de cacao con intereses en Amazonas trajeron escobas para esta región, éstas fue- ron confiscadas cuando se las encontraban. Ello indica que un material infectado, descuidado o criminal- mente introducido en la zona, puede haber provocado esta situación epidémica que tiene el potencial de convertirse en una catástrofe.

#### El programa de erradicación

Una estrategia bien definida fue planificada ante la eventualidad de encontrar una área en la cual el pa- tógeno estuviera establecido. Varias acciones fueron emprendidas entre las cuales están: la erradicación del patógeno, la movilización de personal capacitado en el uso de medidas sanitarias (remoción de escobas), químicas (uso de fungicidas y herbicidas) y quema de plantaciones infectadas.

#### LITERATURA CITADA

- 1 ANDEBRHAN, I. 1988 Rain-water as a factor in the dis- semination of basidiospores of *Crinipellis perniciosa* (Stahel) Singer within cacao trees In Proceedings International Cocoa Research Conference (10, 1987, Santo Domingo, D.R.) p. 367-370
- 2 ARAGUNDI, J.; FRIAS, G.; SOLORIZANO, G.; SCHMIDT, R.; PURDY, L.H. 1988 Estudios sobre gradiente de infección y dispersión de la escoba de bruja del cacao en el Ecuador. In Proceedings Interna- tional Research Conference (10, 1987, Santo Domingo, D.R.) p. 375-380
- 3 BAKER, R.E.D.; HOLLIDAY, P. 1957 Witches' broom disease of cacao (*Marasmus perniciosus* Stahel). Phytopathological Paper no. 2. 42 p.
- 4 BAKER, R.E.D.; CROWDY, S.H. 1943 Studies in the witches' broom disease of cocoa caused by *Marasmus perniciosus* Stahel. Part I Introduction, symptoms and etiology Trinidad Memoir Imperial College of Tropical Agriculture 7. 28 p.
- 5 EVANS, H.C. 1981. Witches' broom disease - a case study. Cocoa Growers' Bulletin no. 32:5-19

6. PEREIRA, J.L. 1987. Cocoa and its pathogens in the region of origin: a continued risk. In Workshop on assessment of plant protection risks for cocoa. Lembang, (Indonesia).
7. STAHEL, G. 1915. *Marasmius perniciosus* nov spec. Bull. Dep. Landb. Suriname 33:1-26.
8. Went, F.A.F.C. 1904. Krulloten en versteende vruchten van de cacao in Suriname. Verhandelingen der K. akademie van wetenschappen Amsterdam. p. 1-40.

## Metodología para Evaluar la Susceptibilidad a Moniliasis en Cultivares de Cacao (*Theobroma cacao*)<sup>1</sup>

J.A. Sánchez\*, L.C. González\*\*

### ABSTRACT

Methodology is described for use in evaluation of susceptibility to moniliasis in cacao (*Theobroma cacao* L.), in Turrialba (22.5°C-87%), Costa Rica, with investigators using fruits representative of varieties R-2, R-8, TSH-792, Diamante-800, UF-701 and CATIE-1000 that ranged in age from two to three months. Inocular solution in concentrations of 0, 10<sup>4</sup>, 10<sup>5</sup>, and 10<sup>6</sup> spores/ml (spores with age of 9 to 15 days) was applied to fruits using a DeVilbiss Sprayer Model No. 15, as well as with cotton swabtype applicators. Subsequent to inoculation, cacao fruits were protected in clear plastic bags perforated for respiration. Data collection began after 24 days, with readings taken on a weekly basis thereafter until fruits reached maturity or until onset of sporulation. External damage was rated on a scale of 1 to 10, while a scale of 0 to 5 was employed to rate the percentage of internal tissue damage. It was determined that a critical point in damage to the fruit occurs between weeks eight and nine, allowing determination ( $r = 0.96$ ) of possible susceptibility to moniliasis in a single reading. Best results were obtained using those fruits inoculated at 60 days using a spray-applied inoculum in concentration of 10<sup>5</sup> spores/ml.

### INTRODUCCION

**L**a moniliasis del cacao causada por el hongo *Moniliophthora roreri* (Cif. y Par.) Evans hizo su aparición en Ecuador en 1916; posteriormente se extendió a Colombia donde causa pérdidas hasta el 40% en promedio (2). También, se encuentra

<sup>1</sup> Recibido para publicación el 20 de diciembre de 1988

\* Programa de Plantas Perennes, CATIE, Turrialba, Costa Rica. Dirección Actual: Fundación Hondureña de Investigación Agrícola, FHIA, Apartado Postal 2067, San Pedro Sula, Honduras, C.A.

\*\* Laboratorio de Fitopatología, Facultad de Agronomía, UCR, San Pedro de Montes de Oca, Costa Rica.

### COMPENDIO

En Turrialba (22.5°C - 87%), Costa Rica, se desarrolló una metodología para evaluar la susceptibilidad de cultivares de cacao a la moniliasis (*Moniliophthora roreri*). En el estudio, se emplearon frutos de dos a tres meses de edad, de los cultivares R-2, R-8, TSH-792, Diamante-800, UF-701, y CATIE-1000. Se evaluaron las concentraciones de 0, 10<sup>4</sup>, 10<sup>5</sup> y 10<sup>6</sup> conidios/ml, los cuales tenían de nueve a 15 días de edad. Se aplicó el inóculo por medio de un atomizador DeVilbiss No. 15 y también, por medio de un pedazo de algodón que se sumergió en la suspensión. Los frutos se cubrieron con una bolsa plástica transparente y perforada en su base. Se inició la toma de los datos a los 24 días y se continuaron las lecturas, una vez por semana, hasta la cosecha o esporulación. Para calificar la severidad externa se empleó una escala de 0 a 10, según fue el tipo de síntoma; para la interna, según el porcentaje de tejido interno dañado; para este caso, se empleó una escala de 0 a 5. Con base en los resultados obtenidos, la concentración de 10<sup>5</sup>, cuando se utilizó el método de la aspersión sobre frutos de 60 días, permitió detectar diferencias de susceptibilidad entre los cultivares. Se estableció que las severidades registradas entre la 8 y 9a semanas produjeron un 'punto crítico' suficiente para estimar, como única lectura, los posibles resultados ( $r = 0.96$ ).

en parte de Venezuela y Panamá (1, 2). A fines de 1978, la enfermedad se encontró en Costa Rica y en menos de dos años se extendió a todas las plantaciones de la Costa Atlántica y actualmente se encuentra en plantaciones del Pacífico Sur y del Norte, en límites con Nicaragua. Para el año 1980, la enfermedad causó bajas en la producción de Costa Rica aproximadamente en un 60%. Así, la moniliasis se ha constituido en una seria amenaza para América Central en donde existen cerca de 32 430 hectáreas de cacao(8)

La enfermedad puede atacar en cualquier estado del desarrollo del fruto pero éstos son más susceptibles en los primeros estados (1, 14). La sintomatolo-

gia varía con la edad y así, en frutos hasta de tres meses, se presentan deformaciones o especies de "jibas" acompañadas de una decoloración de aspecto brillante. Estos frutos no llegan a su completo desarrollo y al momificarse permanecen adheridos al árbol (2) y algunos llegan a desarrollar estromas y esporulación abundante. En frutos "adultos" (más de tres meses), aparecen especies de "puntos aceitosos" o hidrosos que coalescen con mayor o menor rapidez dependiendo de la concentración de los mismos y de la susceptibilidad del cultivar. Al coalecer, estos puntos originan manchas pardas o de color chocolate, de borde difuso al principio pero cuando la mancha envejece, aparecen los bordes bien definidos. Más tarde, se observa sobre esta mancha un estroma blanco que pronto se torna color crema cuando empiezan a formarse los conidios (2). A veces, aparecen frutos que aparentemente están sanos y muestran sólo madurez desuniforme contrastando áreas verdes con otras maduras; al cosechar estos frutos sólo pueden distinguirse de los sanos porque generalmente son más pesados que los normales; al partirlos puede verse la infección interna y casi siempre presentan una consistencia acuosa o hidrosa, con almendras no bien formadas o si se han formado, serán inservibles por la infección (2).

El combate de la enfermedad ha sido más eficiente y económico por remoción de frutos enfermos y otras prácticas culturales (7, 9); en cambio, los resultados con productos químicos no han sido consistentes y la mayoría de las veces resultan antieconómicos (4, 11). La posibilidad de encontrar resistencia, como otra medida de combate, ha sido poco estudiada aunque ya desde 1918 Rorer (12), sugería esta posibilidad al observar que el cacao Nacional era menos susceptible que la variedad Venezuela. Sin embargo, no se adelantaron trabajos al respecto hasta la década del 60, cuando en Ecuador empezaron a llevar registros de producción y de infección natural, para determinar si algunos materiales eran menos infectados que otros (3). Se encontraron algunos cultivares promisorios pero su comportamiento no fue el mismo cuando se les plantaba en otras áreas en donde las condiciones ambientales eran más favorables al desarrollo de la enfermedad y la presión del inóculo era mayor (3). Aunque los resultados no fueron consistentes, si sugerían posibles diferencias en la susceptibilidad de algunos cultivares. En 1965, Sotomayor (13) realizó en Ecuador un estudio con inoculación artificial tratando de encontrar alguna resistencia en varios cultivares. Para ello, inoculó por aspersión frutos de 80 días con una suspensión de conidios a 7 a 12 días de edad y a una concentración de  $35 \times 10^6$  conidios/ml, aproximadamente. Teniendo en cuenta sólo el porcentaje de frutos enfermos (incidencia), no encontró diferencias y lo atribuyó a la alta concentración del inóculo.

También, con la metodología utilizada por Sotomayor (13) pero con una concentración de  $25 \times 10^4$  conidios/ml, Rodríguez y Suárez (11) probaron cultivares en Pichilingue, Ecuador. Tampoco encontraron diferencias en los materiales inoculados pues el parámetro medido fue la incidencia (%) y éste fue alto en la mayoría de los casos. Estos autores (11) consideraron que la concentración utilizada aún podía ser alta y que a esto se debió los altos porcentajes de infección. Sin embargo, anotan que, en varios cultivares, más del 30% de los frutos inoculados no se infectaron y destacan el 'EET-233' con sólo 16% de frutos enfermos, los que no se descompusieron como en otros cultivares.

En sus estudios para la calibración de un método de inoculación con *Monilia*, Merchán y Restrepo (10) utilizaron la cantidad de conidios secos adheridos a las siguientes longitudes de un alfiler entomológico: 2 cm, 1 cm, 0.5 cm y la punta del mismo. Según los mismos autores (10), estas longitudes llevan adheridos aproximadamente  $546 \times 10^3$ ,  $273 \times 10^3$ ,  $103 \times 10^3$  y  $36 \times 10^3$  conidios, respectivamente. Este inóculo lo aplicaron liberándolo sobre un surco del fruto mediante aspersión de agua destilada con un atomizador manual DeVilbiss y redistribuyendo, a lo largo del surco, las gotas que se forman en el ápice del fruto. En todos los casos, obtuvieron altos porcentajes de infección y las dosis más altas llevaron a una pérdida total de las almendras.

Evans (6), para probar la viabilidad de esporas de *Monilia*, inoculó frutos de 30 a 40 días de edad utilizando una mota de algodón sumergida en una suspensión de esporas y obtuvo un 92% de incidencia. Según Cronshaw, citado por Evans (6), concentraciones de inóculo (muy bajas: 10 conidios/mazorca) producían sólo una infección leve; 100 conidios/mazorca infectaban hasta un 60% y concentraciones mayores ( $> 100$ ) afectaban todas las mazorcas con presencia de deformación en las mismas. Resalta este autor la necesidad de realizar más estudios para establecer si la expresión de síntomas y la invasión del tejido por el hongo (severidad) están relacionados con la concentración de inóculo y que este factor es más importante si se quiere probar resistencia al patógeno.

Enríquez, Salazar y Paredes (5), en Costa Rica, al tratar de reproducir los síntomas de la enfermedad, inocularon frutos de distinta edad inyectando una suspensión de conidios de concentración no determinada. A los 16 días después de la inoculación, algunos frutos presentaban signos de la enfermedad.

Como se observa, en los pocos trabajos que se han realizado con infección natural y artificial, se ha tenido en cuenta sólo la incidencia de frutos infectados.

Aunque todos los cultivares pueden presentar altos porcentajes de infección, el grado de descomposición de los frutos y la rapidez en el desarrollo de la enfermedad son parámetros muy importantes cuando se quieren evaluar diferencias de susceptibilidad entre materiales. Este factor no se ha considerado en los trabajos realizados hasta ahora, aunque Rodríguez y Suárez (11) sí observaron que la descomposición de los frutos infectados era menor en algunos cultivares.

No existe en la literatura referencia a una metodología claramente establecida que permita cuantificar diferencias de susceptibilidad a moniliasis. Esto llevó a la realización del presente estudio, con el objetivo principal de establecer una metodología que, teniendo en cuenta severidad e incidencia, permita detectar diferencias de susceptibilidad a la moniliasis entre cultivares de cacao inoculados artificialmente.

#### MATERIALES Y METODOS

##### Localización del área de estudio

El estudio se realizó en la colección de cacao del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza, CATIE, en Turrialba, Costa Rica. Turrialba está a 600 msnm; tiene una temperatura promedio anual de 22.5°C, una precipitación promedio anual de 2 600 mm y la humedad relativa promedio es de 87%. (Datos de la Estación Meteorológica del CATIE). La zona corresponde a un bosque muy húmedo tropical pre-montano.

##### Prueba de métodos de inoculación y concentración del inóculo

Esta prueba se realizó en frutos de dos a tres meses de edad aproximadamente, en los cultivares 'R-2', 'R-8', 'TSH-792', Diamante-800', 'UF-701' y 'CATIE-1000'. La mitad del número de frutos disponibles en cada cultivar se dividió en cuatro grupos que fueron asperjados, cada uno, con las siguientes concentraciones de inóculo: 0,  $10^4$ ,  $10^5$  y  $10^6$  conidios/ml por medio de un atomizador DeVilbiss No. 15. Las aspersiones se hicieron una vez cubiertos los frutos con bolsa plástica. Esta bolsa fue perforada en sus esquinas inferiores por donde se introdujo el conducto de salida del atomizador. Luego, se bombeó el sifón en forma manual por cinco veces, tratando que la suspensión llegara lo más uniformemente posible a toda la superficie del fruto. La otra mitad de frutos de cada cultivar fue repartida también en cuatro grupos que recibieron las mismas cuatro concentraciones de inóculo (0,  $10^3$ ,  $10^4$  y  $10^6$  conidios/ml). Esta vez, la inoculación se hizo por medio de un pedazo de algodón sumergido en la suspensión y aplicado con ayuda

de pinzas sobre uno de los surcos en la parte media superior del fruto donde quedó adherido. Luego, se colocó a cada fruto una bolsa plástica protectora perforada en las esquinas.

Para la suspensión, se utilizaron conidios de 9 a 15 días de edad en agua destilada más Tween-80 al 0.01% como dispersante para evitar formación de grumos o grupos de conidios. El inóculo se tomó de aislamiento puro en ADA (agar 1.5%, dextrosa 2.0% y hojuelas de avena 5%). Se comenzó a tomar información a los 24 días y se continuaron las lecturas una vez por semana. Los frutos se cosecharon cuando presentaron esporulación o mostraron madurez normal o prematura, debido a la enfermedad.

##### Calificación de severidad externa e interna para medir diferencias de susceptibilidad

Al evaluar susceptibilidad es muy importante conocer, además de la incidencia, el grado de severidad con que se presenta la enfermedad. Teniendo en cuenta este factor, se procedió a inocular distintos cultivares de la colección. La inoculación se hizo por aspersión con el DeVilbiss, como se indicó en la prueba de métodos de inoculación. Se usó una concentración de  $10^5$  conidios/ml. Los frutos eran de 60 días y provenían de polinización manual; éstos se dividieron en cuatro grupos o repeticiones que se inocularon entre las 7:30 y 10:30 am y 1:00 y 3:00 pm en dos días consecutivos (2 repeticiones por día). La suspensión se preparó momentos antes de iniciar las inoculaciones y se utilizaron conidios que tenían entre 9 y 15 días de edad y agua destilada más Tween-80 al 0.01%. Los cultivares en estudio se dividieron en tres etapas debido a la falta de floración uniforme entre los mismos, que permitiera hacer las polinizaciones para todos dentro de una misma época. (Con cada etapa, se inoculó también el cultivar 'Catongo' para tomarlo como testigo entre las mismas).

A las cinco semanas después de la inoculación, se iniciaron lecturas sobre el desarrollo externo de la enfermedad (severidad) y se continuaron una vez por semana hasta la 15ava. Para estas lecturas se usó una escala de valores de 0 a 10 que calificó las distintas combinaciones de síntomas que suelen presentarse y el avance semanal de la enfermedad en cada fruto infectado.

El grado de severidad externo, correspondiente a cada valor de la escala, se detalla a continuación:

0: Ningún síntoma aparente

1: Pequeños y pocos puntos aceitosos o ligera deformación (PPA, d)

- 2: Puntos aceitosos bien definidos y abundantes, deformación pronunciada, madurez irregular debida a la enfermedad (PA, D.M.)
- 3: Puntos aceitosos bien definidos y abundantes, más deformación pronunciada, madurez irregular, ligeramente agrietamiento (Síntoma hasta ahora no registrado en la literatura) a lo largo de uno de los surcos del fruto (PA + M.R.)
- 4: Mancha hasta de 3 cm de diámetro, sola o acompañada de madurez irregular o deformación pronunciada, agrietamiento pronunciado a lo largo del fruto (Mn<sup>-</sup>, mn<sup>-</sup>, mn<sup>-</sup> + M, mn<sup>-</sup> + D, R.)
- 5: Mancha de más de 3 cm de diámetro pero sin cubrir más de 2/3 del fruto y acompañada o no de madurez debido a la enfermedad (mn<sup>+</sup>, mn<sup>+</sup> + M)
- 6: Mancha hasta cubrir 2/3 del fruto, con presencia de micelio (estroma) o también la sola mancha o necrosis desde 2/3 del fruto hasta cubrir toda la superficie del mismo (mn<sup>+</sup> + mi, mnT).
- 7: Mancha desde 2/3 del fruto hasta cubrirlo totalmente más micelio; mancha hasta 3 cm de diámetro más esporulación en la misma, pero, en poco grado (mnT + mi, mn<sup>-</sup> + E<sup>-</sup>)
- 8: Mancha desde 2/3 hasta cubrir toda la superficie del fruto más esporulación en poco grado; mancha desde 2 cm de diámetro hasta aproximadamente la mitad del fruto con esporulación más bien abundante hasta la mitad de la misma (mnT + E<sup>-</sup>, mn + E).
- 9: Mancha desde 2/3 hasta cubrir todo el fruto más esporulación hasta la mitad de la mancha o también mancha hasta 2/3 del fruto más esporulación.
- 10: Mancha total más esporulación abundante que cubre toda el área necrosada, además de madurez pronunciada por la enfermedad (mnT + E<sup>+</sup>, mnT<sup>+</sup> + M).

En la Fig. 1 se ilustran gráficamente los valores de la escala utilizada

Los frutos se cosecharon cuando presentaban esporulación, avanzado estado de descomposición o cuando mostraban madurez debido o no a la enfermedad. Inmediatamente, se partían para calificar el grado de necrosis interna con base en una escala de 0 a 5. Así, se obtuvo una calificación interna promedio para cada cultivar. Para esto, se tuvo en cuenta sólo los frutos que presentaban también síntomas externos (hubo frutos con síntomas externos y sin síntomas internos pero lo inverso no ocurrió)

El desarrollo de la enfermedad puede variar de una etapa a otra como consecuencia de variaciones en las condiciones ambientales y posiblemente, del mismo inoculo. Para poder hacer comparaciones entre los cultivares inoculados en las distintas etapas, se corrigieron, una a una, todas las repeticiones en cada cultivar. Para esto, los valores promedios semanales en cada repetición se multiplicaron por un factor de

corrección obtenido con base en el promedio de las dos etapas más severas del cultivar 'Catongo'. Ello se hizo con las etapas más severas, por considerar que éstas representan mejor lo que sucede en áreas tradicionalmente cacaoteras en donde la enfermedad no tenga limitaciones de tipo ambiental para su normal desarrollo.

Los factores de corrección de severidad externa e interna, para las respectivas repeticiones, se obtuvieron mediante la siguiente ecuación:

$$Fc_i = \frac{PCes}{PCri}$$

Donde  $Fc_i$ : Factor de corrección para la repetición i

PCes: Promedio del control en las etapas más severas

PCri: Promedio del control en la respectiva repetición

#### Análisis estadístico

Para la calificación obtenida por cultivar (promedio de 11 lecturas por fruto, obtenido entre la 5a y la 15a, después de inocular), se hizo un análisis de variancia y la prueba de Duncan.

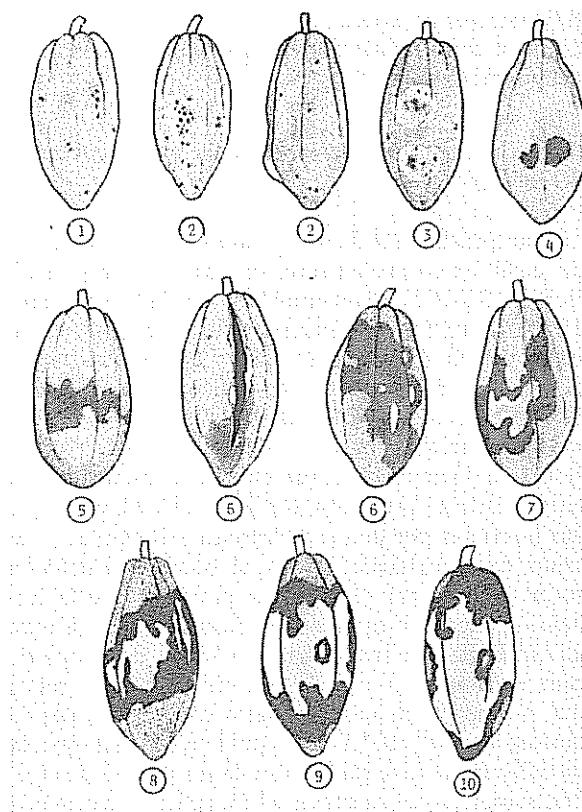


Fig. 1 Escala de severidad externa utilizada

Por último, se buscó la posible correlación entre cada una de las lecturas semanales por cultivar, con la calificación definitiva promedio de las 11 lecturas semanales.

#### RESULTADOS Y DISCUSION

##### Concentración del inóculo y método de aplicación

Los resultados obtenidos, tanto en la prueba de método de inoculación como en los cultivares inoculados posteriormente, muestran que  $10^5$  conidios/ml aplicados por aspersión alrededor del fruto permiten detectar diferencias de susceptibilidad a *M. roreri*. Sin embargo, para trabajos con cultivares muy susceptibles esta concentración podría resultar alta, en especial, si las condiciones ambientales favorecen el desarrollo óptimo de la enfermedad. Concentraciones como la de  $10^4$  conidios/ml mostraron ser insuficientes para infectar aún los cultivares medianamente susceptibles.

Concentraciones tan altas como la de  $10^6$  conidios/ml parecieron enmascarar o vencer alguna resistencia cuando ésta existe.

La aspersión con el atomizador DeVilbiss produjo una infección más natural, por similar más las condiciones de campo en donde el fruto normalmente no recibe concentraciones tan altas de inóculo, en una área reducida, como sucede con el pedazo de algodón. Esto podría llevar a la manifestación de una mayor severidad de la enfermedad debido a la alta presión de inóculo en un sólo sitio. En el Cuadro 1 se incluyen los resultados de los frutos infectados de los inocula-

dos por cultivar y el porcentaje de incidencia por cada concentración y el método de aplicación del inóculo.

Se considera que la aspersión alrededor del fruto permite un desarrollo más normal de la enfermedad por no concentrar el inóculo en un sólo sitio. Sin embargo, esta forma de inocular podría tener algunas limitaciones cuando se está tomando el avance de la necrosis y el área cubierta por estroma como una medida de susceptibilidad. Esto sucede porque, al penetrar la infección en varios sitios del fruto, las necrosis producidas en ellos se extienden y al unirse dan la impresión de una mayor velocidad en el avance. Esta situación conduciría a determinar un valor más alto en la escala utilizada y sobre todo en los casos en que se hagan varias lecturas por fruto. Si la infección se desarrolla a partir de un sólo sitio donde se coloque el inóculo, la medición del avance de la necrosis será más real. Además, al colocar el inóculo solamente en una pequeña área lleva a una mayor presión del mismo y esto puede afectar también el porcentaje de área necrótica. Merchán y Restrepo (10) destacan que las altas concentraciones de inóculo, generalmente llevan a mayores porcentajes de área necrótica.

La aplicación del inóculo por inyección con jeringa o depositándolo sobre un pequeño recipiente de plásticina tiene también sus limitaciones. El primero de estos casos lleva a la manifestación de una alta severidad en un tiempo muy corto y esto no ocurre cuando la inoculación se hace por aspersión. Al respecto, Enriquez, Salazar y Paredes (5) obtuvieron esporulación a los 16 días en aquellos frutos en donde se había inyectado el inóculo mientras que con otros métodos

Cuadro 1. Efecto de la dilución del inóculo y la manera de aplicarlo sobre la incidencia de moniliasis en frutos inoculados de dos a tres meses de edad.

Cultivar	Inoculados por aspersión				Inoculados con algodón			
	0	$10^4$	$10^5$	$10^6$	Concentración (conidios por mililitro)	0	$10^4$	$10^5$
R-8	0/8*	0/8	6/8	8/8	0/8	2/8	5/8	8/8
R-2	0/4	1/4	4/4	4/4	0/4	0/4	3/4	4/4
UF-701	0/4	1/4	1/4	2/4	0/4	0/4	2/4	1/4
Diamante-800	0/8	2/8	4/8	7/8	0/8	1/8	1/8	8/8
TSH-792	0/2	0/2	2/2	2/2	0/2	1/2	2/2	2/2
CATIE-1000	0/6	1/6	5/6	5/6	0/6	1/6	2/6	2/6
Total**	0/24	5/24	22/28	28/29	0/27	5/27	15/25	25/28
Porcentaje	0.0	20.8	78.6	96.5	0.0	18.5	60.0	89.3

\* Frutos infectados (numerador) del total inoculado (denominador)

\*\* Se descartan del total inoculado los perdidos por otras causas.

de inoculación, sin herir el fruto, a los 28 días aún no se habían obtenido síntomas. Con el depósito de plasticina, además de quedar los conidios concentrados en una área muy pequeña, tiene el agravante de quedar los conidios sumergidos o irse a la superficie formando grupos o grumos. Además, según Rodríguez y Suárez (11), los conidios de *M. roreri* sólo germinan cuando están cubiertos únicamente con una película de agua; la formación de esta película está favorecida con el atomizador que permite la formación de gotas pequeñas y la evaporación más rápida de excesos de agua, quedando pronto los conidios en contacto con las paredes del fruto.

#### Uso de la bolsa

El uso de la bolsa permite un microambiente más estable alrededor del fruto y esto es muy importante, sobre todo, durante el tiempo de penetración del inóculo. Una vez que han germinado los conidios y han penetrado, la función de la bolsa es impedir una posible infección natural, daño de insectos u otros animales o evitar la diseminación del inóculo cuando aparezcan los signos de la enfermedad. Además, en regiones de baja humedad relativa, la bolsa puede mantener un ambiente favorable al desarrollo de la enfermedad. Pero, en regiones de alta humedad con lluvias frecuentes, como Turrialba, pudo observarse que la presencia de la bolsa influyó negativamente en la formación de estroma y esporulación. Esto se atribuye a que esas condiciones de alta humedad se hacen más críticas dentro de la bolsa, manteniéndose el fruto mojado todo el tiempo. La presencia constante de una película de agua sobre el fruto y el agua detenida en rugosidades de la bolsa, hace que ésta se adhiera al fruto. En estas áreas de contacto no hay formación de estroma y por ende de esporulación. Esto puede afectar también la calificación en la escala utilizada. También, el ambiente demasiado húmedo dentro de la bolsa favorece la presencia y desarrollo de otros hongos donde la *Phytophthora* causó las mayores pérdidas. Por lo anterior, se considera que, de no haber limitaciones por diseminación del inóculo, se debe retirar la bolsa máximo a los 15 días después de la inoculación para permitir así un desarrollo más natural de la enfermedad.

#### Escala utilizada para la cuantificación de la severidad externa e interna

En la literatura consultada, no se menciona una escala de valores que cuantifique distintas combinaciones de síntomas y el avance de los mismos en frutos inoculados con *M. roreri*. En este estudio, el uso de una escala de valores facilitó la toma de información y también permitió cuantificar el avance semanal de la enfermedad y la severidad con que se presentaron

los distintos síntomas. La escala para severidad externa (0-10) abarcó prácticamente todas las situaciones que pueden presentarse en el fruto infectado con este hongo. Sin embargo, se considera que, para futuros trabajos, podría reducirse a seis categorías, 0 a 5, que corresponderían a:

- 0: Ausencia de cualquier síntoma externamente visible
- 1: Puntos aceitosos y, o, deformaciones ligeras
- 2: Madurez irregular y, o, deformaciones pronunciadas
- 3: Aparición de necrosis
- 4: Aparición de estroma
- 5: Presencia de esporulación.

El uso de una escala como ésta permitiría establecer más rápidamente las diferencias entre un grado y otro, lo cual no es fácil en la escala de 0 a 10, donde las diferencias en dos valores consecutivos después de siete quedan parcialmente a juicio del observador y requieren cierto detenimiento.

La calificación de severidad interna, en una escala de 0 a 5, facilitó también la cuantificación rápida del grado de descomposición que presentaron las almendras lo cual es muy importante cuando se está evaluando susceptibilidad, ya que algunos frutos pueden presentar externamente síntomas de la enfermedad pero internamente la descomposición no es total, permitiendo aprovechar parte de las almendras.

El análisis de variancia mostró que habían diferencias altamente significativas entre cultivares, tanto en severidad externa como interna. Por lo tanto, se considera que estas dos variables deben tomarse por separado cuando se desea evaluar diferencias de susceptibilidad a la moniliosis entre distintos cultivares.

#### La severidad a la octava semana como punto crítico

Se encontró una alta correlación entre la calificación a partir de la 8a. semana con la calificación promedio de 11 lecturas semanales tomadas a partir de la 5a. después de la inoculación. El valor del coeficiente de correlación (*r*) para la 8a. y 9a. semanas fue de 0.96. Esto es muy importante porque permite detectar diferencias de susceptibilidad con una sola lectura y ello implica economía en tiempo y recursos; a su vez, para futuros trabajos, ofrece la posibilidad de incluir dentro de una misma época de inoculación, gran cantidad de materiales. Otra ventaja de tomar la 8a. ó 9a. semana como punto crítico para lecturas únicas es que permite aprovechar en el análisis todos aquellos frutos atacados por otros patógenos en las últimas semanas donde *Phytophthora* sp. es la causa de las mayores pérdidas; estos frutos no podrían incluirse en el análisis si se tomaran las lecturas hasta la semana 15.

De acuerdo con lo observado en el campo, se considera que las lecturas entre la 8a y 9a semanas son las que aportan mayor información, ya que durante éstas, fue cuando se cosechó el mayor número de frutos por presentar esporulación, madurez prematura o un avanzado estado de descomposición aunque no siempre hubiera aparecido estroma. Rodríguez y Suárez (11) asignan dos meses aproximadamente para el proceso completo de desarrollo de síntomas en frutos de 60 a 100 días de edad, inoculados artificialmente; esto concuerda con la 8a ó 9a semanas tomadas como punto crítico y en donde se cosechó el mayor número de frutos, como se anotó antes. Por último, se considera que si la lectura única se realizara semanas más tarde, no mostrarían las diferencias que pueden observarse a la 8a ó 9a, pues todos los frutos infectados tienden a uniformizarse en cuanto al estado que presentan, debido a la descomposición del tejido; además, porque pueden aparecer otros microorganismos saprófitos que aceleran la descomposición e incluso dificultan la correcta evaluación de la severidad interna.

Otros aspectos aclarados en la metodología, serán muy importantes para probar la susceptibilidad a moniliasis de otros materiales de la colección donde se realizó el estudio.

#### CONCLUSIONES

Con el desarrollo del presente estudio se concluye lo siguiente:

- La inoculación de frutos de 60 días, mediante atomización con una suspensión de  $10^5$  conidios/ml

en Tween-80 al 0.01%, es un método efectivo que lleva a altos porcentajes de infección en cultivares muy susceptibles pero que permite, bajo las condiciones de Turrialba, establecer diferencias entre cultivares afectando poco a aquéllos con alguna resistencia.

- El uso de una escala para calificar severidad externa en frutos atacados por moniliasis, ayuda a evaluar objetivamente las diferentes combinaciones de síntomas que pueden presentarse permitiendo cuantificar posibles diferencias entre distintos cultivares y facilitando, además, la toma de información.
- La cuantificación del grado de descomposición interna que presenten los frutos infectados en cada cultivar, es importante cuando se quieren caracterizar diferencias de susceptibilidad a *Moniliophthora roreri* porque puede haber susceptibilidad externa y resistencia interna o viceversa.
- De acuerdo a la metodología utilizada y al ambiente en que se realizó el estudio, una sola lectura de severidad externa e interna a la 8a. o 9a semanas permite detectar diferencias esencialmente definitivas entre distintos materiales inoculados, al correlacionar estrechamente esta lectura con el promedio de 11 lecturas semanales.
- En zonas húmedas, el uso de la bolsa plástica en frutos infectados con *M. roreri* limita el normal desarrollo de la enfermedad y favorece la presencia de otros patógenos, como *Phytophthora*.
- DESROSIERS, R.; DIAZ M., J. 1965. Efecto de diversos fungicidas en el combate de la podredumbre de las mazorcas causada por Monilia. Agricultura Tropical (Col.) 11(9):759-764
- ENRIQUEZ, G.A.; SALAZAR G.; PAREDES, I.A. 1979. Monilia, una nueva enfermedad que afecta el cacao de Costa Rica en la zona de Cahuita. Turrialba, C.R., Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza, Programa de Plantas Perennes. 9 p. Mimeografiado
- EVANS, H.C. 1981. Pod rot of cacao caused by *Moniliophthora (Monilia) roreri*. Commonwealth Mycol Inst, Kew, Surrey, England 44 p (Pathological Papers no. 24)

#### LITERATURA CITADA

- AMPUERO, E. 1967. Monilia pod rot of cocoa. Cocoa Growers' Bulletin 9:15-18
- BARROS N., O. 1977. Investigaciones sobre el hongo *Monilia roreri* Cif. and Par., causante de la pudrición acuosa de la mazorca del cacao: sus daños y su control. El Cacaotero Colombiano 3:42-52
- DELGADO A., J.C.; AMPUERO, E.; DOAK, K.D. 1960. Possible evidencia de resistencia a la *Monilia roreri* Cif. Par., en algunos clones de la Estación Experimental Tropical de Pichilingue. In Inter-American Cacao Conference (8., 1960, Trinidad and Tobago) Proceedings Trinidad and Tobago, Trinidad Government Press. p 184-192.

7. GREEN, M.J. 1977. Estudios sobre *Monilia roreri* adelantados en Caldas, Colombia. 9 p. (mecanografía). Presentado en la reunión del 18 al 23 de abril de 1977 en Pichilingue, Ecuador
8. JIMENIZ, I. 1982. Estudio sobre la situación actual y las perspectivas del cultivo e industrialización del cacao en América Central. Turrialba, C.R., Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza, Programa de Plantas Perennes 29 p
9. MERCHAN, V.M. 1981. Avances en la investigación de la Moniliásis del cacao en Colombia. El Cacaotero Colombiano no. 16:26-41
10. MERCHAN, V.: RESTREPO, A. 1980. Calibración de un método de inoculación con *Moniliophthora roreri*. Informe anual de actividades 1979B-1980A Bogotá, Instituto Colombiano Agrícola 37 p
11. RODRIGUEZ, M.; SUAREZ, C. 1973. Avances en la investigación sobre *Monilia roreri* del cacao en Ecuador. Guayaquil. 18 p
12. RORER, J.B. 1918. Enfermedades y plagas del cacao en el Ecuador y métodos modernos apropiados al cultivo del cacao. Trad por A. Pachano. Guayaquil, Ec., Asociación de Agricultores p. 17-40.
13. SOTOMAYOR, F. 1965. Estudios preliminares sobre la resistencia de algunos clones de cacao a la Moniliásis provocada por la inoculación artificial. Tesis Ing., Agr. Guayaquil, Ec., Universidad de Guayaquil 56 p.
14. SUAREZ, C. 1971. Estudio del mecanismo de penetración y del proceso de infección de *Monilia roreri* Cítrica y Par, en frutos de cacao (*Theobroma cacao* L.). Tesis Ing., Agr. Guayaquil, Ec., Universidad de Guayaquil. 54 p

## Thermal Characteristics and Composition of Fats from *Theobroma* Species<sup>1</sup>

S. Chaiseri\*, D.H. Arruda\*, P.S. Dimick\*, G.A. Enriquez\*\*

### ABSTRACT

Thermal behaviors and compositions of fats from *T. angustifolia*, *T. bicolor* (from Costa Rica and Brazil), *T. gileri*, *T. grandiflora* and *T. mammosa* were evaluated in comparison to cocoa butter. *Theobroma* fats, except for that from Costa Rican *T. bicolor*, exhibited lower solid fat contents (SFC) than that of cocoa butter at room temperature (20-25°C). This is the result of the high oleic and linoleic acid contents which made up more than 50% of their total fatty acid composition. Cocoa butter (*T. cacao*) and Costa Rican *T. bicolor* contained 37.8% and 47.7% of both oleic and linoleic acid, respectively. The melting behavior of the Costa Rican *T. bicolor* fat was similar to that of cocoa butter, but its high SOS (S = stearic acid, O = oleic acid) content (22%) would be incompatible with cocoa butter. However, both Costa Rican and Brazilian *T. bicolor* fats contained high SOS. An SOS fraction could be used to improve the inferior quality cocoa butter.

### COMPENDIO

La evaluación del comportamiento térmico y la composición fueron utilizados para comparar las grasas de *T. angustifolia*, *T. bicolor* (de Costa Rica y Brasil), *T. gileri*, *T. grandiflora* y *T. mammosa* con la manteca de cacao (*T. cacao*). Al ser comparadas a temperatura ambiente (20-25°C), las grasas de las especies *Theobroma*, con excepción de la grasa de la especie *T. bicolor* de Costa Rica, presentaron contenidos más bajos de grasas sólidas (SFC) que la manteca de cacao. Esto fue debido al alto contenido de ácidos oléico y linoléico, los cuales representaron más del 50% del total de ácidos grasos. El contenido de los ácidos oléico y linoléico fue 37.8% en la manteca de cacao (*T. cacao*) y 47.7% en las grasas de la especie *T. bicolor* de Costa Rica. La forma en que la grasa de la especie costarricense *T. Theobroma* se derrite, fue, similar al comportamiento térmico de la manteca de cacao, pero la alta concentración (22%) de triglicéridos de la forma SSO (S = ácido estearíco, O = ácido oléico) es diferente a la concentración observada en la manteca de cacao. Sin embargo, ambas especies de *T. bicolor*, costarricense y brasileña, tuvieron un alto contenido de SOS. Una fracción de SOS podría ser utilizada para mejorar la manteca de cacao de baja calidad.

<sup>1</sup> Received for publication 10 October 1989  
This is paper No. 8281 of the journal series of the Pennsylvania Experiment Station, University Park, PA 16802, USA

\* Department of Food Science, The Pennsylvania State University, University Park, PA 16802, USA.

\*\* Current address: El Universo 455 y Los Shyris, Quito, Ecuador.

### INTRODUCTION

Cocoa butter is a major ingredient in chocolate and comprises 30-40% of its weight. The melting characteristics of cocoa butter are unique, in having a high solid fat content at room temperature

and melting at a narrow temperature range just below body temperature. The high price of cocoa butter encourages the confectionery industry to search for economical fats that have similar thermal characteristics. Theoretically, alternative fats have to contain the same types and proportions of triacylglycerols as cocoa butter in order to be fully compatible with cocoa butter. Over 70% of cocoa butter triacylglycerols are POP, POS, and SOS (P = palmitate, O = oleate, and S = stearate). In other words, cocoa butter alternatives should contain high concentrations of C16-18 fatty acids and monounsaturated triacylglycerols that have oleic acid at the sn-2 position. Up to now, most of the cocoa butter alternatives are obtained from the modified vegetable oils, e.g., palm oil, soybean oil, cotton seed oil, and coconut oil (8). Modification of these oils, which usually involve hydrogenation and fractionation, increases the price of cocoa butter alternatives. Some alternatives, such as lauric cocoa butter substitutes (CBS), are inexpensive but are not compatible with cocoa butter. Natural fats, of similar composition from plants of the same genus as the cacao tree, could be potential cocoa butter alternatives.

There are 22 other species of the genus *Theobroma* in Central and South America, but they are not widely cultivated as cacao trees (10). In addition to *T. cacao*, the commonly used species in this genus are *T. grandiflora* and *T. bicolor*. Fatty acid compositions and thermal characteristics of fats from these last two species have been studied (1, 2). Fats from *T. bicolor* and *T. grandiflora* contain high oleic and stearic acid. *T. bicolor* fat contains 43.2% oleic acid and 40.3-41.0% stearic acid, whereas *T. grandiflora* fat contains 41.4% and 31.8-34.0% oleic and stearic acid, respectively. Both fats are softer than cocoa butter, but have similar melting points. *T. grandiflora* fat had the same melting point as cocoa butter, whereas *T. bicolor* fat had a higher melting point, 32°C and 35°C, respectively (1). Fats from other species of *Theobroma*, however, have not been extensively investigated.

The objective of this study was to determine the thermal behavior and composition and of fats from five *Theobroma* species in comparison to cocoa butter.

#### MATERIALS AND METHODS

**Sample preparation** Dry unfermented seeds of *T. angustifolia*, *T. bicolor* (from Brazil and Costa Rica), *T. cacao*, *T. gileri*, *T. grandiflora*, and *T. mammosa* were obtained as follows: Mature pods were collected, opened in the field laboratory and the seeds were

Table I. Fat content of *Theobroma* seeds and melting points of their fats.

Sample	Fat content (% dry basis)	Melting point (°C) <sup>1</sup>
<i>T. cacao</i>	52.0	29.9
<i>T. bicolor</i> (Costa Rica)	27.0	29.7
<i>T. bicolor</i> (Brazil)	34.1	28.3
<i>T. angustifolia</i>	58.6	27.0
<i>T. grandiflora</i>	36.7	28.2
<i>T. mammosa</i>	49.6	28.3
<i>T. gileri</i>	1.2	- <sup>2</sup>

<sup>1</sup> Based on onset temperature by DSC

<sup>2</sup> Liquid at room temperature

washed with sawdust and water. Seeds were sun-dried for 20 min and oven-dried at 60°C for 48 h with mixing. Following collection, the seeds were stored in a dry atmosphere until being shipped to the Pennsylvania State University Laboratory. Upon receipt of the seeds, they were shelled by hand and ground with dry ice to prevent the fat from melting.

**Fat content** Fats were solvent-extracted from 2 g of the dry ground samples using a Tecator Soxtech system 1043. Samples were boiled in petroleum ether for 45 min and refluxed with the same solvent for 1 h. Solvent was removed by heating at 60°C. Percentages of fat content were calculated on a dry weight basis (db).

**Melting point and solid fat content** Fat samples were completely melted at 100°C. Three microliters of the samples were transferred into differential scanning calorimeter (DSC) aluminum pans. Samples were tempered at 4°C for 24 h to initiate crystallization and, subsequently, at 27°C for three weeks to produce the stable polymorph V crystals. Tempered samples were analyzed for their melting points and solid fat content (SFC) profiles by using a Perkin Elmer DSC-4. Samples were heated from 0°C to 50°C at the rate of 20°C/min. Melting points were determined by measuring the onset temperatures of the endotherms (5). SFC profiles were obtained using a partial area program on the same DSC thermograms.

**Fatty acid composition** Fatty acid compositions of the total lipid fractions were determined as fatty acid methyl esters using a Hewlett-Packard model 5730A gas chromatograph (GC) equipped with a flame ionization detector. Analyses were performed isothermally at 180°C on a 1.82 m x 2 mm column packed with GP 10% DEGS-PS on 80/100 Supelcoport (Supelco, Inc.). The carrier gas (helium) was at the flow rate of 20 ml/min.

Triacylglycerol compositions Triacylglycerol compositions were evaluated (6) with a Perkin Elmer HPLC pump and a water differential refractometer detector model 401. Mobile phase acetonitrilechloroform 6:4(v/v) was pumped at 0.7 ml/min through an adsorbosphere C-18 reverse phase column (Alltech Assoc.). Ten microliters of 10% (w/v) samples in chloroform were injected.

### RESULTIS

Seeds of *Theobroma*, except for those of *T. gileri*, contained high fat ranging from 27% to 58.6% (db) (Table 1). Triacylglycerol compositions of *Theobroma* fats were evaluated and the results are shown in Fig. 1 and Table 3. Peaks were identified by comparing their retention times with those of cocoa butter triacylglycerols from previous work (9) and quantification was based on peak area percentages. Cocoa butter contained mainly monounsaturated triacylglycerols; namely POP, POS, and SOS, which comprise more than 80% of the total triacylglycerols. Other species of *Theobroma* had high concentrations of di- and triunsaturated triacylglycerols, namely OOO, AOO and SOO (A = arachidate). In addition, fats from *T. angustifolia*, *T. grandiflora*, and *T. manimosa* had higher concentrations of high molecular weight triacylglycerols, namely SOA and OAA compared to cocoa butter and *T. bicolor* fats.

Fatty acid compositions of the fats support the patterns of triacylglycerol content *T. angustifolia*, *T.*

*grandiflora*, and *T. manimosa* fats contained high arachidic acid; 12.7, 12.1, and 13.0%, respectively (Table 3). These fats were also high in oleic and linoleic acid, which together composed more than 50% of the total fatty acid content. Fatty acid composition of *T. bicolor* from both Costa Rica and Brazil were most similar to cocoa butter, i.e., high in stearic and low in arachidic acid content. However, *T. bicolor* fats were approximately 20% lower in palmitic acid and about 15% higher in oleic acid content than cocoa butter. *T. gileri* was remarkably different from the other species studied. It contained only 1% fat and that fat was characterized by being low in stearic and high in linoleic acids. The triacylglycerol profile was atypical (Fig. 1). The *T. gileri* came from a very restricted area in Ecuador. The striking differences from the other *Theobroma* spp. may be due to: 1) it was separated genetically from the other species for a long time and/or 2) it belongs to another genera. It is apparent from the data that further studies are needed to clarify the nature of *T. gileri*.

The effect of differences in composition among fats from *Theobroma* spp. on physical behavior can be observed through DSC thermograms. After tempering at 27°C for three weeks, cocoa butter was solidified into the stable polymorph V, whereas *T. gileri* fat remained liquid at this temperature. Melting points of solid phases were similar among different species, ranging from 27.0 to 29.9°C (Table 1).

Fig. 2 shows the melting profiles of the fats as represented by SFC at various temperatures. Most of

Table 2. Triacylglycerol composition of *Theobroma* species (%).

Triacylglycerol	<i>T. cacao</i>	<i>T. bicolor</i> (Costa Rica)	<i>T. bicolor</i> (Brazil)	<i>T. angustifolia</i>	<i>T. grandiflora</i>	<i>T. manimosa</i>
OLiO	—	0.6	1.3	1.9	1.0	2.1
PLiO	0.8	1.0	1.4	1.4	1.9	2.1
PLiP	2.6	0.5	0.5	0.6	1.1	0.5
OOO	0.6	5.6	9.5	7.5	6.0	6.0
SliO	—	0.3	4.2	4.4	3.2	5.7
POO	4.5	3.5	5.8	3.2	6.2	3.1
PiS	4.8	2.1	2.4	—	2.9	1.9
POP	18.5	1.7	2.2	1.4	5.7	1.3
SOO	6.0	22.0	28.0	17.0	14.9	22.8
SLiS	—	4.6	3.2	—	—	—
POS	37.4	11.9	10.7	4.7	8.3	5.3
OOA	0.7	2.3	3.5	15.8	16.0	14.6
SOS	22.0	38.6	24.0	16.1	14.0	14.4
PSS	0.6	0.7	0.7	5.5	3.9	4.2
SOA	1.0	4.0	0.4	0.8	1.0	0.9
SSS	0.4	1.0	0.4	0.8	1.0	0.9
OAA	—	—	—	5.5	0.5	0.3
AAA	—	0.7	—	0.8	2.7	3.8

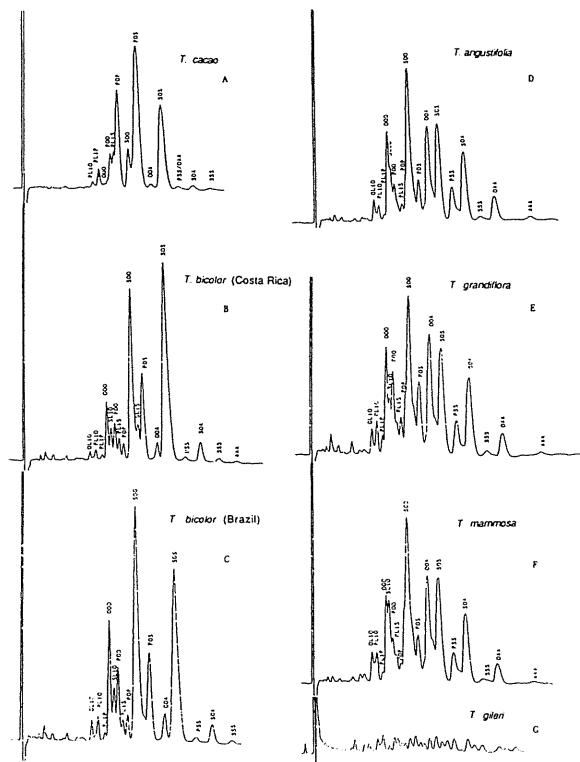


Fig. 1. Triacylglycerol chromatograms of *T. cacao* (A), Costa Rican *T. bicolor* (B), Brazilian *T. bicolor* (C), *T. angustifolia* (D), *T. grandiflora* (E), *T. mammosa* (F), and *T. gileri* (G). (P = palmitate, S = stearate, O = oleate, Li = linoleate, A = arachidate).

*Theobroma* fats were softer than cocoa butter at room temperature ( $20\text{--}25^\circ\text{C}$ ) which is indicated by lower SFC values. *T. bicolor* from Costa Rica had melting characteristics similar to cocoa butter at room temperature but had higher SFC at temperatures above  $30^\circ\text{C}$ .

#### DISCUSSION

*Theobroma* seeds, except for *T. gileri*, were high in fat, which could have some commercial signifi-

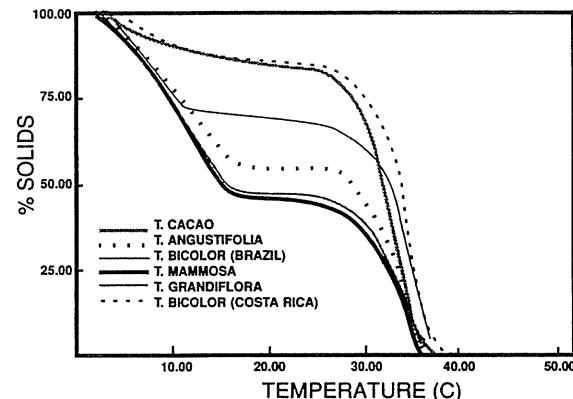


Fig. 2. Solid fat content profiles of fats from various *Theobroma* species.

cance. Among fats from *Theobroma* seeds, the fat from Costa Rican *T. bicolor* was most similar to cocoa butter in both composition and thermal characteristics. This fat exhibited a high SFC value at room temperature and had a sharp melting range at temperatures above  $30^\circ\text{C}$ . One disadvantage is that this fat had a high SFC value at temperatures over  $35^\circ\text{C}$  (Fig. 2), which may cause an undesirable waxy mouthfeel. This could be a result of a high SOS content. Although the Costa Rican *T. bicolor* fat has a melting behavior similar to cocoa butter, the use of this fat as a cocoa butter substitute could be complicated. The difficulty is due to its 43.4% oleic acid content, which is about 10% higher than contained in cocoa butter. Oleic acid exists primarily in the SOO forms in *T. bicolor* and is known to promote softness. The extra double bond in the sn-3 position of the SOO glycerol backbone may disturb the molecular packing of the major components, monounsaturated triacylglycerols, in cocoa butter (3). However, *T. bicolor* fat contained high SOS, a major triacylglycerol in cocoa butter. Previous work indicates that,

Table 3. Fatty acid composition of *Theobroma* fats (%).

Sample	Fatty acid						
	16:0 <sup>1</sup>	16:1	18:0	18:1	18:2	18:3	20:0
<i>T. cacao</i>	28.9	0.2	32.0	34.0	3.8	0.2	1.0
<i>T. bicolor</i> (Costa Rica)	6.8	—	43.5	43.4	4.3	—	1.9
<i>T. bicolor</i> (Brazil)	7.8	—	34.0	51.8	5.0	—	1.9
<i>T. angustifolia</i>	4.8	—	25.9	48.8	7.5	—	12.7
<i>T. grandiflora</i>	10.0	0.2	21.7	47.4	8.6	—	12.1
<i>T. mammosa</i>	5.6	0.2	25.9	44.1	10.7	0.5	13.0
<i>T. gileri</i>	11.8	0.8	12.2	34.2	27.5	2.4	11.2

1 Carbon chain length: number of double bonds.

in most cases, adding 3-5% of SOS to cocoa butter can improve the crystallization behavior of an inferior cocoa butter (7). It may not be commercially feasible to use the Costa Rican *T. bicolor* directly as a cocoa butter alternative; however, fractionation of SOS could be a viable alternative for improving the quality of an inferior cocoa butter. The Brazilian *T. bicolor* fat can be used in a similar way. The difference between the *T. bicolor* fats from the two sources is

that the Brazilian one had higher unsaturated components, namely, SOO and OOO. The nature of the composition of the Brazilian *T. bicolor* fat results in a softer fat than the Costa Rican fat. The higher degree of unsaturation in the Brazilian *T. bicolor* fat could be a result of differences in variety or the temperature in the growing areas. Plants grown at low temperature generally contain high unsaturated fatty acids (4)

#### LITERATURE CITED

1. BERBERT, P.R.F. 1981. Determinação do teor, ácidos graxos e características físicas das gorduras das sementes do *Theobroma grandiflora* L. e do *Theobroma bicolor* L. e comparação com a gordura do *Theobroma cacao* L. Revista Theobroma 11(2): 91-98.
2. BRACCO, U. 1979. Chimie et physico-chimie des beurres de cacao et des graisses utilisées en chocolaterie et en confiserie. Chimia 33(5):166-172
3. JEWELL, G. 1981. Factors influencing the crystallization of chocolate. In Proceedings of the Annual Pennsylvania Manufacturing Confectioners' Association Producers' Conference. 35:56-66.
4. LEHRIAN, D.; KEENEY, P.G.; BUBLER, D. 1980. Triglyceride characteristics of cocoa butter from cocoa fruit matured in a microclimate of elevated temperature. J. Am. Oil Chem. Soc. p 57-66
5. MANNING, D.M.; DIMICK, P.S. 1983. Interpreting the thermal characteristics of cocoa butter using the differential scanning calorimeter. Manufacturing Confectioner 63:73-80.
6. MANNING, D.M.; DIMICK, P.S. 1984. Cocoa butter crystallization. In Proceedings of the Annual Pennsylvania Manufacturing Confectioners' Association Producers' Conference 38:29-33.
7. PADLEY, F.B.; PAULUSSEN, C.N.; SOETERS, C.J.; TRESSER, D. 1972. The improvement of chocolate using the mono-unsaturated triglycerides SOS and POS. Rev. Int. Choc. 27:266-228.
8. PEASE, J.J. 1985. Confectionery fats from palm oil and lauric oil. J. Am. Oil Chem. Soc. 62(2):426-430.
9. SHUKLA, V.; NIELSEN, W.; BATSBERG, W. 1983. A simple and direct procedure for the evaluation of triglyceride composition of cocoa butters by high performance liquid chromatography-a comparison with the existing TLC-GC method. Fette Seifen Anstrichm 85:274.
10. TOXOPEUS, H. 1985. Botany, types and population. Ch 2. In *Cocoa* 4th ed. G.A.R. Wood, and R.A. Lass (Ed.), p. 11. Longman Inc., New York.

# Especies de *Phytophthora* Aisladas de Cacao en México y su Distribución Geográfica<sup>1</sup>

R. Montes-Belmont\*, L. de los Santos\*

## ABSTRACT

In order to study taxonomy and geographical distribution of *Phytophthora* spp. of cocoa in the States of Tabasco and Chiapas, Mexico, Sixty-three isolates of this fungus from pods, leaves and soil of cocoa plantations in both states were collected. Determinations of colony morphology, ability to produce sporangia and chlamydospores, morphology and size of sporangia, sporangial pedicels, chlamydospores, oospores, antheridia and maximal temperature for growth were made with these isolates. According to our results, *P. citrophthora* was the most frequent species, followed by *P. capsici* they were found in seven countries of both states, and *P. palmivora* and *P. nicotianae* var. *nicotianae* were found only in two countries of Chiapas. In observations made on cocoa cultivars amelonado, calabacillo, Ceylan, cundeamor and guayaquil concerning resistance to these fungal species, several reactions were obtained. This explains why it is difficult to produce clones of cocoa in Mexico that maintain resistance to *Phytophthora*.

## COMPENDIO

Se colectaron 63 aislamiento de *Phytophthora* procedentes de mazorcas, hojas y suelo de plantaciones de cacaotero, de nueve municipios de los estados mexicanos de Tabasco y Chiapas, para estudiar su taxonomía y la distribución geográfica de sus especies. Se determinó: la morfología de las colonias, habilidad para producir esporangios y clamidiosporas; forma y tamaño de: esporangios, pedicelos de los esporangios, clamidiosporas, oosporas y anteridios, además de definir su temperatura máxima de crecimiento. De acuerdo con los resultados obtenidos, *P. citrophthora* resultó la especie más ampliamente distribuida, *P. capsici* se encontró en siete municipios de ambos estados, y *P. palmivora* y *P. nicotianae* var. *nicotianae* sólo se encontraron en dos municipios de Chiapas. En observaciones sobre la resistencia de los cacaos amelónado, calabacillo, Ceilán, cundeamor y guayaquil a estas especies fungosas, se obtuvo una diversidad de reacciones que explican la dificultad que se ha tenido para obtener clones con resistencia estable a este complejo de especies productoras de la pudrición negra de la mazorca en México.

## INTRODUCCION

En estudios recientes se ha demostrado que la enfermedad conocida como "Pudrición negra de la mazorca del cacao" es ocasionada por varias especies de *Phytophthora* (2, 5, 6, 10, 11). La distribución de estas especies es muy variable, existiendo distinta predominancia de cada una de ellas en diferentes partes del mundo. En Brasil, predomina *P. capsici* sobre *P. palmivora* y *P. citrophthora* (9). En Venezuela, la especie más ampliamente distribuida es *P. palmivora* aunque también existen *P. megasperma* y *P. capsici* (5, 11). En Camerún y Nigeria, *P. megakarya* se considera como la más virulenta y extendida pero además se presentan *P. capsici*, *P. palmivora* y *P. botryosa* var. *africana* (2, 3, 11). En México, se sabe de la presencia de *P. capsici* (5, 11) y en estudio de cepas procedentes de México, Guatemala y Costa Rica, se encontraron, además de esta especie, a *P. palmivora*, *P. citrophthora* y *P. heveae* sin que se precise su origen (6).

Ante esta situación, el presente trabajo se orientó hacia el conocimiento y distribución de las especies de *Phytophthora* en los principales estados productores de cacao en México: Tabasco y Chiapas, los cuales en conjunto representan más del 90% del área cacaotera del país.

## MATERIALES Y METODOS

**Origen de los aislamientos.** Se colectaron un total de 63 aislamientos de mazorcas, hojas y suelo, de plantaciones de cacao en los municipios de: Cárdenas, Comalcalco, Huimanguillo, Paraíso y Teapa, en Tabasco, y de Cacahuatán, Ciudad Hidalgo, Rosario Izapa y Tuxtla Chico, en Chiapas. Por cada localidad, se estudiaron siete cepas de diferentes plantaciones.

**Crecimiento micelial y producción de esporangios.** Para observar el desarrollo micelial y la habilidad para producir esporangios, se usó como medio de cultivo, zanahoria-agar (1), transfiriendo discos de 3 mm de diámetro con el hongo en activo desarrollo a las cajas de Petri y se dejaron las cepas crecer a temperatura ambiente (24 a 28°C). En los casos en que el micelio era de aspecto algodonoso y abundante, a los cuatro días, se hizo un raspado con navaja de afeitar y se

1 Recibido para publicación el 13 de febrero 1989

\* Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, Unidad Oaxaca, Instituto Politécnico Nacional, Apartado Postal 1123, Oaxaca, Oax., México C.P. 68000

dejó por 24 horas al aire a fin de estimular la producción de esporangios. En todas las cepas se hicieron observaciones a los cinco días de incubación, sobre: aspecto de las colonias, producción de esporangios, tipos de esporangióforos e hifas somáticas.

**Producción de oosporas.** Todos los aislamientos fueron apareados entre sí, en todas las combinaciones posibles, para lo cual se colocaron discos de las cepas en agar sobre cajas de Petri en un medio jugo de tomate-agar, colocando cuatro discos en extremos separados y uno en el centro. Todas las cajas con los apareamientos fueron colocadas en oscuridad durante dos semanas a 20°C.

**Medición de estructuras reproductivas.** De cada cepa se hicieron preparaciones montadas en azul de algodón-lactofenol para determinar forma de esporangiós; sus dimensiones fueron definidas a partir de 50 esporangiós por cada aislamiento, usando un microscopio compuesto con micrómetro ocular.

Con los apareamientos que produjeron oosporas se hizo la medición de éstas y de los anteridios en la misma cantidad que los esporangiós.

**Temperatura máxima de crecimiento.** Todos los aislamientos fueron transferidos a medio zanahoria-agar y se incubaron a 30, 33, 35 y 37°C observando su desarrollo a las 24, 48 y 72 horas.

**Resistencia a diferentes tipos de cacao.** Dentro de los cacaos más comunes en México, se colectaron mazorcas de dos meses de edad de los tipos: amelonado, calabacillo, Ceilán, cundeamor, guayaquil verde y guayaquil rojo. Estas mazorcas fueron inoculadas con cinco de los aislamientos para lo cual se usaron 12 frutos por cepa; en cada una de las mazorcas se adhirieron tres anillos de plasticina de 4 cm de diámetro y 2 cm de altura; en medio de éstas se colocó 1 ml de una suspensión de esporangiós. Posteriormente, las mazorcas fueron incubadas en cámara húmeda a temperatura ambiente por seis días. La evaluación de la resistencia se hizo con base en lo indicado en la Fig. 1.

#### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De acuerdo con los criterios de Waterhouse (9) Ho (4), Newhook (8), Waterhouse y Stamps (5), Brasier (2) y las descripciones de hongos fitopatógenos del Commonwealth Mycological Institute, los aislamientos estudiados quedaron dentro de las siguientes especies:

*P. citrophthora* Crecimiento micelial de aspecto algodonoso, laxo; esporangióforos irregularmente ramificados y en algunas cepas, no ramificados.

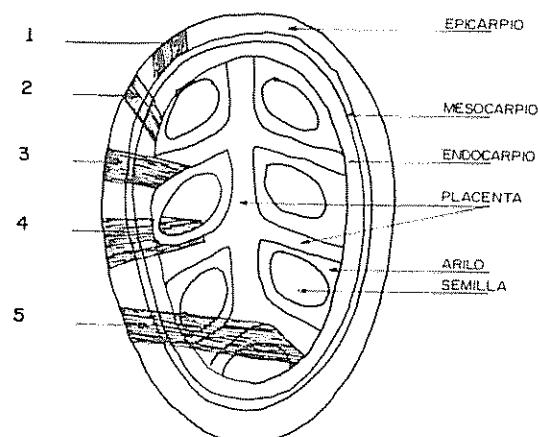


Fig. 1 Escala de valores para medir el grado de penetración de *Phytophthora*

En la mayoría, pedicelos no deciduo y sólo en un aislamiento los pedicelos eran desprendibles en agua. Una característica típica fue su variabilidad en las formas de los esporangiós: obovoides, elipsoides, obpiriformes y con frecuencia, deformes, con uno o dos cuellos alargados o con dos o tres ápices. Su tamaño promedio fue de 61 por 23  $\mu$  con papila de 5  $\mu$  y relación largo/ancho (L/A) 2/6. Oosporas esféricas de 25  $\mu$  de diámetro, anteridios anfíginos de 13 x 11  $\mu$  (Fig. 2). No formaron clamidosporas. Su temperatura máxima de crecimiento fue de 30°C. Esta especie fue la más ampliamente distribuida pues se encontró en todos los municipios muestreados.

*P. capsici*. Crecimiento micelial abundante tomando la colonia el aspecto de un crisantemo. Esporangióforos ramificados en forma de abanico. Pedicelos deciduos largos, en promedio de 51  $\mu$ . Esporangiós predominantemente elípticos, obovoides, de base angosta. Sus dimensiones promedio fueron 45 x 21  $\mu$  con papila de 5  $\mu$  y una relación (L/A) de 2/1. Oosporas esféricas o semiesféricas de 25  $\mu$  de diámetro; anteridios anfíginos de 14 x 19  $\mu$ . No formaron clamidosporas (Fig. 3). Crecieron a 37°C. Se detectó en todos los municipios de Tabasco y además, en Chiapas, en Cacahuatán y Tuxtla Chico.

*P. palmivora* Crecimiento de la colonia en forma radial de dos tipos: uniforme, a todo lo largo de la caja, y otro con un anillo con mayor concentración de hifas en la mitad del diámetro de la colonia. Esporangióforos ramificados irregularmente. Pedicelos deciduos cortos de 5  $\mu$ . Esporangiós elipsoides, ovoides, obovoides u obpiriformes, todos, con base redondeada.

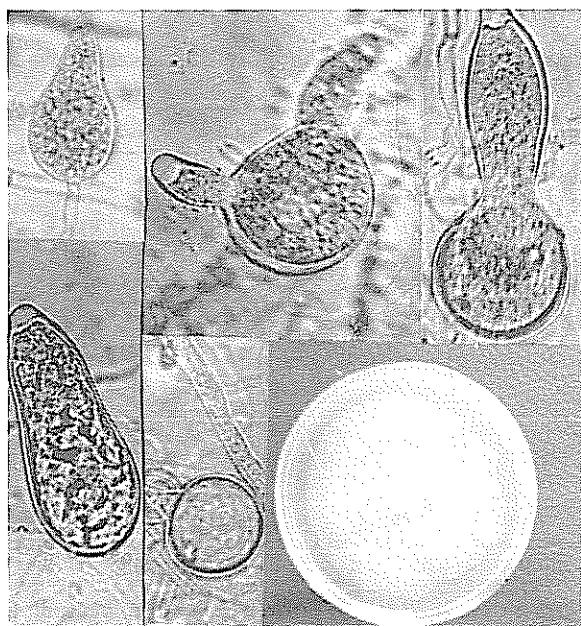


Fig. 2 *P. citrophthora*. Esporangios, oosporas y aspecto de la colonia

da. Su tamaño promedio fue de  $40 \times 24 \mu$  con papila de  $5 \mu$  y L/A de  $1/6$ . Oosporas esféricas u ovoides, de  $22 \mu$  de diámetro y anteridios antiguinos de  $16 \times 13 \mu$ . Clamidosporas presentes en todos los aislamientos y de  $30 \mu$  diámetro en promedio (Fig. 4). En algunos aislamientos, la temperatura máxima de crecimiento fue de  $35^{\circ}\text{C}$  y en otros, de  $37^{\circ}\text{C}$ . Se encontró únicamente en Tuxtla Chico y Rosario Izapa, estado de Chiapas.

*P. nicotianae* var. *nicotianae*. Micelio de aspecto algodonoso, sin mucha abundancia de hitas, con hinchamientos globosos. Esporangiíforos irregularmente ramificados. Pedicelo deciduo en algunas cepas, generalmente muy pequeño de  $2 \mu$ . Esporangios esféricos, ovoides u obpiriformes algunos con dos papilas; otros intercalares. Sus dimensiones medias fueron  $54 \times 41 \mu$ . Papila de  $5 \mu$  L/A  $1/3$ . Oosporas esféricas de  $24 \mu$  de diámetro y anteridios antiguinos de  $16 \times 12 \mu$ . Clamidosporas presentes de  $28 \mu$  de diámetro (Fig. 5). Creció a  $35^{\circ}\text{C}$ . Su distribución también fue restringida a Tuxtla Chico y Rosario Izapa.

Como se puede observar en las anteriores descripciones, existen algunos caracteres como la longitud del pedicelo deciduo y la forma de la base del esporangio que, en las descripciones originales de las especies de *Phytophtthora*, no se consideraron de importancia; sin embargo, en las especies encontradas en cacao se ha visto que son caracteres constantes y que permiten un diagnóstico preciso (2, 8).

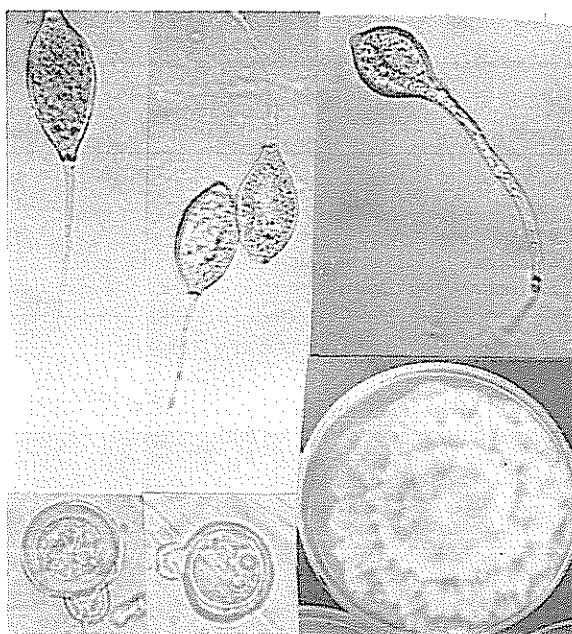


Fig. 3 *P. capsici*. Esporangios, oosporas y aspecto de la colonia

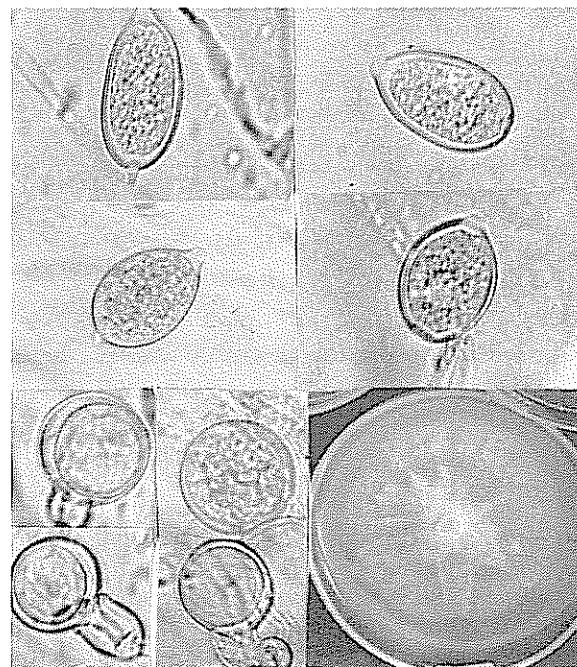


Fig. 4 *P. palmivora*. Esporangios, oosporas, clamidospora y aspecto de la colonia

**Resistencia a diferentes tipos de cacao.** Los resultados se expresan en el Cuadro 1. Los cacaos calabacillo, Ceilán y guayaquil verde fueron altamente susceptibles a las cepas probadas. El amelonado fue medianamente resistente a *P. palmivora*. El cundeamor fue resistente a *P. capsici* y medianamente resistente

Cuadro 1. Grado de penetración de *Phytophthora* después de seis días.

Especie fungosa	Tipo de cacao					
	Calabacillo	Amelonado	Cundeamor	Ceilán	Guayaquil A	Guayaquil B
<i>P. palmivora</i>	5	3	4	4	5	5
<i>P. capsici</i>	5	4	2	5	5	2
<i>P. citrophthora</i>	5	5	5	5	4	5
<i>P. nicotianae</i> 1* var. <i>nicotianae</i>	5	5	3	5	5	5
<i>P. nicotianae</i> 2* var. <i>nicotianae</i>	5	5	3	5	5	2

\* Corresponden a dos cepas de la misma especie

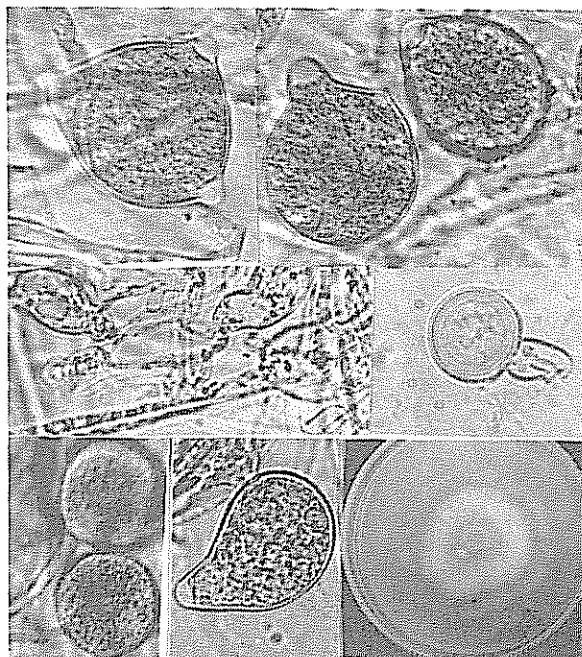


Fig. 5. *P. nicotianae* var. *nicotianae*. Clamidosporas, esporangiios, oospora, hinchamientos de las hifas y aspecto de la colonia

a *P. nicotianae* var. *nicotianae*. El guayaquil rojo resultó con resistencia a *P. capsici* y *P. nicotianae* var. *nicotianae*. Todos los tipos de cacao fueron susceptibles a *P. citrophthora*. Esta diversidad de reacciones hospedero-patógeno explican en parte porqué ciertos clones de cacao que, en algunos lugares son calificados como resistentes, en otras regiones resultan susceptibles, siendo éste uno de los factores determinantes de la distribución de las especies y sus posibles razas fisiológicas. En México, durante mucho tiempo la Estación Experimental de Rosario Izapa fue un centro de mejoramiento de cacao de la cual se generaron algunos clones clasificados como resistentes a *Phytophthora*; sin embargo, al ser sembrados en Tabasco, no se obtuvieron los mismos resultados.

#### LITERATURA CITADA

- 1 BRASIER, C.M. 1967. Physiology of reproduction in *Phytophthora*. PhD Thesis. Hull, England, University of Hull 205 p.
- 2 BRASILR, C.M.; GRIFFIN, M.J. 1979. Taxonomy of "Phytophthora palmivora" on cocoa. Transaction of the British Mycological Society 72:111-143.
- 3 GRIFFIN, M.J. 1977. Cocoa *Phytophthora* Workshop Pans. (England) 23:107-110
- 4 HO, H.H. 1981. Synoptic keys to the species of *Phytophthora*. Mycologia 73:705-714
- 5 KAOSIRI, I. 1978. Morphological, taxonomic and cytological studies of *Phytophthora palmivora*. PhD Thesis. University of California Riverside 253 p.
- 6 LOZANO, F.Z.; ROMERO, C.S. 1984. Estudio taxonómico de aislamientos de *Phytophthora* patógeno de cacao. Agrociencia (Méx.) 56:175-182.
- 7 LUZ, E.D.M.N.; CAMPELO, A.M.F.L. 1985. Population dynamics of *Phytophthora* in cocoa-growings areas in Bahia. Fitopatología Brasileira (Bras.) 19(1):9-16
- 8 NEWHOOK, F.J.; WATERHOUSE, G.M.; STAMPS, O.J. 1978. Tabular key to the species of *Phytophthora* De Bary. Commonwealth Mycological Institute 22 p. (Mycological Paper No. 143).
- 9 WATERHOUSE, G.M. 1963. Key to the species of *Phytophthora* De Bary. Commonwealth Mycological Institute 22 p. (Institute Mycological Paper No. 92).
- 10 WATERHOUSE, G.M. 1974. Other species of *Phytophthora* recorded on cocoa. *Phytophthora Disease of Cocoa*. p. 71-79.
- 11 ZENTMYER, G.A. et al. 1979. Morphological forms of *Phytophthora palmivora*. International Cocoa Research Conference (7, Donala, Cameroon). p. 291-296.

# Multivariate Analysis and the Classification of Agricultural Systems in a Major Tropical Area of Cacao Production (Barlovento, Venezuela)<sup>1</sup>

*M. Barrios\*, L. Arias\*\*, J.J. San José\**

## ABSTRACT

Production systems of the Barlovento Valley, a major area of cacao production in the tropics, were classified according to multivariate statistical methods based on cluster analysis of cases and variables. A sample of 487 surveys was selected from a total of 850 farms according to the three main components of the production systems: producer's economic rationale, technology and natural environment (10, 11). As a result of the cluster analysis, farms studied were divided into five groups, mainly characterized by an area gradient. In relation to the intrinsic characteristics of each system, it should be noted that in the Barlovento area there seems to exist a predominance of farms with agricultural systems mainly influenced by factors unrelated to potential agricultural productivity. Thus, constraints such as high production costs, limited credit, restricted use of agricultural machinery, inadequate cultural practices and reduced human labor for agricultural activities establish priorities which have overridden consideration of biological production efficiency.

## INTRODUCTION

To understand agricultural systems as a function of their components (producer's rationale, technology and natural environment) entails the management of a considerable volume of information. Nevertheless, relations and factors in these units could be shown through data classification of the selected production systems. Classification of these systems into groups has been traditionally based on

Los sistemas de producción de cacao en el Valle de Barlovento, una de las principales áreas productoras de cacao en los trópicos venezolanos, fueron clasificados de acuerdo a métodos estadísticos multivariados, basados en el análisis de conglomerados de casos y variables. Se utilizó una muestra de 487 encuestas, seleccionadas de un total de 850 fincas, de acuerdo a los tres componentes principales de los sistemas de producción: Racionalidad Económica del Productor, Tecnología y Medio Natural. Como resultado del análisis de conglomerados, las fincas fueron divididas en cinco (5) grupos, principalmente caracterizados por gradiente de superficie. En relación con las características intrínsecas de cada sistema, se pudo notar que, en el área de Barlovento, parece existir una predominancia de fincas con sistemas agrícolas principalmente influenciados por factores no relacionados con la productividad agrícola potencial. Restricciones tales como los altos costos de producción, crédito limitado, insuficiencia en el uso de maquinaria agrícola, prácticas culturales inadecuadas y escasez de mano de obra para las actividades agrícolas, establecen prioridades que superan las expectativas con respecto a la eficiencia de la producción biológica.

subjective evaluations of similarity or on the presence of conspicuous, subjectively chosen elements, whereas the cluster analysis provides an objective measure of similarity and therefore a more satisfactory criteria for group division (6, 12, 25).

Although a vast amount of information is required to interpret the complex characteristics of the agricultural production systems, there are regions where complexity is relatively reduced by local peculiarities. These areas can therefore be studied as models, in a functional approach to understanding the more complex hierarchical levels of the systems (1). An example is the Barlovento Valley (State of Miranda, Venezuela), one of the tropics' major areas of cacao production, where tenure, land use and agroecological characteristics present a certain homogeneity. This valley is bordered by the Cordillera de la Costa in the north and the Cordillera del Interior in the south (Fig. 1), and the cacao plantations cover a greater extension (24% of a total of 43 751 ha) than other traditional crops in the area (7,11).

<sup>1</sup> Received for publication 3 November 1988.

We are grateful to Cesar Molina (Caucagua Experimental Station, FONAIAP) for providing us with the survey material and helping during field trips. We would also like to thank Dr R. Lairet (PDVSA) for his suggestions on photointerpretation of the Barlovento Valley, and Judith Rosales (IVIC) for her crucial help with the computer program. Thanks are also due to Miss Isabel Gozaine and Miss Jane Meehan for their assistance with the manuscript.

\* Centro de Ecología Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas, Apartado 21827, Caracas 1010-A, Venezuela.

\*\* Sección de Ecología, Instituto de Investigaciones Agrícolas Generales, CENIAP. Apdo 4653, Maracay 2101, Venezuela.

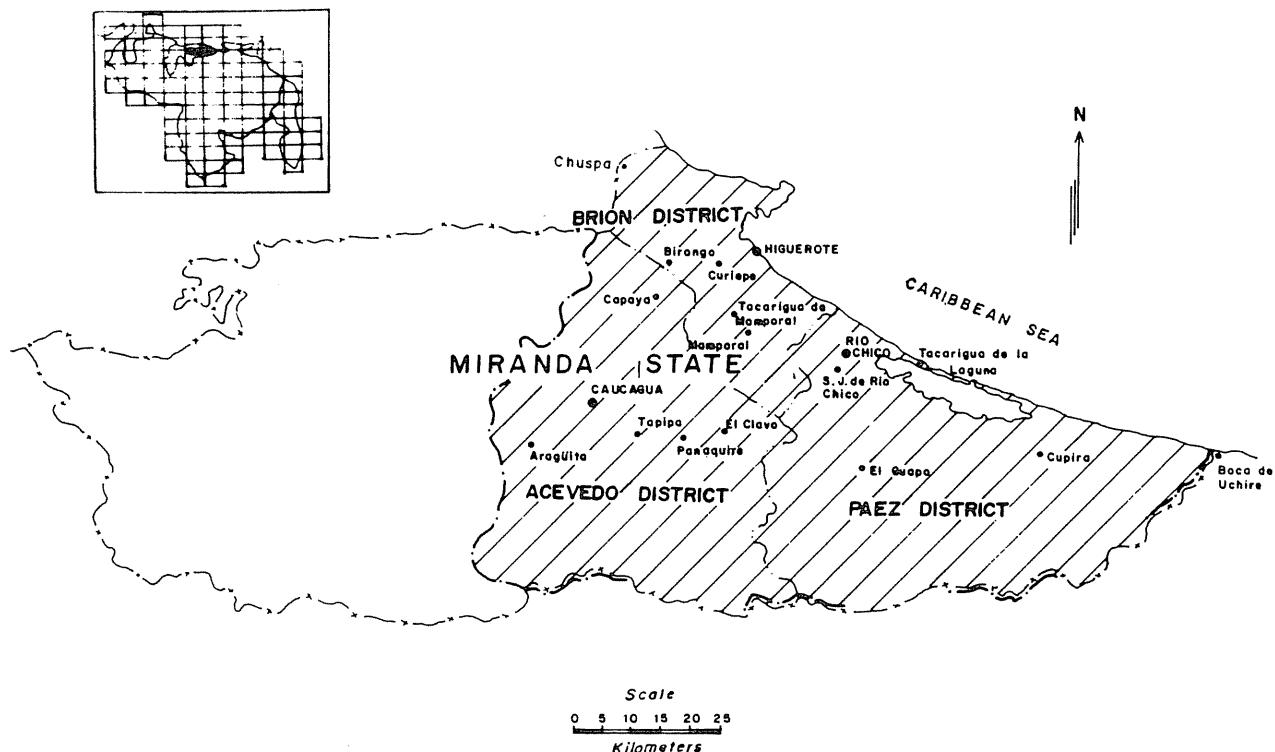


Fig. 1. Region of Barlovento (Miranda State, Venezuela) and relative position.

The purpose of this work is to classify the agricultural production systems of the Barlovento Valley according to cluster analysis techniques.

#### MATERIALS AND METHODS

##### Study area

The study area was set up in the region of Barlovento, State of Miranda, Venezuela (Fig. 1), where annual precipitation ranges from 1 500 to 3 400 mm, and the mean annual temperature is 26°C. The area is characterized by an original dry tropical forest and humid tropical forest, vegetation according to Ewel and Madriz (4). In addition to agricultural activities, human impact on the area due to touristic development has recently increased (9).

Aerial photographs (1:35000) corresponding to the photomosaic Guatire-Cabo Codera-Altagracia de Orituco/Federal District Region-State of Miranda/Mission D-8, 1952 and photoplans (1:25000) of the 1978 aerophotographic mission Chirimena-Guatopo-Sabana de Uchire, were used to interpret the temporary changes in land use, agroecological characteristics, land tenure regimes and socio-economic structure.

VARIABLE	NOMBRE	AS
TYMP	( 1 ) 91/18/25/32/15/14/7/5/3/2/5/7/3/2/7/2/1/7/1/7/7/	
SCNP	( 21 ) 29/37/13/1/2/2/4/3/2/0/9/2/1/2/3/6/3/1/2/4/5/3/1/6/	
SINP	( 22 ) 23/25/14/11/2/2/2/3/0/1/1/4/4/1/1/6/3/3/5/1/5/1/1/2/	
PROMAQ	( 6 ) 93/32/28/5/3/4/9/3/0/6/2/0/3/13/6/6/3/5/1/3/3/0/3/4/3/9/	
LIMAU	( 12 ) 13/22/27/5/3/6/8/7/1/0/18/5/1/2/5/2/2/1/3/3/2/	
TRAC	( 8 ) 25/5/1/4/3/3/5/2/2/3/1/5/1/2/2/3/1/2/3/3/10/6/	
LINO	( 19 ) 27/23/9/6/8/2/1/2/1/0/3/12/0/0/1/0/1/1/1/1/9/12/8/9/	
SINP	( 24 ) 2/23/22/26/3/2/5/5/5/3/2/1/3/6/5/4/4/1/2/2/14/4/3/6/	
STNP	( 23 ) 25/18/19/2/2/8/0/1/3/1/8/2/2/3/3/3/1/0/3/1/0/	
EVT	( 23 ) 35/35/35/1/2/8/4/1/1/4/1/16/16/16/11/9/7/3/2/4/3/2/0/	
LIME	( 23 ) 5/2/2/2/2/12/11/13/1/1/1/1/10/9/5/6/9/4/5/0/	
SINP	( 28 ) 4/2/4/20/0/1/10/5/6/2/0/1/6/1/2/0/	
CIMP	( 29 ) 2/5/4/20/0/2/1/2/1/1/3/0/0/1/1/3/1/2/0/	
NCIMP	( 20 ) 2/5/8/2/6/0/0/2/1/2/0/1/2/2/3/0/	
LIMA	( 26 ) 1/0/12/10/9/3/1/14/13/1/2/4/2/1/	
TIFPRE	( 7 ) 9/2/4/9/0/5/9/10/9/5/1/2/5/2/0/	
LIMREC	( 9 ) 1/1/9/1/0/9/8/2/1/0/1/3/0/	
LIMRE	( 15 ) 1/5/2/8/2/0/2/2/2/5/1/1/0/	
LIMEN	( 10 ) 2/2/1/1/2/2/1/1/2/3/1/	
LIMIN	( 10 ) 1/0/4/5/2/1/2/2/2/0/	
LIMES	( 3 ) 1/0/6/3/2/2/1/2/0/	
AFIP	( 2 ) 2/2/2/2/1/2/5/0/	
LIMSH	( 17 ) 1/0/4/2/0/1/0/	
LIMEC	( 18 ) 1/0/4/2/0/1/0/	
LIMAS	( 14 ) 2/1/2/2/1/0/	
DEDIC	( 4 ) 2/2/2/0/	
ACTIV	( 5 ) 1/2/1/0/	
LIMAT	( 11 ) 2/2/0/	
LIMERA	( 14 ) 0/0/	
LIMOM	( 13 ) 1/0/	

Fig. 2. Clustering tree of variable corresponding to the components of the production systems present at the Barlovento Valley (Miranda State, Venezuela).

### Variables used in production systems analysis

Variables corresponding to the three main components of the production systems (economic rationale, technology and natural environment) were randomly chosen from 487 surveys carried out by the Experimental Station at Caucagua (FONAIAP) for the National Projec. of Bio-Socioeconomic Diagnosis of Production Systems (PNDB). Information was complemented with a survey carried out on farms representative of the sample.

### Description of variables

\* Variables of economic rationale/production objective

- a) Size of farm (TFNP)
- b) Years of farm establishment (AFNP)
- c) Place of residence (LURES)
- d) Dedication to farming (DEDIC)
- e) Other activities apart from production (ACTIV)
- f) Machinery ownership (PROMAQ)
- g) Type of credit (TIPCRE)
- h) Type of work (TRAB)
- i) Credit limitation (LIMCRE)
- j) Infrastructure limitation (LIMINF)
- k) Technical assistance limitation (LIMAT)
- l) Machinery limitation (LIMAQ)
- m) Marketing limitation (LIMCOM)
- n) Medical assistance limitation (LIMAM)
- o) Electricity limitation (LIMEL)
- p) Transport limitation (LIMTRA)
- q) Crop age limitation (LIMEC)

- r) Shading limitation (LIMSOM)
- s) Manual labor limitation (LIMO)

(Source: surveys and interviews with producer.)

#### \* Technology variables

- a) Cacao surface area (SUPCA)
- b) Musa surface area (SUPMU)
- c) Traditional crop surface area: yam, tannia, sweet potato, cassava (SUPTRA)
- d) Orchard surface: avocado, citrus, others (SUPFRE)
- e) Number of crops (NCNP)
- f) Evolution in land use since plot establishment (EVUT)
- g) Weed limitation (LIMMA)
- h) Pest and disease limitation (LIMPE)

(Source: surveys and interviews with producer.)

#### \* Natural environment variables

- a) Soil series (SNP)
- b) Use capacity (CUNP)
- c) Flood limitation (LIMINU)

(Source: Agroecological study maps study maps (8); Study of the agroecological units of Barlovento (13); surveys and interviews with producers.)

### Classification of variables

Variables were separated into two categories: rationale and technology, and natural environment. The

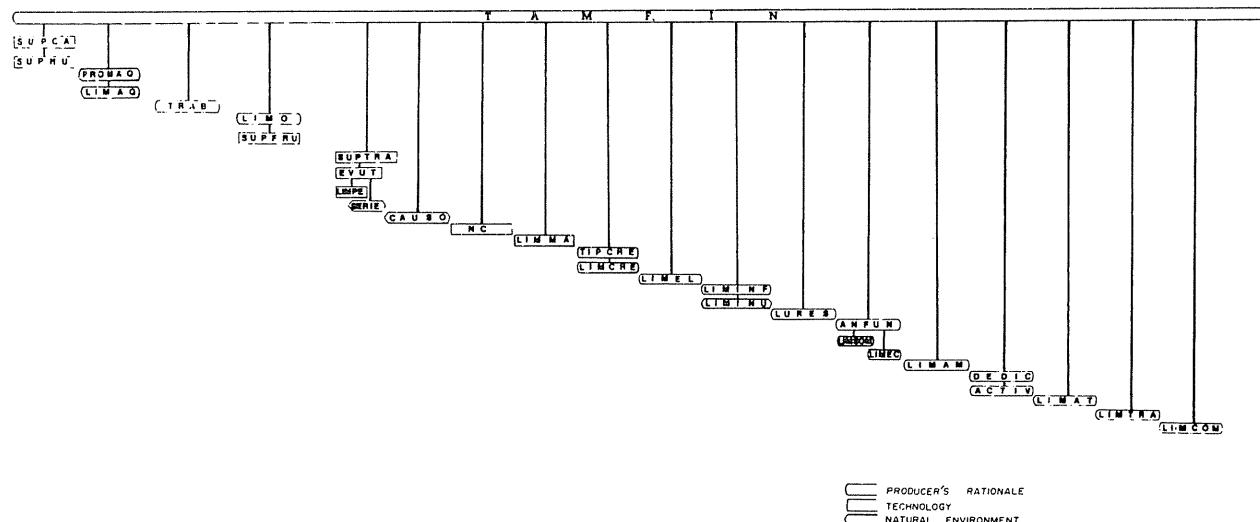


Fig. 3. Dendrogramme of the correlation matrix used to classify production systems at the Barlovento Valley (Miranda State, Venezuela).

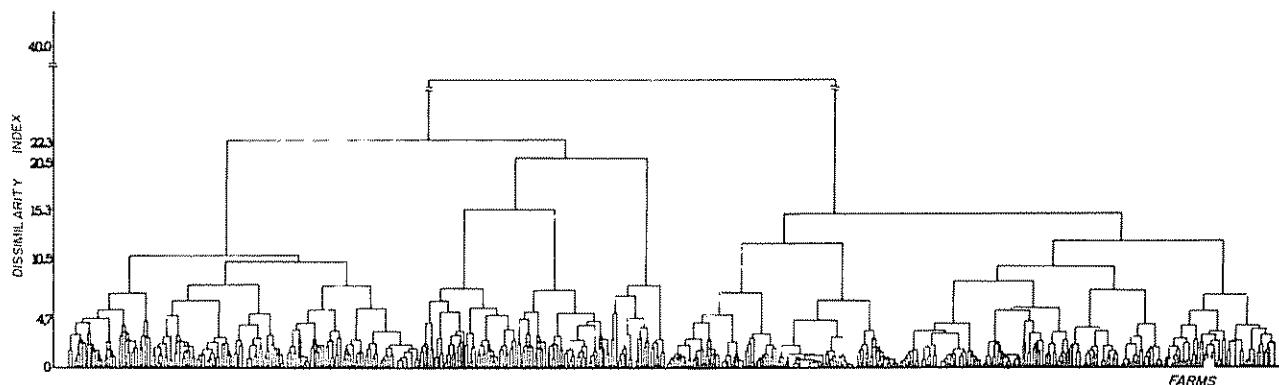


Fig. 4 Classification tree of the variables corresponding to the components of the production systems at the Barlovento Valley (Miranda State, Venezuela).

latter, referred to as the soil series and classified by use capacity, were obtained by placing each of the 82 communities studied on a MAC rural cadastral map (1:10 000), which was then superimposed on soil maps of the agroecological survey (8) (1:50 000) and the FONAIAP-CENIAP agroecological units and political division's maps (13) (1:200 000). The continuous variables (quantitative) were normalized to non-parametric variables with five different frequencies according to range. In this way, two types of non-parametric variables were obtained: dichotomical (present/absent) and multiple ordinates

#### Data treatment: multivariate analysis techniques

Data of the variables were processed with BMDP statistical programs (Biomedical Pack elaborated by Dixon and Brown (3), implemented on the Burroughs 6 700 system, at the School of Computer Studies of the Central University of Venezuela, and modified for the purposes of the present work. Values of the farm (samples or cases) variables were stored on a 487 x 30 matrix (samples vs. variables) as a BMDP data file of fixed format. The variables of the previously described normalization presented numerical values.

#### Classification according to the cluster analysis

The data matrix was processed with the PIM routine to obtain correlations between operational variables (measure of similarity). Maximum similarity criteria were used to combine two groups or clusters of variables.

Systems were classified with the P2M routine (cluster analysis of cases) using the operational variables chosen for the analysis. In this case, the chi-square statistical analysis was used as a measure of

similarity, and the mean distance as a criteria for group linkage

#### RESULTS AND DISCUSSION

Photointerpretations confirmed that land use patterns have not changed over the last 26 years. Thus, the area under cacao cultivation was similar in surface area and distribution, with cacao occupying a greater surface area in relation to other crops (11). However, important changes in land tenure have occurred as a result of a) agrarian reform programs related to improvements in the legal conditions of established producers and b) a relative improvement in wealth distribution. This is possibly a result of greater community participation in agricultural activity due to the allotment of undivided plots of land to each settler (11).

It is important to point out that despite the homogeneity of this area in relation to other land use patterns, changes in the coastal area may be observed (7, 9, 11). These changes include tourist recreational facilities such as buildings and equipment which, in the last few years, have induced modifications in characteristic aspects of the area such as the socio-economic structure. This growth in tourism-oriented activities has prompted migration towards the construction area of a percentage of the active agricultural community, negatively affecting production of this traditionally agricultural area (9).

The classification tree, with the correlation coefficients between variables and the corresponding dendrogram of the correlation matrix appear in Figs 2 and 3, respectively. The highest significant correlation can be observed between farm size and other variables, especially cacao and *Musa* surface area, which are the main crops in the area under study. It was also obser-

ved that machinery limitations and ownership correlated highly with the previously mentioned variables, a probable result of facilitated agricultural activities in relation to farm size and mechanization.

A high correlation was also obtained with manual labor limitations, possibly explained by difficulties due to the movement of workmen toward other areas of occupational activity (9).

Regarding the variables selected in accordance with the methodological approach of Arias *et al.* (1), soil series, usage capacity and flood limitation presented a significant mean correlation with farm size, cacao surface area and *Musa* surface area; whereas the variables infrastructure, shading, and crop age limitation and type of credit showed a smaller significant correlation with the remaining variables.

Fig. 4 shows the classification tree for the operational variables. Five groups of farms were formed. The first group consists mainly of farms where cacao is cultivated in association with *Musa* in surface areas varying in size between 0.5 and 150 hectares (29 percent of total farmlands). Since the farms were founded less than 30 years ago, they are apparently exempt from problems of crop senescence. The activities of producers are mainly farming without the use of machinery. The second group represents 16 percent of the total, with a surface area varying between 0.25 and 225 hectares. Sixty-nine percent of the crops in this group are orchards, either associated with traditional crops or growing as monocultures and associations of cacao with *Musa* are also included. Fifty percent of the producers are totally dedicated to crop farming, whereas others may carry out different activities which represent an additional income. The third group includes the largest farms, varying in size between 40 and 900 hectares, covered with new plantations of cacao-*Musa* as the dominant association. Producers are fully dedicated to farming and they use machinery in their activities. The farms in the fourth group (20 percent of the total) were founded more than 30 years ago and vary in size between 0.5 and 15 hectares. Cacao and cacao-*Musa* associations are the dominant crops and the fifth plantation senescence does affect yield. The farms in the fifth group (13 percent of the total) range in size between 0.5 and 120 hectares, although 95 percent are 12 hectares or less. The cacao-*Musa* association is dominant, but in approximately 20 percent of the plots, other associations of orchards and traditional crops are found.

A classification tree (Fig. 5) based on previously discussed group classifications was elaborated defining the determinant variables for each level (1, 2, 5).

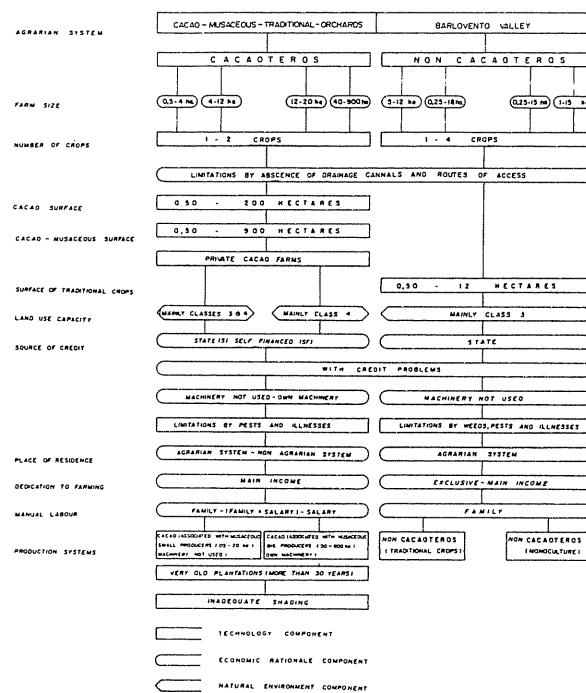


Fig. 5. Classification tree of the production system at the Barlovento Valley (Miranda State, Venezuela).

Two levels are described, the first one involving: a) all producers of cacao as a monoculture or associated with *Musa* (approximately 60 percent of total producers) and b) non-cacao producers (39 percent of the total) mainly dedicated to the production of mono-and multiple crops of cassava, yam, tannia and orchards of citrus and avocado. The second level includes four categories of producers. The first consists of farms owned by small producers cultivating cacao associated with *Musa* on a surface area of 0.50 to 20 ha where machinery is not used. They are financed by state agencies and generally have problems with loans. These farms (55 percent of the total area) are located on waterlogged lands of types three and four according to their use capacity system. The second category includes farms owned by large producers cultivating cacao associated with *Musa* on a surface area of 50 to 900 ha mechanized under a high input technology. These producers are generally self-financed, live within the agrarian system on private lands of types two and three, and represent five percent of the total. The third group are non-cacao producers, mainly dedicated to cultivating traditional associated crops on plots between 0.25 and 17 hectares of type three land, and represent 23 percent of all producers. Associations of traditional crops with orchards such as avocado and citrus are usually present, which means greater diversification. The producers are state-financed, and family labor

predominates. The last group consists of non-cacao producers dedicated to monoculture (*Musa*, orchards or traditional crops) planted without specific location in the area on farms oscillating between 0.25 and 10 ha. These producers are exclusively dedicated to subsistence agricultural farming with domestic manual labor, and represent approximately 17 percent of the total. The farms of this group are mainly located on type three land.

Results of the above classification indicate that in the Barlovento area there is a predominance of farms with a production system hampered by constraints mainly influenced by factors unrelated to primary production potential. This situation seems to be associated with: a) high production costs and an inadequate system of credits which does not respond to the needs of cacao production in the area; b) scarce use of agricultural machinery and adequate technology due to very limited technical assistance to the

producers, which has contributed to maintain the traditional farming system of low yield; c) a decrease in manual labor for agriculture, mainly due to emigration towards urban centers and to the construction of recreational tourist complexes in the area. This emigration of labor is a reflection of inadequate living conditions and the scarcity of resources in the agricultural areas, discouraging producers from remaining in the area. However, potential land use for agricultural activities in the Barlovento area is very high, as observed in certain farms of the area managed under intensive agriculture. Therefore, the development of an appropriate technology for maximum crop yield is necessary. The design of such a technology should entail a knowledge of the main problems affecting the production systems of the area, which to a greater or lesser extent have been detected through the present classification.

#### LITERATURE CITED

1. ARIAS, L.F.; CASTILLO, J.; GARCIA, R.; GOMEZ, A.; MIRELES, M.; ROSELLO, M.; SALAZAR, L. 1981. Metodología empleada por el FONAIAP para el estudio de los sistemas de producción agropecuaria. Caracas, Ven., CENIAP-FONAIAP. Publicaciones del Instituto de Investigaciones Agrícolas Generales.
2. DELGADO DE BRAVO, M.R. 1977. Análisis factorial Ejemplos de aplicación en geografía. (Trabajo de ascenso). Mérida, Ven., Universidad de Los Andes, Facultad de Ciencias Forestales, Escuela de Geografía.
3. DIXON, W.; BROWN. 1979. Biomedical programmes P Series. Berkeley. Berkeley University of California
4. EWEL, J.; MADRIZ, A. 1968 Zonas de vida de Venezuela Caracas. FONAIAP, MAC.
5. GORDON, A.D. 1981. Classification methods for the exploratory analysis of multivariate data. New York, Chapman and Hall.
6. GREIG-SMITH, P. 1983 Quantitative plant ecology. 3 ed. Oxford, England, Blackwell Scientific publications.
7. GUERRA, F. 1984. Esclavos negros, cimarroneras y cumbes de Barlovento, Caracas, Ven., Cuadernos Lagoven
8. MAC. 1963. Estudio agrológico tipo reconocimiento de la zona de Barlovento. Maracay, Ven., Centro de Investigaciones Agropecuarias.
9. MARNR 1980 Esquema de ordenamiento del litoral Barlovento Caracas, Ven.
10. MESA, S. 1980. Bases conceptuales para el estudio de la agricultura: los sistemas de producción agrícola. Maracay, Universidad Central de Venezuela, Facultad de Agronomía
11. MOLINA, C.; ARIAS, L.; COURBAIN, R. 1983. Diagnóstico agroeconómico y social del cultivo de cacao en los asentamientos campesinos de Barlovento. Venezuela, Estación Experimental Cauca-gua, FONAIAP.
12. ORLOCI, L. 1978. Multivariate analysis in vegetation research. Dr. Junk, 2 ed The Hague.
13. SANCHEZ, A. 1982. Unidades agroecológicas del área de Barlovento en el Estado Miranda Maracay, Ven., FONAIAP-CENIAP.

# Conservación de las Semillas del Cacao (*Theobroma cacao*)<sup>1</sup>

J.E. Sánchez\*, A. Velázquez\*\*

## ABSTRACT

This study was undertaken at the Rosario Izapa Experimental Site in the State of Chiapas (Mexico), with the aim of proving the capacity of polyethylene glycol (PEG) in conserving the viability of cocoa seeds, and to verify whether the presence of pod pieces, pulp juice or charcoal can be used to delay seed germination. The first part of the study was carried out in Petri dishes with 10 seeds per dish of the RIM-117 clone, using PEG (with molecular weights of 300, 1 500, 3 000, 4 000 and 6 000) in addition to thiram or cholorotalonil. Later, groups of 100 seeds in polyethylene bags were used with pod pieces, pulp juice and charcoal. After one month's storage at 28°C, the percentage germination was evaluated by seeding on sterile soil. Charcoal was shown to be the best conservation material (72%) in groups of 100 seeds; nonetheless, the percentage germination rate decreased in proportion to an increase in the number of seeds per bag. Storage in an aqueous solution in Petri dishes with PEG-3 000 + thiram conserved 97.5% of seeds without husk. However, this method did not work with polyethylene bags with 100 seeds. The incorporation of pod pieces and pulp juice does not preserve viability.

## COMPENDIO

Este trabajo se realizó en el Campo Experimental Rosario Izapa en el estado de Chiapas, con el propósito de probar la capacidad del polietilen glicol (PEG) en la conservación de la viabilidad de las semillas de cacao y también, si la presencia de trozos de mazorcas, jugo de pulpa o carbón pueden ser usados para retardar la germinación. La primera parte del estudio se realizó en cajas de Petri, con 10 semillas del clon RIM-117 usando PEG (con peso molecular 300, 1 500, 3 000, 4 000 y 6 000) más thiram o clorotalonil. Posteriormente, se utilizaron lotes de 100 semillas en bolsas de polietileno con trozos de mazorca, jugo de pulpa y carbón vegetal. Al término de un mes de almacenamiento a 28°C, se evaluó el porcentaje de germinación por siembra directa de las semillas en tierra estéril. El carbón vegetal resultó ser el mejor material conservante (72%) en lotes de 100 semillas; sin embargo, a medida que aumentó el número de semillas en la bolsa, disminuyó el porcentaje de germinación. El almacenamiento en cajas de Petri, en medio acuoso, con PEG-3 000 + thiram, conservó el 97.5% de semillas sin cutícula; sin embargo, este método no dio resultado al utilizarse en bolsa de polietileno con 100 semillas. La incorporación de trozos de mazorca y jugo de mucílago no permite preservar la viabilidad.

## INTRODUCCION

**E**n México, el cacao se siembra en los estados de Tabasco (42 000 ha) y Chiapas (32 182 ha). Una dificultad importante, al tratar de transportar semillas a regiones alejadas de las zonas productoras, es la conservación de la viabilidad ya que ésta se pierde en menos de una semana.

El Campo Experimental Rosario Izapa, localizado en el estado de Chiapas, produce y distribuye semilla hibridada de cacao la cual se siembra tanto en las zonas productoras del estado, como en otras zonas de Oaxaca y Veracruz. Tradicionalmente, la semilla se ha transportado en mazorca; sin embargo, este traslado resulta oneroso por el peso y el volumen, la semilla tiene un período corto de viabilidad y el acarreo

facilita la diseminación de enfermedades. En vista de que este Campo Experimental también realiza viajes de recolección de germoplasma, el transporte en mazorca presenta una dificultad más porque obliga a limitar la duración de los viajes al período de tiempo que permite la viabilidad de la semilla.

Investigaciones preliminares hechas en este Campo permitieron confirmar la necesidad de usar temperaturas cercanas a los 20° para mantener la viabilidad de la semilla. Dadas las condiciones climáticas en las regiones productoras de cacao el uso de temperaturas controladas implica costos elevados por adquisición de equipo y dificultades de manejo y transporte. Debido a ello, esta investigación se enfocó hacia la búsqueda de condiciones prácticas de almacenamiento a temperatura ambiente que permitieran conservar, al menos un 70% de germinación durante un mes.

Mumford y Brett (5), usando polietilen glicol 6 000, en tres concentraciones, a 25°C y trabajando de manera casi estéril, sin fungicida, lograron conservar la viabilidad de 100% de las semillas, durante 25 semanas. Estos mismos autores sugirieron el uso de thiram para evitar la rigurosidad del trabajo aséptico.

1 Recibido para publicación el 2 de diciembre 1988.

\* Investigador del Programa Cacao. CERI. Apartado Postal 96 Tapachula, Chiapas, México.

\*\* Tesista del Programa Cacao. Estudiante del área de Ciencias Químicas, Campus IV, Convenio UNACH INIFAP, México

El carbón vegetal fue usado con éxito, como conservante, por Evans (1), quien colocó semillas perforadas en un recipiente con carbón y conservó el 70% de viabilidad durante 13 semanas.

#### REVISION DE LITERATURA

La conservación de semillas de cacao a temperatura ambiente presenta problemas, ya que el cacao es una semilla recalcitrante que trata de germinar inmediatamente después de ser cosechada. En una etapa anterior de este trabajo, se logró conservar el 75% de semillas a 20°C durante un mes y el 50% a 28°C al mezclar éstas con cascabello, en presencia de thiram en bolsa de polietileno (6).

La presencia de inhibidores naturales de germinación en el fruto de cacao, ya ha sido estudiada Suter, citado por Forsyth y Quesnel (2), encontró que existe un inhibidor volátil de germinación en la pulpa de cacao el cual permite que el 25% de semillas no peladas, en una caja de Petri, sea suficiente para retardar al menos seis días la germinación del 75% restante de semillas peladas. Por su parte, Holden (3), encontró que la mazorca de cacao contiene un inhibidor de germinación. Mumford y Brett (5), con base en estos resultados, usaron extractos de mazorca para crear condiciones de conservación similares a las que rodean a la semilla recién cosechada; sin embargo, no pudieron conservar las semillas viables por mucho tiempo.

King y Roberts (4), usaron polietilen glicol (PEG) 6 000 en solución acuosa para conservar la viabilidad de la semilla de cacao. Como polietilen glicol o pluracol, se conoce una gama de polímeros líquidos y sólidos con fórmula general H ( $OCH_2 - CH_2$ ). OH que son solubles en agua y de uso muy variado en la industria. Ellos hicieron pruebas con dos temperaturas y tres concentraciones diferentes de PEG 6 000, con fungizone. Obtuvieron 6 6% al cabo de 24 días de conservación a 20°C y 47% a 15°C después de un mes; sin embargo, manifestaron que probablemente se mejorarian estos resultados con el uso de otro fungicida.

#### MATERIALES Y METODOS

El presente trabajo se realizó entre junio de 1986 y julio de 1987, en las instalaciones del Campo Experimental Rosario Izapa, en donde se presenta una temperatura media anual de 28.8°C y una precipitación de 3 500 a 4 000 mm por año.

#### Materiales

Como material biológico, se usaron semillas frescas, pulpa y restos de mazorca del clon RIM-117. Se

usó polietilen glicol (PEG), fabricado comercialmente como pluracol, con pesos moleculares de 300, 500, 3 000, 4 000 y 6 000. El carbón vegetal se adquirió en el mercado local y para utilizarlo, se trituró en un molino de nixtamal hasta obtener un polvo fino que se secó al horno durante dos horas a 70°C.

#### Diseño experimental

Se establecieron dos series de experimentos, en la siguiente forma: la primera serie comprendió un total de 21 tratamientos con cuatro repeticiones, bajo un diseño totalmente al azar. En este caso, para formar cada repetición, se colocaron 10 almendras de cacao (con mucílago, sin mucílago o sin cutícula), en una caja de Petri (400 g/l) más fungicida (Clorotalonil 1.5 g/l o thiram 2.5 g/l) (Cuadro 1). El tratamiento sin fungicida ("estéril") se preparó manipulando las almendras de las mazorcas en forma rigurosamente aséptica (a la flama) y mezclándolas con la solución de PEG esterilizada por filtración en filtro Millipore de 0.3 micras.

El periodo de almacenamiento, a la oscuridad y temperatura ambiental (28°C) fue de un mes.

La segunda serie comprendió nueve tratamientos con cuatro repeticiones, también bajo un diseño completamente al azar. En este caso, se colocaron 100 semillas de cacao mezcladas con partes del fruto más fungicida en bolsa de polietileno (Cuadro 4).

Como testigo se usó el método propuesto por Sánchez y Jiménez (6), el cual consiste en guardar, a temperatura ambiente, lotes de 100 semillas sin mucílago, con 50 g de cascabello seco de café más 80 ml de nitrazán (2.25 g/l), en bolsas de polietileno.

Posteriormente a estos experimentos, se efectuó un ensayo con el mejor conservante (carbón vegetal) para evaluar su eficiencia, utilizando cantidades de 100, 300, 500 y 700 semillas en bolsas de polietileno, durante un mes de almacenamiento.

El porcentaje de germinación de los diferentes tratamientos se calculó de la siguiente manera: para la primera serie de experimentos se sembraron las 10 semillas de cada repetición y para la segunda serie, se sembraron cuatro muestras de 10 almendras en tierra estéril (solución 4:2 de etanol 90% más formol 30%); 15 días después de la siembra, se observó el número de plantas que habían crecido.

## RESULTADOS Y DISCUSION

En el Cuadro 1 se presenta el porcentaje medio de germinación de las almendras que fueron almacenadas, durante un mes, en una caja de Petri, en presencia de diferentes pesos moleculares de PEG. Se observa que, al final del período de almacenamiento, el mejor tratamiento, según la prueba de Tukey ( $P = 0.05$ ) fue PEG 3 000 estéril que obtuvo el 97.5% de almendras viables sin cutícula, seguido por el PEG 3 000 thiram con almendra sin cutícula (90%).

El uso de fungicida (thiram) es un factor indispensable, desde el punto de vista fitosanitario, ya que redujo la proliferación de hongos que dañan la semilla y reduce su viabilidad. El clorotalonil, además de inhibir el desarrollo de hongos, probablemente inhibió la germinación de las semillas ya que observó un menor porcentaje de germinación para diferentes condiciones de almendra y diferentes pesos moleculares de PEG, con respecto al thiram. El análisis estadístico de parcelas divididas entre el efecto fungicida (parcela grande y el PEG/parcela chica) sobre la almendra sin cutícula, reveló que existen diferencias estadísticas causales por el uso de fungicida. La comparación de la media de los valores de germinación con este análisis señala diferencias altamente significativas en favor del thiram (Cuadro 2).

Cuadro 1. Porcentaje de germinación de semillas de cacao después de un mes de almacenamiento en presencia de polietilen glicol en caja de Petri.

No.	Descripción del tratamiento	% de germinación
Semillas	PEG*	
1	Sin cutícula	97.5 a
2	Sin cutícula	90.0 ab
3	Sin cutícula	85.0 bc
4	Sin cutícula	81.8 bcd
5	Sin cutícula	80.0 bcde
6	Sin mucílago	77.5 bedel
7	Sin mucílago	62.5 cdefg
8	Sin mucílago	57.5 deigh
9	Con mucílago	50.0 fghi
10	Sin cutícula	47.5 ghij
11	Sin mucílago	42.5 ghijk
12	Sin cutícula	40.0 ghijkl
13	Sin cutícula	40.0 ghijklm
14	Sin mucílago	40.0 ghijklmn
15	Con mucílago	17.5 klmnñ
16	Con mucílago	12.5 klmnññ
17	Con mucílago	0
18	Sin cutícula	0
19	Sin cutícula	0
20	Sin cutícula	0 X = 38.5
21	Con mucílago	0 C.V. = 17.2%

\* e = Estéril    c = Clorotalonil    t = thiram

En lo que se refiere a los diferentes tipos de PEG utilizado, hubo diferencias notables entre los pesos moleculares de 300 y 1500, con respecto a los de 3 000, 4 000 y 6 000 pero no entre éstos. La explicación de ello puede encontrarse en función de la presión osmótica ejercida, la cual, para una concentración dada, es mayor cuando aumenta el peso molecular.

La almendra sin cutícula, se conserva mejor que cuando ésta no se desprende (Cuadro 3). Esto quizás se debe a que la película protectora delgada de PEG que se forma sobre la semilla. Como lo interpretan Mumford y Brett (5), esa película permite solamente un mínimo intercambio de oxígeno y mantiene la presión osmótica adecuada para lograr un balance de agua entre absorción y deshidratación de la semilla; esto no ocurre de la misma forma en la almendra con mucílago. Probablemente, aunque permeable, la cutícula representa una barrera más que interfiere en el intercambio gaseoso y disminuye la acción osmótica del PEG.

Los resultados medios de la germinación, en el ensayo de conservación de la semilla de cacao en presencia de partes del fruto de cacao y de carbón vegetal en bolsas de polietileno, se presentan en el Cuadro 4. Puede observarse que el carbón vegetal resultó ser el mejor tratamiento para conservar las semillas en estas condiciones, superando aún al testigo cascabillo de café + thiram, sin mucílago. El carbón vegetal, como conservante, presenta la propiedad de absorción de ciertas sustancias líquidas o gaseosas, como agua y oxígeno. Posiblemente, esto explique que dicho conservante haya permitido conservar mejor la viabilidad de las semillas.

Ningún tratamiento de esta serie fue capaz de conservar la viabilidad de las almendras de todo el lote por un mes, aún cuando se usó fungicida para el control de hongos. La incorporación de polietilen glicol en solución acuosa a lotes de 100 almendras en bolsas de polietileno, no dio buenos resultados, según los experimentos en caja de Petri (0% de germinación). Es posible que, al conservar cantidades mayores de 10 almendras en solución acuosa de PEG, la acción osmótica de éste persista, pero, el intercambio gaseoso se dificulta en el centro del lote almacenado y por lo tanto, las semillas mueren por asfixia. Este hecho se comprobó, en cierta forma, al repetir el experimento de caja de Petri + PEG – 3 000 – thiram, pero, invirtiendo la posición de la caja de Petri (con la tapa hacia abajo). En este caso, se obtuvo 0% de germinación seguramente porque la posición de la caja y de la solución sobre las almendras dificultó el intercambio gaseoso.

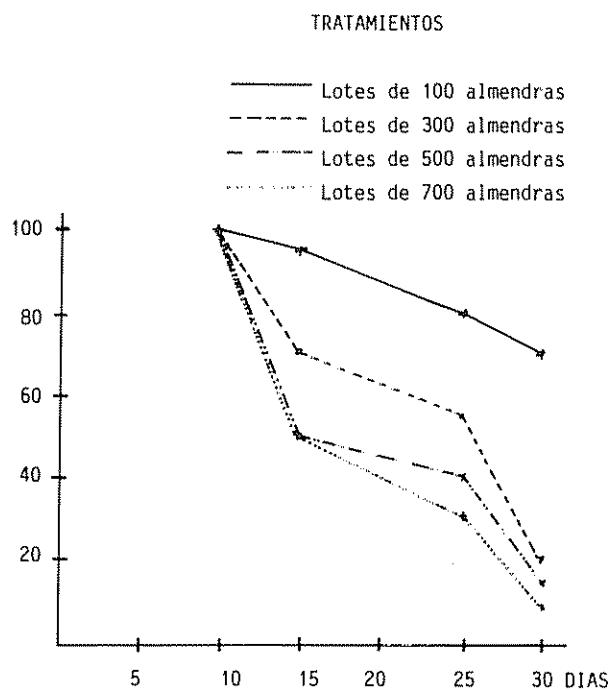


Fig. 1 Efecto de la cantidad de almendras de cacao *Theobroma cacao* L., sobre su germinación, al conservarlas en carbón vegetal, en bolsa de polietileno.

Al usar trozos de mazorca y jugo de mucílago no se obtuvieron buenos resultados; es probable que estos elementos, que en el fruto sano funcionan como inhibidores de la germinación, sean eficaces aún en presencia de aire; sin embargo, la semilla no es capaz de soportar por largos períodos esta inhibición sin realizar actividades metabólicas adversas (5).

En la Fig. 1 se muestra la evaluación media de la pérdida de poder germinativo de lotes de diferentes cantidades de almendras de cacao, tratadas con carbón vegetal por un mes. En ella se observa que es posible conservar, durante 10 días, el 100% de germinación aún en lotes de 700 almendras; sin embargo, a partir de un tiempo de almacenamiento, la viabilidad

Cuadro 2. Efecto del fungicida y del polietilen glicol sobre la germinación de semillas de cacao sin cutícula (datos transformados por Arc Sen %).

Fuente de variación	PEG			$\bar{X}$
	3 000	4 000	6 000	
Thiram	71.6	67.5	65.7	67.5 DSM 8.5 al 5%
Clorotalonil	39.6	39.2	39.1	39.1
$\bar{X}$ PEG	55.4	53.3	42.4	
	DSM 5 45 al 5%			

disminuyó en todos los lotes y la pérdida de la misma es más rápida a medida que aumenta la cantidad de almendras en el lote. Así, mientras que en un lote de 700 almendras, al cabo de un mes de almacenamiento, se conserva viable el 6% de las almendras, en bolsas con 100 se puede conservar el 70%. El aumento del contenido de oxígeno en la atmósfera circundante, en muchos casos, estimula la germinación de la semilla intacta; en este caso, al aumentar el volumen de almendras almacenadas se disminuye el contacto de éstas con el oxígeno y por lo tanto, se limita la respiración en el centro del lote. Por otra parte, la semilla, al continuar respirando, agotará el oxígeno disponible, desprenderá bióxido de carbono y calor, lo cual es un factor limitante de la viabilidad de la semilla.

## **CONCLUSIONES**

1. El almacenamiento de almendras de cacao, en caja de Petri, a temperatura ambiente, conserva un 97.5% de germinación al utilizarlas sin cutícula, en presencia de thiram y de polietilen glicol 3 000, después de un mes. En bolsa de polietileno, este efecto no persistió.
  2. El carbón vegetal permite mantener el 71.75% de la germinación de lotes de 100 almendras, en bolsa de polietileno, durante un mes de almacenamiento, a temperatura ambiente.
  3. Aparentemente, el almacenamiento de almendras viables de cacao está fuertemente supeditado a un intercambio mínimo gaseoso, por lo que lotes mayores de 100 almendras, en presencia de carbón vegetal, pierden pronto su viabilidad.
  4. El uso de trozos de mazorca y jugo de mucílago como conservantes, no es adecuado para prolongar el periodo de almacenamiento de las almendras de cacao.

Cuadro 3. Efecto del polietilen glicol y las condiciones de la semilla de cacao sobre su germinación (datos transformados por Arc Sen %).

Condiciones de la semilla	Peso molecular PEG						$\bar{X}$
	300	1 500	3 000	4 000	6 000		
Sin cutícula	0	43.5	71.6	67.5	65.7	49.6	
Con mucílago	0	40.6	45	24.5	0	22	
						DSM 9.4 al 5%	
$\bar{X}$	0	42	58.3	48	38.8		
						DSM 3.8 al 5%	

Cuadro 4. Porcentaje de germinación de semillas de cacao, en presencia de partes del fruto o carbón vegetal, a un mes de almacenamiento, en bolsas de polietileno.

1. Sin mucílago, carbón vegetal	71 75 a
2. Sin mucílago, thiram-cascabillo (T)	41 87 b
3. Sin mucílago, trozos de mazorca-cascabillo	5 67 c
4. Sin mucílago, trozos de mazorca-clorotalonil cascabillo	3 75 cd
5. Sin mucílago, trozos mazorca-clorotalonil cascabillo	3 3 d
6. Jugo de mucílago -- cascabillo	0 e
7. Jugo de mucílago -- clorotalonil -- cascabillo	0 e
8. Sin mucílago, PEG 3 000 thiram -- cascabillo	0 e
9. Sin cutícula, PEG 3 000 thiram	0 e
C.V. = 16%	

#### LITERATURA CITADA

- EVANS, H. 1950. Results of some experiments on the preservation of cacao seed in viable condition Tropical Agriculture 27:48-55.
- FORSYTH, W.G.; QUESNEL, V.C. 1958. Studies on cocoa curing 1956-1958 Palmira, Col. p 181.
- HOLDEN,<sup>1</sup> M 1961. Biochemical changes in cocoa fermentation Brit Food: Research Association Science and Technology Surveys 38:31-40
- KING, M W ; ROBERTS, E.H. 1982. Seed Science and Technology 10:535-540.
- MUMFORD, P.M.; BRETT, A.C. 1982. Conservation of cacao seed. Tropical Agriculture 59(4):306-310.
- SANCHEZ VAZQUEZ, J.; JIMENEZ, F. 1985. Almacenamiento de semillas de cacao para siembra. Informe Anual de Actividades México, SARH - INIFAP - CERI

# Método de Inoculación y Evaluación de la Resistencia a *Phytophthora palmivora* en Frutos de Cacao (*Theobroma cacao*)<sup>1</sup>

W. Phillips-Mora\*, J.J. Galindo\*

## ABSTRACT

Four methods of inoculation of *P. palmivora* were tested under field conditions in Turrialba, Costa Rica (602 masl 22°C, 2 600 mm). The best method was the inoculation of five-month-old cocoa fruits with a zoospore suspension absorbed in two filter paper discs of 1 cm in diameter and placed on opposite sites of the "equator" of each fruit. Fruits were incubated in a humid chamber for 48 hr. A zoospore concentration of  $15 \times 10^4$  zoospores ml<sup>-1</sup> was selected experimentally, as well as an inoculation period in the field not longer than 30 min. The infectious capacity of the zoospores sharply decreased thereafter. Two hundred and four cultivars of cocoa were inoculated. Severity varied from lesions with 0.9 cm (Pound-7 and Catie-1 000) to 8.6 cm (CC-48), whereas incidence was over 90% in most of the cultivars. There was no correlation between severity and incidence. Based on severity, 19 cultivars were classified as resistant, 93 moderately resistant, 61 moderately susceptible and 31 susceptible. The resistant cultivars were: Pound-7, CATIE-1000, CC-256, EET-59, EET-64, TSHN-812, SPA-5, UF-703, CC-214, EET-48, ICS-44, EET-250, SPA-11, SPA-17, CC-42, CC-83, CC-71, CC-232, and UF-602. A second evaluation of the resistant cultivars produced similar results.

## INTRODUCCION

**L**a mazorca negra del cacao (*Theobroma cacao* L.), causada por *Phytophthora* spp, es endémica en las áreas cacaoteras y responsable de hasta un 50% de pérdidas en la producción (3). En Centroamérica se ha informado de dos especies asociadas con la enfermedad: *P. palmivora*, que es la más importante y distribuida, y *P. capsici*, presente en Guatemala y El Salvador (8).

*Phytophthora* causa necrosis en varias partes de la planta, pero su efecto más importante ocurre en el fruto, donde produce lesiones pardas con bordes definidos y crecimiento rápido.

1 Recibido para publicación el 26 de enero 1990.

Los autores agradecen a los señores Fernando López P., Luis Guillermo Salazar G., Carlos Ramírez, Edwin Castillo F. Y Francisco Dittel R., ya que sin su valiosa participación no hubiera sido posible la realización de esta investigación.

\* Programa de Mejoramiento de Cultivos Tropicales, Apdo. 7170, CATIE, Turrialba, Costa Rica.

## COMPENDIO

Se evaluaron cuatro métodos de inoculación de *P. palmivora* en frutos de cacao bajo condiciones de campo en Turrialba, Costa Rica (602 msnm, 22°C, 2 600 mm). El método más adecuado consistió en la inoculación de frutos de cinco meses de edad, con una suspensión de zoosporas aplicada mediante dos discos de papel de filtro de 1 cm de diámetro, colocados en lados opuestos del 'ecuador' del fruto. Los frutos fueron incubados en una cámara húmeda durante 48 h. Para asegurar una alta infección, se seleccionó experimentalmente una concentración de  $15 \times 10^4$  zoosporas ml<sup>-1</sup> y una duración máxima de la inoculación en el campo de 30 min., debido a que se determinó que la capacidad infectiva del inóculo se reducía. Seis días después de la inoculación se evaluó la incidencia, y la severidad mediante el diámetro de la lesión de mayor tamaño en cada fruto. Con el método de discos de papel se evaluó 204 cultivares. Se encontró que la severidad varió de 0.9 cm ('Pound-7' y 'Catie-1000') a 8.6 cm ('CC-48'), en tanto que la incidencia fue en casi todos los cultivares superior al 90%. No se obtuvo correlación entre la incidencia y la severidad. Los cultivares fueron clasificados de acuerdo con su severidad obteniéndose 19 cultivares resistentes, 93 moderadamente resistentes, 61 moderadamente susceptibles y 31 susceptibles. Los cultivares resistentes fueron: 'Pound-7', 'Catie-1000', 'CC-256', 'EET-59', 'EET-64', 'TSHN-812', 'SPA-5', 'UF-703', 'CC-214', 'EET-48', 'ICS-44', 'EET-250', 'SPA-11', 'SPA-17', 'CC-42', 'CC-83', 'CC-71', 'CC-232' y 'UF-602'. Al reevaluar los cultivares resistentes se observó que conservaban consistentemente su reacción.

El combate de la enfermedad mediante resistencia genética es el más ventajoso para el agricultor. Se ha determinado amplias diferencias de susceptibilidad a *P. palmivora* en condiciones de infección natural (22, 26, 27), así como bajo diversos métodos de inoculación artificial, recopilados por Rocha (18), Blaha (2) y Lawrence (10).

En las inoculaciones artificiales de frutos se ha utilizado mazorcas unidas al árbol (10, 25) o desprendidas de este (6, 23). Asimismo, se ha usado frutos intactos (6, 10) o con heridas hechas artificialmente (13).

El inóculo más empleado ha sido las suspensiones de zoosporas, pero también se ha usado micelio, esporangios o fragmentos de mazorcas enfermas (2, 10, 14). Las suspensiones han sido aplicadas inyectando (15), atomizando o sumergiendo los frutos en ellas

(25), o bien, reteniéndolas en las estrías naturales de las mazorcas (14) o mediante pequeños recipientes de plasticina (3, 21). Menos frecuente ha sido la absorción del inóculo en papeles de filtro (25) o motas de algodón (15) que luego son colocados sobre el fruto.

Los principales parámetros usados para medir la resistencia han sido la incidencia y el diámetro de la lesión (10). Algunos autores han empleado además el momento de aparición de los síntomas y de las fructificaciones del hongo, la cantidad de lesiones por fruto y la profundidad, el área y la tasa de desarrollo de la lesión (3, 14, 21).

Lawrence (10), evaluó en Costa Rica varios métodos de inoculación descritos en la literatura y encontró que el más confiable era inocular frutos de cinco meses unidos al árbol con una suspensión de zoosporas. Retuvo el inóculo sobre el fruto con plasticina moldeada y seleccionó arbitrariamente una concentración de  $2 \times 10^5$  zoosporas  $\text{ml}^{-1}$  ( $2 \mu\text{l ml}^{-1}$ ). Concentraciones similares a ésta han sido usadas por otros autores, tales como Blaha y Lotodé (3) y Rodríguez (21).

Los objetivos de esta investigación fueron: i) probar un método de inoculación y evaluación de la resistencia de materiales de cacao a *P. palmivora*, que sea simple y consistente y que reproduzca lo mejor posible las condiciones naturales de infección; y ii) evaluar con este método los cultivares incluidos en la Colección de Germoplasma de Cacao del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE).

#### MATERIALES Y METODOS

Los experimentos fueron realizados en la Colección de Germoplasma de Cacao y en el Laboratorio de Fitopatología del CATIE en Turrialba, Costa Rica (602 msnm, 22°C, 2 600 mm de precipitación).

En todos los experimentos se usó el aislamiento CATIE-964, el cual fue obtenido en Turrialba y cuya patogenicidad ha sido comprobada. El inóculo se preparó a partir de colonias del hongo que crecieron en platos Petri sobre el medio Agar-V8-CaCO<sub>3</sub> (18; 20 y 0.3%) durante 10 días en una cámara a 25°C y períodos alternos de 12 h luz/oscuridad. Para la preparación de las suspensiones se siguió la metodología de Lawrence (10) modificada por Phillips y Galindo (16), que consiste en adicionar a cada plato Petri 20 ml de agua destilada a 10°C y colocar los platos 30 min., primero en una cámara oscura a 5°C y luego en otra a 25°C. Las suspensiones no fueron filtradas como recomienda Lawrence (10) debido a la esporádica presencia en ellas de esporangios y de micelio.

Con excepción de los dos primeros experimentos, las suspensiones fueron calibradas con un hematocímetro; para esto se tomó una aliquota de la suspensión y con el objeto de inmovilizar las zoosporas, se le adicionó azul de metileno con un aza.

En todos los experimentos se inoculó frutos de cinco meses de edad en dos puntos ubicados en lados opuestos del "ecuador" del fruto. Se suministró luego a cada mazorca una cámara húmeda, mediante la colocación de una bolsa transparente de polietileno que contenía una toalla de papel y 50 ml de agua destilada (17). A los dos días se cortó los extremos inferiores de las bolsas para eliminar el agua libre.

Seis días después de la inoculación se determinó la incidencia y la severidad. La severidad se midió utilizando el diámetro de la lesión de mayor tamaño en cada fruto. Se midió la lesión en los sentidos longitudinal y perpendicular al largo del fruto y se obtuvo un promedio entre ambos.

#### Comparación de métodos de inoculación

Con el fin de seleccionar el mejor método de inoculación de *P. palmivora* en frutos de cacao, se comparó el método propuesto de discos de papel con los métodos de plasticina y discos de micelio-agar, comúnmente mencionados en la literatura (2, 3, 10).

El método de discos de papel consistió en la inoculación de las mazorcas con una suspensión de zoosporas aplicada por medio de discos de papel de filtro. Se evaluó dos diámetros de disco: 0.5 y 1 cm. Aproximadamente media hora después de iniciada la preparación de la suspensión, se inoculó los frutos colocando en cada punto un disco de papel de filtro (Wathman 2) sumergido con una pinza en la suspensión previamente agitada. Cada disco quedó impregnado con aproximadamente 0.05 ml de suspensión.

El método de discos de micelio-agar consistió en la inoculación de los frutos colocando en cada punto de inoculación un disco de micelio-agar de 0.5 cm de diámetro.

Para el método de la plasticina, se moldeó en cada punto un pequeño recipiente de plasticina, dentro del cual se colocó 0.1 ml de la suspensión previamente agitada. Tres días después se eliminó la plasticina.

Con cada uno de los métodos descritos anteriormente, se inoculó 10 frutos de los cv 'EET-62', 'UF-613' y 'UF-29'. En la siguiente fase del experimento y utilizando los métodos más eficientes de la prueba anterior (discos de micelio-agar y discos de papel de 1 cm), se inoculó 15 frutos de los cv. 'Pound-7', 'EET-62' y 'UF-667'. En ambos experi-

mentos no se calibró la concentración de la suspensión pues se asumió, tal como indica Lawrence (10), que cada plato Petri produce consistentemente una concentración cercana a las  $2 \times 10^5$  zp ml<sup>-1</sup>

### Concentración del inóculo

Para las evaluaciones de resistencia se seleccionó finalmente el método de discos de papel de 1 cm de diámetro. Utilizando este método se evaluó el efecto de cinco concentraciones de inóculo (0, 5, 8, 11 y 14 x 10<sup>4</sup> zp ml<sup>-1</sup>). Para esto se inoculó 15 frutos/cv de tres cultivares con diferente reacción conocida al patógeno (10): 'Pound-7' (resistente), 'UF-613' (intermedio) y 'UF-296' (moderadamente susceptible).

### Período de utilización del inóculo

Debido a que al realizar inoculaciones sucesivas de cultivares se observó que la efectividad del inóculo se reducía al transcurrir el tiempo, se evaluó el tiempo máximo de utilización del mismo. Para esto, se inoculó 10 frutos/cv de los cv 'Pound-7' y 'UF-613' en lapsos de 15 min, a partir del inicio de las inoculaciones. Se realizaron siete inoculaciones abarcando un período de 90 min.

### Evaluación de cultivares

Con el método de discos de papel se procedió a evaluar la Colección de Germoplasma de Cacao del

CATIE. En el segundo semestre de 1988 se realizaron múltiples inoculaciones que permitieron evaluar 204 cultivares. En cada evaluación se incluyó de 12 a 24 cultivares dependiendo de la disponibilidad de frutos y de mano de obra. Se consideró que cada persona podía inocular un máximo de 60 frutos en media hora, que fue el tiempo previamente seleccionado para realizar esta labor.

Se inoculó 10 mazorcas/cv cantidad que ha sido considerada suficiente por otros autores (10). Todas las inoculaciones fueron realizadas durante la tarde, evitando hacerlas en días lluviosos o muy soleados.

Se consideró que bajo condiciones normales de inoculación, la incidencia debía ser superior para cada cultivar al 85%, en caso contrario la inoculación se repitió.

Los cultivares fueron clasificados de acuerdo con su diámetro promedio de lesión de la siguiente manera: de 0 a 2.0 resistentes; de 2.1 a 4.0 moderadamente resistentes; de 4.1 a 6 moderadamente susceptibles; y mayor de 6.1 susceptible. Durante 1989 los cultivares resistentes fueron reevaluados por lo menos en una oportunidad. Aquellos que disponían de una mayor cantidad de frutos se reevaluaron en más ocasiones.

Cuadro 1. Efecto de cuatro métodos de inoculación sobre la severidad e incidencia de *Phytophthora palmivora* en frutos de cacao. Turrialba, 1988.

Cultivar	Método de Inoculación <sup>1</sup>							
	A		B		C		D	
	SEV <sup>2</sup> (cm)	I <sup>3</sup> (%)	SEV (cm)	I (%)	SEV (cm)	I (%)	SEV (cm)	I (%)
'EEI-62'	6.8 <sup>4</sup>	95	2.0	42	4.4	100	5.2	95
'UF-613'	3.0	95	2.4	50	2.4	72	5.0	100
'UF-29'	2.8	75	2.6	70	2.4	95	7.4	100
PROM	4.2b <sup>4</sup>	88	2.3c	54	3.1bc	89	5.9a	98

1. Métodos de inoculación:

- A. Discos de Papel de 1 cm de diámetro
- B. Discos de Papel de 0.5 cm de diámetro.
- C. Plasticina
- D. Discos de Micelio-agar

2. SEV = Severidad de la enfermedad, determinada con base en el diámetro promedio de lesión

3. I = Incidencia de la enfermedad

4. Promedio de 10 frutos

5. Valores en esta hilera seguidos por la misma letra, no tienen diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Duncan ( $P = 0.05$ )

## RESULTADOS

De los cuatro métodos de inoculación evaluados, los más eficientes fueron los discos de micelio-agar y los discos de papel de 1 cm de diámetro (Cuadro 1). Con los discos de micelio-agar se obtuvo una incidencia promedio para los tres cultivares, cercana al 100% y un diámetro promedio de lesión de 2.9 cm. Con los discos de 1 cm estos valores fueron 88% y 2.1 cm, respectivamente. El método para el cual se dio la menor incidencia y severidad (54% y 1.2 cm) fue el de discos de papel de 0.5 cm. Con el uso de la plasticina se obtuvo una incidencia de 89% y un diámetro de lesión de 1.5 cm.

En una segunda evaluación de los métodos de discos de papel de 1 cm y discos de micelio-agar, se encontró nuevamente, que con este último se producía los mayores diámetros de lesión, sin embargo, para ambos métodos la incidencia fue muy similar (Cuadro 2).

La evaluación de las concentraciones mostró en términos generales para los tres cultivares, que al incrementarse la concentración de inóculo se aumentaba tanto la incidencia como la severidad (Cuadro 3). Para el cultivar resistente 'Pound-7' no se obtuvo respuesta a concentraciones menores a  $11 \times 10^4$  zp ml<sup>-1</sup>. Para los cv. 'UF-613' y 'UF-296', aún a una concentración de  $5 \times 10^4$  zp ml<sup>-1</sup> se producía infección. La concentración que produjo en promedio los mejores resultados fue  $14 \times 10^4$  zp ml<sup>-1</sup>, obteniéndose con ella incidencias superiores al 87%. Con el objeto de facilitar la calibración de las suspensiones se seleccionó finalmente una concentración de  $15 \times 10^4$  zp ml<sup>-1</sup>.

Se determinó que al avanzar el tiempo de inoculación se reducía la capacidad infectiva del inóculo. Tanto para la incidencia como para la severidad, los máximos valores fueron obtenidos en los primeros 30 min después de iniciada la inoculación (Cuadro 4). Después de este momento las severidades se redujeron pero no disirieron mucho entre sí.

En las evaluaciones de los cultivares se encontró que el diámetro promedio de lesión varió de 0.9 cm ('POUND-7' y 'Catie-1000') a 8.6 cm ('CC-48'), en tanto que, la incidencia fue en casi todos los cultivares superior al 90%. No se encontró correlación entre estos dos parámetros.

De los 204 cultivares evaluados se obtuvo 19 resistentes (Cuadro 5), 93 moderadamente resistentes, 61 moderadamente susceptibles y 31 susceptibles (Cuadro 6).

Al evaluar nuevamente los cultivares resistentes se observó que conservaban consistentemente su reacción.

## DISCUSION

La necesidad de identificar materiales resistentes a *P. palmivora* para ser entregados a los agricultores, ha originado muy diversos métodos de inoculación y de evaluación de la resistencia. La gran diversidad de métodos y de tipos de cacao usados en las investigaciones, unido a la amplia variabilidad natural del patógeno y de las condiciones climáticas, ha conducido a considerables discrepancias entre autores (10).

Algunos de los métodos mencionados en la literatura no reproducen adecuadamente las condiciones naturales de infección, ya que alteran la fisiología normal de los frutos al usar mazorcas desprendidas del árbol o con heridas artificiales. Esto tiene un importante efecto al evaluar la resistencia, puesto que las mazorcas modifican su reacción al ser separadas del árbol (4, 20). Así por ejemplo, Madeiros y Rocha (12) mencionan que la resistencia del cv. 'Catongo' disminuye considerablemente cuando se inocula frutos separados de la planta, y Lawrence (10) indica que la respuesta obtenida con este tipo de frutos, generalmente no coincide con la reacción obtenida

Cuadro 2. Efecto de dos métodos de inoculación sobre la severidad e incidencia de *Phytophthora palmivora* en frutos de cacao. Turrialba, 1988.

Cultivar	Método de Inoculación			
	Discos de papel de 1 cm		Discos de micelio-agar	
	SEV <sup>1</sup> (cm)	I <sup>2</sup> (%)	SEV (cm)	I (%)
'POUND-7'	0.9 <sup>3</sup>	87	2.4	85
'EET-62'	3.2	92	5.8	90
'UF-667'	5.8	97	8.2	100
PROM.	3.3b <sup>4</sup>	92	5.5a	92

1 SEV = Severidad de la enfermedad, determinada con base en el diámetro promedio de lesión

2 I = Incidencia de la enfermedad

3 Promedio de 15 frutos

4 Valores en esta hilera seguidos por la misma letra no tienen diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Duncan ( $P = 0.05$ )

bajo infección natural. Se ha demostrado además, que frutos con algún grado de resistencia se tornan más susceptibles al ser heridos y luego inoculados (2, 10).

En otros métodos, se ha alterado el potencial del inóculo al adicionar junto con éste sustratos nutritivos artificiales que favorecen el desarrollo del patógeno. Así por ejemplo, el método de discos de mazzeo-agar, a pesar de haber producido en la presente investigación la mayor incidencia y diámetro de lesión, no se considera adecuado por cuanto adiciona junto al inóculo, complementos nutritivos y no permite calibrar el tipo de inóculo usado ni la concentración del mismo. Por otra parte, el método de la plasticina además de ser tedioso, tiene el inconveniente de que algunos de estos materiales han resultado tóxicos a los frutos de cacao (21) y puede existir la posibilidad de que la plasticina interactúe con el inóculo.

Se considera que el método de discos de papel de 1 cm constituye una buena alternativa porque produce un adecuado nivel de infección y permite clasificar los materiales de cacao en forma eficiente. Además es sencillo, y debido a lo inerte del papel no aporta al hongo nutrientes adicionales. La cobertura que da el papel en los sitios de penetración reduce la evaporación del agua y la radiación directa en los mismos. La absorción de agua que sufre el disco en el momento de la inoculación garantiza el suministro de agua libre, fundamental para los procesos fisiológicos previos y durante la penetración del hongo (8). La

penetración y aparición de los primeros síntomas ocurre en poco tiempo (10) y cuando el hongo está dentro de los tejidos del epicarpio, la humedad no ejerce influencia (11). El suministro de humedad por medio del disco de papel impregnado de suspensión y la adición de la cámara húmeda a cada mazorca durante 24 h, se consideran suficientes para llenar los requerimientos de agua del hongo. Las bolsas de polietileno además, proveen de un microclima más uniforme y protegen al inóculo de factores adversos tales como lluvia y vientos.

El empleo de zoosporas, que son el principal propagulo para la diseminación e infección de la enfermedad (2), junto a la inoculación de los frutos bajo condiciones de campo (mazorcas unidas al árbol) origina un procedimiento acorde con las condiciones naturales de infección. El uso de zoosporas tiene además la ventaja de que sus suspensiones se pueden calibrar fácilmente, permitiendo una mayor uniformidad entre inoculaciones.

Al utilizar discos de papel de 0.5 cm se observó una importante disminución de la incidencia y la severidad con respecto a los discos de 1 cm, debido probablemente a la mayor capacidad de absorción de inóculo que se da con el incremento del tamaño de los discos. Este efecto puede ser importante al utilizar una suspensión con una baja concentración de zoosporas, lo cual probablemente sucedió en este experimento. En el mismo, la concentración no fue calibrada debido a que se asumió, tal como indica Lawrence (10), que cada plato Petri consistentemente produce alre-

Cuadro 3. Efecto de cinco concentraciones de inóculo sobre la inoculación artificial de *Phytophthora palmivora* en frutos de cacao. Turrialba, 1988.

Concentración (zoosporas ml <sup>-1</sup> )	Cultivares							
	'POUND-7'		'UF-613'		'UF-296'		PROMEDIO	
	SEV <sup>1</sup> (cm)	I (%)	SEV (cm)	I (%)	SEV (cm)	I (%)	SEV (cm)	I (%)
0	0 <sup>2</sup>	0	0.0	0	0.0	0	0.0a <sup>3</sup>	0
5 x 10 <sup>4</sup>	0	0	1.3	90	2.1	70	1.3b	53
8 x 10 <sup>4</sup>	0	0	1.9	97	3.3	93	1.8c	63
11 x 10 <sup>4</sup>	0.8	60	2.1	90	2.8	87	2.1cd	79
14 x 10 <sup>4</sup>	1.2	90	2.1	87	2.9	93	2.2d	90

1 SEV = severidad determinada con base en el diámetro promedio de lesión.  
I = incidencia.

2 Promedio de 15 frutos

3 Valores en esta columna seguidos por la misma letra, no tienen diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Duncan ( $P = 0.05$ ).

Cuadro 4. Efecto del tiempo transcurrido desde la preparación del inóculo sobre la eficiencia de la inoculación de *Phytophthora palmivora* en frutos de cacao. Turrialba, 1988.

Tiempo (min.)	Diámetro de Lesión (cm)			Incidencia (%)		
	'UF-613'	'POUND-7'	PROMEDIO	'UF-613'	'POUND-7'	PROMEDIO
0 <sup>1</sup>	2.9 <sup>2</sup>	0.9	1.9 a <sup>3</sup>	100	100	100
15	2.4	0.7	1.6 ab	96	100	98
30	2.4	0.5	1.4 abc	88	100	94
45	1.5	0.5	1.0 bc	96	90	93
60	1.9	0.6	1.2 abc	96	80	88
75	1.8	0.4	1.1 bc	100	60	80
90	1.7	0.5	1.1 c	96	60	78

1 Tiempo a partir del inicio de la inoculación

2 Promedio de 10 frutos

3 Valores en esta columna seguidos por la misma letra, no tienen diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Duncan ( $P = 0.05$ ).

dedor de  $2 \times 10^5$  zp ml<sup>-1</sup>, sin embargo, Phillips y Galindo (16) encontraron que hay mucha variabilidad en la producción de zoosporas entre platos, lo que hace indispensable la calibración de las suspensiones. La uniformidad de las condiciones de inoculación debe incluir necesariamente, la utilización de niveles iguales o muy similares de inóculo, así como inóculo de igual calidad y cultivado bajo condiciones definidas (1, 7). Para obtener una suspensión homogénea se previó como práctica indispensable en las inoculaciones, la agitación constante de la suspensión.

La concentración de inóculo juega un papel muy importante en las inoculaciones artificiales, debido a que las concentraciones excesivas pueden romper la resistencia de algunos materiales, en tanto que, las concentraciones bajas pueden permitir escapes al patógeno (7). En esta investigación, para el cultivar resistente 'Pound-7', no se obtuvo respuesta a concentraciones menores a  $11 \times 10^4$  zp ml<sup>-1</sup>, lo que puede indicar que la concentración de inóculo no fue suficiente y se dio un escape a la enfermedad que podría conducir a calificarlo como inmune.

La reducción en la capacidad infectiva del inóculo que se da al avanzar el tiempo de inoculación, puede deberse a que la manipulación de la suspensión en el campo produce un enquistamiento precoz de las zoosporas. Esta manipulación origina un incremento de la temperatura de la suspensión, que junto con la agitación constante de la misma, son factores que inducen la ocurrencia del enquistamiento (5, 9). Al inicio del enquistamiento las zoosporas son adhesivas, por lo que, si en ese momento entran en contacto con

una superficie sólida, se sujetan firmemente a ella (5). Las zoosporas que no se encuentren en esta situación, pueden reducir su capacidad de adherencia a la mazorca y con esto las posibilidades de causar infección. Además, las zoosporas enquistadas al carecer de flagelos, pierden la capacidad de moverse por sí mismas y consecuentemente la posibilidad de acumularse o evitar sitios específicos en el hospedero, lo cual incrementaría las posibilidades de infección (5).

La inoculación en el ecuador de la mazorca permitió un mejor desarrollo y mayor facilidad para la medición de la lesión, y representa la porción del fruto donde se produce naturalmente la mayor cantidad de lesiones (10, 25). La inoculación en dos puntos proveyó una repetición adicional. En las evaluaciones se consideró únicamente la lesión de mayor tamaño para hacer una selección más estricta de los materiales.

La evaluación de los cultivares en este estudio permitió determinar que existe una amplia variabilidad de respuesta a la inoculación con *P. palmivora*, sin embargo, no se observó la reacción de inmunidad como ha sido informado por Blaha y Lotodé (3).

La clasificación de los cultivares se hizo con base en la severidad. Algunos autores han utilizado la incidencia con este propósito, sin embargo, pudo constatarse en todas las evaluaciones, tal como menciona Tarjot (24), que tanto en los cultivares resistentes como en los susceptibles se producían lesiones. En ambos tipos se obtuvo en la presente investigación, incidencias superiores al 85% y en la mayoría de los cultivares mayores al 90%, lo que indica, que aún en los

Cuadro 5. Procedencia, origen genético, número de evaluaciones, severidad e incidencia de cultivares de cacao resistentes a *Phytophthora palmivora* Turrialba, 1988.

Cultivar	País <sup>1</sup>	Origen genético	Número Evaluac. <sup>2</sup>	SEV (cm) <sup>3</sup>	INC (%) <sup>4</sup>
CATIE-1000	CR	POUND 12 x CATONGO	5	0.9	98
POUND-7	PE		11	0.9	98
CC-256	CR		7	1.1	96
EET-59	EC		5	1.1	99
EET-64	EC		3	1.1	100
ISHN-812	TR		3	1.1	94
SPA-5	CO		3	1.2	98
UF-703	CR		3	1.2	98
CC-214	CR	POL AB SCA6	5	1.4	99
EET-48	EC		6	1.4	99
EEI-250	EC		3	1.4	92
ICS-44	IR		3	1.4	90
SPA-11	CO		3	1.5	92
CC-42	CR	POL AB UF 676	2	1.6	90
CC-83	CR		2	1.6	95
SPA-17	CO		2	1.6	95
CC-71	CR		3	1.7	95
CC-232	CR	SCA6 x ICS 39	5	1.7	100
UF-602	CR		2	1.9	85

1 País: CR = Costa Rica; CO = Colombia; EC = Ecuador; PE = Perú; TRN = Trinidad

2 Número evaluac.: número de veces en que el cultivar fue evaluado.

3 Sev.: severidad promedio. Determinada por medio del diámetro promedio de lesión.

4 Inc.: incidencia promedio

cultivares resistentes se produce penetración del hongo. Esto está en desacuerdo con lo encontrado por varios investigadores (10, 20) quienes distinguen dos tipos de resistencia: resistencia a la penetración, determinada por medio de la incidencia y resistencia al desarrollo del hongo dentro de los tejidos del pericarpio, medida mediante el desarrollo de la lesión. Como menciona Lawrence (10), dado que siempre ocurre penetración, el término resistencia a la penetración no debe usarse. La incidencia en esta investigación se utilizó para constatar la efectividad de la inoculación. Se fijó para cada cultivar una incidencia mínima de 85%, por debajo de la cual se consideró que la inoculación no había sido efectiva y era necesario repetirla.

La alta proporción de cultivares resistentes encontrados en este estudio, se debe probablemente, a que la resistencia a *P. palmivora* ha sido uno de los principales parámetros de selección de materiales promisorios en la mayoría de las estaciones experimentales.

En casi todos los frutos de los cultivares resistentes, la lesión fue de un diámetro similar al del disco y no crecía o crecía muy poco al transcurrir el tiempo. Muchas veces se observó únicamente una o pocas lesiones muy pequeñas ubicadas dentro del perímetro del disco.

Cuadro 6. Reacción de cultivares de cacao inoculados con *Phytophthora palmivora* usando el método de discos de papel. Turrialba, 1988.

	Mod. resistentes <sup>1</sup> (DL <sup>2</sup> = 2.1 a 4 cm)		Mod. susceptibles (DL = 4.1 a 6 cm)		Susceptibles (DL = 6.1-8 cm)
2.1-3 cm	MT-1	EET-62	4.1-5 cm	5.1-6 cm	6.1-7 cm
Catongo	NA-34	EET-96	CAAG	Amanaven	B-10
Blanco	P-20	EET-333	Catongo	BE-4	BE-5
CC-79	PA-121	EET-397	CC-17	Catongo 0	CC-33
CC-102	RB-29	EET-400	CC-18	CC-10	CC-38
CC-106	Santa	GS-17	CC-35	CC-41	CC-46
CC-138	Clara 3	ICS-6	CC-40	CC-47	CC-144
CC-222	SCA-6	PA-13	CC-45	CC-132	CC-169
CC-225	SIAL-93	Pará	CC-67	CC-137	GA-11
CC-228	SIAL-407	Pound-12	CC-74	CC-152	GS-78
CC-231	UF-36	R-23	CC-107	CC-211	IMC-67
CC-234	UF-704	RB-47	CC-173	CC-213	IMC-60
CC-240	UF-715	SC-5	CC-182	CC-249	Matina
CC-241		SC-6	CC-212	CC-251	SCR-2
CC-244	3.1-4 cm	SCA-9	CC-223	Diamantes	SCR-5
CC-245	BE-2	SCR-4	EET-41	-800	SIAL-325
CC-246	CC-27	SGU-4	EET-364	EEG-27	SIC-6
CC-253	CC-34	SGU-82	ICS-43	EET-228	SIC-7
CC-254	CC-49	SGU-89	P-10	GS-7	UF-12
CC-265	CC-100	SIAL-8	P-19	GS-50	UF-93
EET-29	CC-121	SIAL-339	R-6	P-43	UF-122
EET-48	CC-124	SIC-329	R-48	SCA-12	UF-210
EET-64	CC-139	SIC-433	R-117	SGU-3	UF-242
EET-94	CC-210	SIC-802	SIAL-70	SGU-63	UF-667
EET-95	CC-215	SIC-806	SIC-813	UF-11	
EET-162	CC-235	SPA-9	TJ-1	UF-168	7.1-8 cm
EET-338	CC-257	SPA-10	UF-668	UF-221	CC-9
EET-399	CC-264	UF-4	UF-672	UF-296	CC-43
ICS-32	Común	UF-29	UF-677	UF-601	CC-44
ICS-46	Típico	UF-273	UF-705	UF-650	CC-236
Laranja	CUL-7	UF-613	UF-713	UF-654	PA-81
MA-12	EEG-25			UF-676	TSHN-792
MA-13	EEG-65			UF-702	UF-700
Mocorongo	EET-45				8.1-9 cm CC-48

1 Clasificación de los cultivares: Moderadamente resistentes, Moderadamente susceptibles, Susceptibles

2 DL = Diámetro promedio de lesión.

#### LITERATURA CITADA

- BLAHA, G. 1967. *Phytophthora palmivora* (Butl.) Butl : variation de la pathogénie en fonction de la source de l'inoculum. *Café, Cacao, Thé* 11(4):331-336.
- BLAHA, G. 1974. Methods of testing for resistance In *Phytophthora disease of cocoa*. Ed by Gregory, P.H. London, Longman. p. 179-195.
- BLAHA, G.; LOTODE, R. 1976. Un critère primordial de sélection du cacaoyer au Cameroun: la résistance à la pourriture brune des cabosses (*Phytophthora palmivora*). *Café, Cacao, Thé* 20(2):97-116.
- BLAHA, G.; LOTODE, R. 1977. Contribution à la connaissance des modalités de la transmission héréditaire de la résistance du cacaoyer à la pourriture brune des cabosses (*Phytophthora palmivora*) au Cameroun. *Café, Cacao, Thé* 21(3):179-196.

5. CARLILE, M.J. 1983. Motility, taxis, and tropism in *Phytophthora*. In *Phytophthora: its biology, taxonomy, ecology, and pathology*. Ed by Erwin, D.C.; Bartnicki-García, S; Tsao, P.H. Minnesota, American Phytopathological Society p 95-107.
6. ENRIQUEZ, G.; SALAZAR, G. 1987. Cacao varietal resistance to *Phytophthora palmivora* and its inheritance at Turrialba, Costa Rica. In Proceedings of the meeting of the American Regional Group on *Phytophthora palmivora* on cacao. Ed by Enriquez, G.; Zentmeyer, G. Turrialba, Costa Rica. CATIE. Technical series. Technical Report no. 126. p. 19-20.
7. FRENCH, E.R.; HEBERT, I.I. 1982. Métodos de investigación fitopatológica. San José, Costa Rica. IICA: Serie de Libros y Materiales Educativos no. 43 p. 168-186
8. GREGORY, P.H.; MADDISON, A.C. 1981. Epidemiology of *Phytophthora palmivora* on cocoa in Nigeria; final report of the International Cocoa Black Pod Research Project. Kew, England, Commonwealth Mycological Institute. Phytopathological Papers no. 25 188 p.
9. HEMMES, D.E. 1983. Cytology of *Phytophthora*. In *Phytophthora: its biology, taxonomy, ecology, and pathology*. Ed by Erwin, D.C.; Bartnicki-García, S; Tsao, P.H. Minnesota, American Phytopathological Society. p. 9-40
10. LAWRENCE, J.S. 1978. Evaluation of methods for assessing resistance of cacao (*Theobroma cacao* L.) cultivars and hybrids to *Phytophthora palmivora* (Butler) Butler. Itabuna, Bahia, Brasil. Centro de Pesquisas do Cacau. Boletín Técnico no. 62. 46 p.
11. MEDEIROS, A.G. 1974. Novos conceitos sobre a podridão parda do cacau. Cacau actualidades (Brasil) 11(4):21-26.
12. MEDEIROS, A.G.; ROCHA, H.M. 1964. Programação dos trabalhos de seleção de cacauzeiros resistentes a proridão parda no Estado de Bahia, Brasil. Phytopathology 55:125-126.
13. MEDEIROS, A.G.; ROCHA, H.M. 1965. Estudo da resistência do cacau Catongo à proridão parda. relatório Anual CEPLAC, Centro de pesquisas do cacau, Itabuna, Brasil 29 p.
14. ORELLANA, R.G. 1954. Estudios sobre podredumbre de los frutos de cacao causado por *Phytophthora palmivora* en Costa Rica. Turrialba 4(1):35-38
15. PARTIOT, M. 1975. La résistance horizontale du cacauyer au *Phytophthora* sp. Méthodes d'évaluation précoce. Café, Cacao, Thé 19:123-136.
16. PHILLIPS, M.W.; GALINDO, J.J. 1988. Efecto de períodos de temperatura y edad del cultivo sobre la producción de inóculo de *Phytophthora palmivora* *in vitro*. In Reunión Anual de la Sociedad Americana de Fitopatología, División Caribe, 28a, San Andrés, Colombia, 1988. Resúmenes. San José, Costa Rica s.p.
17. PORRAS, V.H.; GALINDO, J.J. 1984. Efecto de niveles de inóculo y uso de "cámara húmeda" para evaluar la resistencia de cacao a *Monilia roreri* Cif. y Par. In Reunión Anual de la Sociedad Americana de Fitopatología, División Caribe, 24a, San José, 1984. Resúmenes. San José, Costa Rica s.p.
18. ROCHA, H.M. 1965. Variedades de cacao resistentes a *Phytophthora palmivora*. una revisión de literatura. Cacao (Costa Rica) 10(1):1-10.
19. ROCHA, H.M. 1974. Breeding cacao for resistance to *Phytophthora palmivora*. In *Phytophthora disease of cocoa*. Ed. by Gregory, P.H. London, Longman. p 211-218
20. ROCHA, H.M.; MARIANO, A.H. 1969. Seleção de cultivares de cacau resistentes a *Phytophthora palmivora* (Butl.) Butl. In Conferencia Internacional de Pesquisas em cacau, 2a, Salvador e Itabuna, 1967. Memorias, Bahia, Ceplac p. 150-155.
21. RODRIGUEZ, G. 1983. Herencia de la reacción del cacao (*Theobroma cacao* L.) a la pudrición de las mazorcas causada por *Phytophthora palmivora* (Butl.) Butl. Tesis Mag. Sc. UCR-CATIE. Turrialba, Costa Rica. 79 p.
22. SORIA, J.; ESQUIVEL, O. 1966. Niveles de infección de *Phytophthora palmivora* sobre cultivares de cacao en condiciones de campo. Fitotecnia Latinoamericana (Ven.) 3:119-124.
23. SREENIVASAN, I.N. 1975. A new method for screening for resistance to *Phytophthora palmivora* (Butler) Butler. In Conferencia Internacional de Investigaciones en Cacao, 5a, Ibadan, Nigeria. 12 p
24. TARJOT, M. 1974. Physiology of the fungus. In *Phytophthora disease of cocoa*. Ed by Gregory, P.H. London, Longman p 103-116.
25. WHARTON, A.L. 1959. Black pod disease. In West African Cocoa Research Institute. Annual Report 1957-58 p 25-30
26. WHARTON, A.L. 1961. Black pod disease. Resistance and tolerance. In West African Cocoa Research Institute Annual Report 1959-60 p. 24-25.
27. WHARTON, A.L. 1962. Black pod disease. Resistance and tolerance. Field investigations. In West African Cocoa Research Institute. Annual Report 1960-61. p 28-29

## Meiosis in *Theobroma cacao*<sup>1</sup>

L.J. Glicenstein\*, P.J. Fritz\*

### ABSTRACT

In this study of *Theobroma cacao* no aneuploids were found, all cells studied contained twenty chromosomes. Meiosis proceeds regularly, with pachytene being the stage of longest duration, interphase I or prophase II the shortest. Pairing appears to be bivalent with an occasional pre-metaphase I disjunction to account for the two or four univalents observed. One nucleolus is observed per cell, usually associated with one of the bivalents or two univalents. No multivalents have been observed in the clones studied by us. Disjunction is regular, the chromosomes being divided equally between the two poles in anaphase I. Cell wall formation does not occur at telophase I so that the two nuclei produced at this stage reside within the same cell. The second meiotic division appears to be normal also. Cell walls develop after the tetrad stage of telophase II, leading, eventually, to the four microspores.

### INTRODUCTION

Although researchers have observed meiosis during their cytological studies of *Theobroma cacao* (2, 3, 5, 6, 7), clear photomicrographs of meiotic chromosomes have not been published. Therefore, in the course of our cytological studies, we have compiled a series of photomicrographs illustrating the stages of meiosis during pollen development in *T. cacao*.

### MATERIALS AND METHODS

Mature trees of *T. cacao* were cultivated in 22-gallon containers in a greenhouse at The Pennsylvania State University. Three different clones were studied. Depending upon the specific tree, or the meiotic stage desired, flower buds 1.5 to 2.2 mm in length were collected between 7 to 8 am, fixed in a modified Carnoy's solution (1:1:3-chloroform: glacial acetic acid; 95% ethanol) for 24 h at 4°C, then stored at 4°C in 70% ethanol until needed. Anthers were excised, hydrolyzed in 1N HCl for 15 min at 60°C, washed in three changes of distilled water, then squashed in iron-propiocarmine/hematoxylin (1) or aceto-orcein stains. Both stains worked equally well. If no staining was desired (for example, where one wishes to observe the chromosomes using phase contrast techniques, followed by further treatment of the unstained chromosomes) the hydrolyzed anthers were squashed in a glycerine/45% acetic acid solution (1 drop of glycerine per ml 45% acetic acid). Preparations were observed at 1200X using a Leitz Dialux 20 Binocular Microscope equipped with

### COMPENDIO

En este estudio sobre *Theobroma cacao* todas las células estudiadas tenían 20 cromosomas; no se observaron células aneuploidías. El proceso de meiosis se desarrolló normalmente, en el que el estadio de paquitenes fue el de mayor duración; interfase I o profase II fue la de menor duración. El apareamiento de cromosomas parece ser bivalente pero, ocasionalmente, debido a la separación de cromosomas en la pre-metáfase I, se puede observar la formación de dos o cuatro univalentes. Se observó un nucleolo por célula, el cual está asociado a uno de los bivalentes o a dos univalentes. No se encontraron multivalentes en los clones estudiados. La separación de cromosomas ocurre de manera regular, los cromosomas están igualmente divididos entre los dos polos en la anafase I. La formación de la pared celular no ocurre durante la telofase I, de manera que los dos núcleos producidos en este estadio permanecen en la misma célula. La segunda división meiótica parece transcurrir normalmente. Las paredes celulares se desarrollan después del estadio de tetradas de la telofase II para, eventualmente, producir cuatro microsporas.

1 Received for publication 3 November 1988

\* American Cocoa Research Institute, Cocoa Molecular Biology Laboratory Department of Food Science, the Pennsylvania State University, University Park, Pennsylvania 16802 USA

Zernike phase contrast or Smith interference contrast optics. The best results were obtained with the phase contrast system. Photomicrographs were taken through the microscope utilizing Kodak Plus-X Pan or Ektachrome 200 films.

### Observations

The reduction of the somatic complement of chromosomes to the haploid state during meiosis is crucial to the production of gametes in plants and animals. In plants, meiosis occurs in the developing anthers or ovaries, giving rise, ultimately, to the pollen grains and egg sac, respectively. The process of meiosis in *T. cacao* reduces the somatic chromosome number of 20 to the gametic chromosome number of 10.

Although the process of meiosis is continuous, various stages have been recognized; most of which will be illustrated and described herein.

**Leptotene** (not shown) — Leptotene is the observable beginning of meiosis. The chromosomes in the nucleus of the pollen mother-cell begin to shorten, thicken and become visible at high magnifications. The nucleolus may also be seen within the nucleus.

**Zygotene** (Fig. 1) — Homologous chromatin strands or chromosomes begin to pair (synapse). Careful study of these strands in the figure shows strands of two different thicknesses. The thinner ones have not yet synapsed, the thicker ones have

**Pachytene** (Fig. 2) — The chromosomes have completely synapsed and appear to be single threads. They continue to condense and thicken. In *T. cacao*, pachytene appears to be the stage of longest duration. The relative duration of pachytene was determined empirically, in that the largest number of various bud sizes showed pachytene, while the other stages had more restrictive ranges.

**Late Diplotene/Early Diakinesis** (Fig. 3) — In diplotene, the chromosomes are very condensed, therefore chromosome associations can be observed. As the paired chromosomes pass through diplotene, they begin to separate, but are held together at various points called chiasmata. Opeke and Jacob (6) as well as Carletto (2) have reported multivalents in *T. cacao*. When multivalents are present, they may be observed in the diplotene, diakinesis, and metaphase I stages as groups of three or four chromosomes attached by chiasmata. However, in all of the cells in diplotene, diakinesis or metaphase I which we have studied (over 400 cells), we have observed no multivalent chromosome associations, but usually bivalents

and occasionally closely associated pairs of univalents. Davie (3) reported finding only bivalents at diplotene and metaphase I. In diakinesis the chromosomes contract further, separate even more from one another than in diplotene, but are still held together, usually at the ends of the chromosomes, by their chiasmata. During diakinesis, the nucleolus disappears. In Fig. 3, we plainly see nine pairs of chromosomes (bivalents) and two closely associated univalents (arrow). These univalents may result from a pre-metaphase separation (disjunction) of a bivalent, a process known for other plant taxa (4). We have observed two or four univalents in diplotene, diakinesis or metaphase I cells. As is usually the case, one of the bivalents is in intimate contact with the nucleolus.

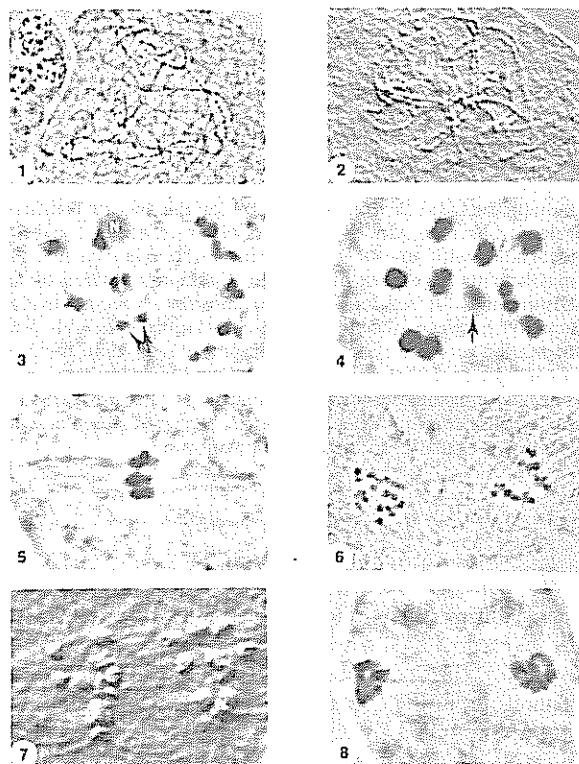


Fig. 1. Zygotene 1856X. PC. 2. Pachytene 1745X. IC. 3. Late diplotene/early diakinesis 2540X. PC. 4. Late diakinesis 3230X. PC. 5. Metaphase I. 2436X. PC. 6. Early anaphase I 1365X. PC. 7. Early anaphase I. 2605X. IC. 8. Late anaphase I. 2800X. PC. 9. Telophase I. 1629X. PC. 10. Interphase I. 1653X. PC. 11. Prophase II. 1042X. PC. 12. Metaphase II. 1375X. PC. 13. Early anaphase II. 2030X. PC. 14. Telophase II. 1044X. PC. 15. Tetrad state. 830X. PC. 16. Microspores. 991X. IC.

PC = specimen photographed through Zernike phase contrast optics  
IC = specimen photographed through Smith interference contrast optics

N = nucleolus

**Late Diakinesis (Fig. 4)** — The chromosomes have reached their maximum state of contraction and thickness. The nucleolus has disappeared. Ten bivalents are present in Fig. 4. One of the bivalents (arrow) is slightly out of the plane of the others and so is slightly blurred.

**Metaphase I (Fig. 5)** — The condensed chromosomes line up on the metaphase plate across the center of the cell, one chromosome of each bivalent on either side of the plate. Each chromosome is attached to a spindle fiber.

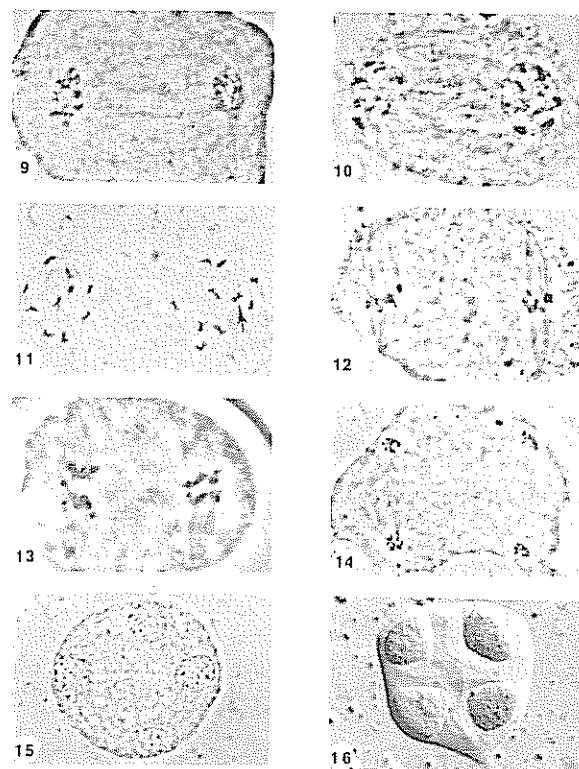
**Anaphase I (Figs. 6, 7, 8)** — Anaphase I is the stage in which the reduction of the somatic chromosome number takes place. The chromosomes of the bivalents disjoin (separate), each homologous chromosome being guided to an opposite pole of the cell by its attached spindle microtubule. Two cells are illustrated in Fig. 6. The chromosomes in the cell on the left are beginning to separate, while those in the cell on the right have already completely separated and are moving toward the two poles of the cell. Disjunction in *T. cacao* is regular, in that one half of the chromosomes (ten in *T. cacao*) migrate to each pole (Fig. 7). In Fig. 8, late anaphase, the chromosomes have almost reached the two poles.

**Telophase I (Fig. 9)** — Telophase I begins when the chromosomes moving in anaphase I have reached the poles of the cell. A nuclear membrane is reconstituted around the chromosomes at each pole. In many plants, a cell wall now develops between the two nuclei; however, in *T. cacao*, the cell wall is not formed, and the two nuclei reside within the same cell.

**Interphase I (Fig. 10)** — Interphase I is a very brief stage separating the first division of meiosis from the second one; we found it in only one bud of the nearly 800 buds of *T. cacao* examined. In interphase I the chromosomes are once again diffuse, but usually not as diffuse as in the nucleus of the pollen mother cell before meiosis began.

**Prophase II (Fig. 11)** — Prophase II is the beginning of the second division of meiosis. The membranes of the two nuclei disappear, while the two groups of recondensing chromosomes appear. One can count ten chromosomes, the gametic chromosome number of *T. cacao*, in each group. Chromatids, the duplicated arms of the chromosomes, are also visible (arrow).

**Metaphase II (Fig. 12)** — In metaphase II the chromosomes of the two nuclei line up on their corresponding metaphase plate. As in metaphase I, the chromosomes are attached to spindle fibers.



**Anaphase II (Fig. 13)** — Unlike anaphase I, where the two homologous chromosomes were separated and migrated toward the poles, in anaphase II the 10 individual chromosomes at each metaphase plate divide lengthwise, and each group of 10 chromosomes is pulled toward a pole in the cell. Fig. 13 is of an early anaphase II.

**Telophase II through to the Microspores (Figs. 14, 15, 16)** — Telophase II begins with the four groups of 10 chromosomes each arriving at the poles (Fig. 14). New nuclear membranes are formed around these chromosome groups to give rise to the tetrad (Fig. 15). The chromosomes within these nuclei become diffuse and difficult to see. Cell walls are now formed and four separate microspores, in a tetrahedral arrangement, are observed within the wall of the original pollen mother cell (Fig. 16).

Although the process of meiosis is now terminated, the individual microspores undergo further development and eventually form the pollen grains (7).

#### CONCLUSIONS

No aneuploids were observed in this study, all cells studied contained 20 chromosomes. Meiosis proceeds regularly in *Theobroma cacao*, with pachytene being

the state of longest duration, interphase I or prophase II the shortest. Pairing appears to be bivalent with an occasional pre-metaphase I disjunction to account for the two or four univalents observed. One nucleolus is observed per cell, usually associated with one of the bivalents. No multivalents have been observed in the clones studied by us. Disjunction is regular, the

chromosomes being divided equally between the two poles in anaphase I. Cell wall formation does not occur at telophase I so that the two nuclei produced at this stage reside within the same cell. The second meiotic division appears to be normal also. Cell walls develop after the tetrad stage of telophase II, to eventually produce the four microspores.

#### LITERATURE CITED

1. CLARK, G. 1981. Staining Procedures 4 ed. Boston. Williams and Wilkins. 512 p.
2. CARLETTI, G.A. 1974. Observações citológicas em células maes de pólen de cacaueiros. Revista Theobroma 4:32-40.
3. DAVIE, J.H. 1935. Chromosome studies in the Malvaceae and certain related families II. Genetica Nederlandsch 17:487-498.
4. GLICENSTEIN, L.J. 1986. Seed-set in tetraploid *Pelargonium xhortorum* L H Bailey as related to pollen germination, pollen tube growth, and cytology. Thesis Ph.D The Pennsylvania State University.
5. MARTINSON, V.A. 1975. Cytological studies of diploid and tetraploid *Theobroma cacao*. Genetica 45:341-348.
6. OPEKE, L.K.; JACOB, V.J. 1967. Cytological irregularities in *Theobroma cacao* L. In Memorias de Segunda Conferencia Internacional de Pesquisas em Cacau. Brasil. p. 114-116.
7. SHIMOYA, C. 1965. Microsporogenese em cacauero "Catongo". Experientiae 5:1-16.

# Variation in the Cultural Characteristics of Isolates of *Crinipellis perniciosa* in Trinidad<sup>1</sup>

H.A. Laker\*

## ABSTRACT

A sharp increase in the incidence of witches' broom disease on the progenies of two cocoa clones previously rated highly resistant to the causal pathogen *Crinipellis perniciosa* (Stahel), Singer prompted speculation that a severe strain of the fungus may have evolved in Trinidad. Comparisons were made in this study of the characteristics in culture of isolates of *C. perniciosa* from sites representative of the cocoa growing areas of the island as part of investigations to establish whether pathogenic variability exists within the Trinidad population of this fungus. Significant differences in growth rates between isolates were noted. The majority of the isolates were classified into two groups based on their mycelial densities. The isolates generally interacted positively with each other when grown in pairs on a plate and exhibited varying degrees of sensitivity to a range of chemicals incorporated in the growth media. The group of isolates from the various sites could not be differentiated in any of the trials. The results confirm other findings which suggested that the Trinidad population of *C. perniciosa* belongs to one pathotype.

## COMPENDIO

Debido a un incremento considerable en la incidencia de la enfermedad escoba de bruja en los progenies de dos clones de cacao, que hasta el momento se clasificaban como altamente resistentes al patógeno causal *Crinipellis perniciosa* (Stahel) Singer. Se especuló que una raza severa del hongo había evolucionado en Trinidad. En este estudio se compararon las características en laboratorio de cultivos de *C. perniciosa*, representativos de las zonas productoras de cacao en la isla, como parte de investigaciones para determinar si existe la variabilidad patogénica dentro de la población de este hongo en Trinidad. Se observaron diferencias significativas en las tasas de crecimiento de los cultivos aislados. La mayoría de éstos se clasificaron en dos grupos, según su densidad micelial. En general, los cultivos aislados interactuaron entre sí de manera positiva cuando se cultivaron en pareja en un plato, y mostraron diferentes grados de sensibilidad a una variedad de productos químicos incorporados al ambiente de crecimiento. En ninguna de las pruebas se lograron diferenciar. Los datos orientados confirman los resultados de otros estudios que sugerían que la población de *C. perniciosa* en Trinidad pertenecen a un solo patotipo.

## INTRODUCTION

Witches' broom caused by *Crinipellis perniciosa* (Stahel) Singer is the second most important disease of cocoa (*Theobroma cacao*) in the Western hemisphere. The disease is presently confined to several South American countries and some Caribbean islands who between them produce about 35% of the world's cocoa. It is recognized that resistant genotypes offer the best prospects for controlling the disease, hence a search for such genetic materials and their incorporation into breeding programmes has been in progress since the disease was first discovered in Suriname in 1895. Two Upper Amazon selections, SCA 6 and SCA 12, introduced and established in northeast Trinidad where rainfall and witches' broom disease were high, consistently remained healthy in the field when inoculated, indicating that they may

be immune to the pathogen (5). Both clones were extensively used in the hybridization programme to produce high-yielding cocoa types resistant to witches' broom disease in Trinidad. Infection of progenies of SCA 6 first noted in 1965 later increased in intensity, prompting suggestions that a mutation of *C. perniciosa* may have developed on the island (1).

Experimental evidence for the existence of pathotypes of *C. perniciosa* in South America was provided by Evans (6) and Wheeler and Mepsted (11). In the latter investigation, variation in the cultural characteristics of the isolates confirmed the existence of two populations of the pathogen previously established from the reactions of cocoa seedlings. Results also suggested that compatibility of the mycelia might be a more sensitive method than assessments of seedling reactions in determining genetic diversity among *C. perniciosa* isolates.

This study formed part of investigations aimed at ascertaining whether the "breakdown in the resistance" of the SCA clones is due to the development of a virulent strain of *C. perniciosa* in Trinidad

1 Received for publication 18 August 1989.

This paper includes part of the author's Ph.D thesis, submitted to the University of the West Indies, St. Augustine, Trinidad.

\* Plant Pathologist, CEPLAC, Caixa Postal 11, Ouro Preto do Oeste, 78928 Rondonia, Brazil.

It was undertaken in anticipation that differences in cultural characteristics might elucidate some information about variability within this fungal population.

#### MATERIALS AND METHODS

##### Source of inoculum

Isolates of *C. perniciosa* were obtained from green brooms collected from the following 10 locations, representative of the cocoa growing areas in Trinidad: Toco, El Reposo, Non Pareil, Marper, Rio Claro, Moruga, Las Hermanas, St Augustine, St Joseph and Santa Cruz. The isolates were maintained on V8 agar slants in culture tubes at 25°C and subcultured every six months.

##### Growth and characteristics in culture

The growth of five isolates from each of the 10 sites were compared. Five mm mycelial discs cut from the peripheral edges of five-day-old cultures of *C. perniciosa* were placed centrally on 9 cm Petri dishes, each containing 25 ml of V8 media. Each isolate was replicated on five dishes and incubated at 25°C. Colony growth (mean colony diameter less the diameter of the inoculum disc), was measured 13 days after inoculation along two perpendicular diameters and averaged. These measurements were compared by analysis of variance with the isolate means being tested for significance with LSD values ( $P = 0.05$ ,  $P = 0.01$ ).

The thickness, texture, border profile, colour and shape of the cultures were also recorded. The thickness and texture of the mycelial mat, recorded as mycelial density, were measured on the following scale, a modification of that used by Delgado (3)

- + sparse mycelium
- ++ abundant mycelial mat
- +++ abundant, thick mycelial mat.

##### Compatibility of the isolates

Pairs of 5 mm diameter discs from the growing edges of five-day-old cultures were placed on V8 agar in 9 cm Petri dishes. A total of 500 combinations between 50 isolates from 10 sites were systematically selected to determine interactions between isolates originating from similar and different locations, were each grown in duplicate dishes. Assessments of compatibility, based on whether hyphae of paired isolates intermingled at their common borders or did not, were made after 21 days.

#### Sensitivity of the isolates to chemicals *in vitro*

The sensitivity to chemicals of eight isolates of *C. perniciosa* obtained from El Reposo, Non Pareil, Marper, Moruga, Las Hermanas, La Reunion, St Augustine and Santa Cruz were determined on V8 media in which test chemicals had been incorporated. The chemicals tested were the systemic fungicides benomyl, fenpropimorph, fosetyl-al, isoprothiolane, serinal, tridemorph, the triazole formulation E 969, the antibiotic cycloheximide and the growth regulator, Indole-3-Acetic acid. Each chemical was evaluated at eight concentrations. In each case, freshly prepared V8 media in 250 ml Ehrlemeyer flasks was autoclaved at 104 kilopascals for 20 min and allowed to cool. To 198 ml of the melted agar at about 45°C, 2 ml aliquots of each concentration of a chemical dissolved in either acetone or distilled water were added and mixed thoroughly. Twenty ml of this media was dispensed per plate. Only distilled water was added to the control media.

Each plate was inoculated at the centre with a 5 mm mycelial disc from the peripheral area of a days-old colony. It was sealed and incubated at 25°C for 13 days. Mycelial growth at each chemical concentration was determined from two dishes with two measurements being taken at right angles on each plate and averaged. Linear growth in the presence of the chemicals was calculated as a percentage of growth in the control media. The dosage-response regression was obtained by plotting the percentage inhibition of growth on a probit scale (2) against concentration of the fungicide on a logarithmic scale. The concentration of the fungicide required to inhibit growth by 50% (ED<sub>50</sub>) and the slope of the regression line were calculated for each isolate on each chemical.

#### RESULTS

##### Mycelial growth

A white colony was established on the medium within three days. After seven days, the majority of the cultures consisted of an inner ring of cream mycelium adpressed to the agar surface bordered by an outer layer of thick, cottony white mycelium. By the thirteenth day, the mycelium in many cases was differentiated into several concentric circles of dense and sparse growth. Mycelial growth in all cases proceeded in a uniform circular pattern with smooth borders.

Abundant mycelium adpressed to the agar surface was produced by 32 isolates, while 16 isolates had abundant and thick mycelial mats (Table 1). Both types of mycelia were produced by isolates from 8 of

the 10 areas. In contrast, an isolate each from Las Hermanas and Non Pareil, in the central and eastern districts respectively, produced sparse mycelia.

Differences in the growth of individual isolates after 13 days were highly significant ( $P = 0.01$ ). However, variation in mycelial growth between groups of isolates from the different locations were not significant.

#### Compatibility of the isolates

Mycelia from paired discs of the same colony usually completely merged into each other. A visibly distinct border remained between the other isolates. Although there were differences in the degree of

mixing at the lines of demarcation, positive interactions were observed in all cases. All isolates were therefore classified as compatible with each other.

#### Sensitivity of the isolates to chemicals *in vitro*

All isolates showed great sensitivity to cycloheximide, E 969, fenpropimorph and tridemorph with less than 5 ppm of each chemical causing 50% inhibition of mycelial growth (Table 2). Differences in the ED<sub>50</sub> values of the chemicals were highly significant ( $P = 0.001$ ) but the variation between the isolates not. Similarly, the slopes of the percentage inhibition-log dose curves indicated significant differences between the chemicals but not the isolates.

Table 1. The growth and cultural characteristics of *C. perniciosa* isolates incubated at 25°C for 13 days.

Origin of isolates		Colony diam (mm)	Mycelial density	Origin of isolates		Colony diam (mm)	Mycelial density
Santa Cruz	1	72	++	St Joseph	1	75	+++
	2	72	+++		2	74	++
	3	74	++		3	75	++
	4	73	++		4	75	+++
	5	73	++		5	75	++
	Site mean	72.8			Site mean	74.8	
	1	73	++		1	74	++
	2	74	+++		2	73	++
	3	75	+++		3	74	++
	4	73	++		4	72	+
St Augustine	5	75	++		5	74	++
	Site mean	74.0			Site mean	73.4	
Toco	1	74	++	Non Pareil	1	77	++
	2	73	+++		2	74	++
	3	72	+++		3	75	+++
	4	75	++		4	74	+
	5	74	++		5	74	++
	Site mean	73.6			Site mean	74.8	
	1	74	++		1	75	++
	2	73	+++		2	74	++
	3	72	++		3	73	++
	4	74	+++		4	72	++
El Reposo	5	74	+++		5	74	++
	Site mean	73.4			Site mean	73.6	
Rio Claro	1	76	++	Moruga	1	74	++
	2	73	+++		2	76	++
	3	73	+++		3	75	+++
	4	73	++		4	75	++
	5	74	++		5	74	+++
	Site mean	73.8			Site mean	74.8	

Coefficient of variation 1.0%

S.E. isolate diameter means 0.3.

Table 2. Variation in the ED<sub>50</sub> values and slopes of graphs showing the relationships between % inhibition of linear growth and the dosage concentration of isolates of *C. perniciosa* growing on media amended with chemicals.

Origin of isolates	A*		B		C		D		E	
	ED <sub>50</sub>	Slope								
Santa Cruz	190.9	0.61	0.4	1.43	1.3	1.66	3 041.1	2.23	9.1	1.46
St Augustine	196.0	0.61	0.4	1.42	1.3	1.64	3 038.2	2.26	8.9	1.47
La Reunion	178.2	0.62	0.4	1.46	1.3	1.64	3 041.6	2.25	9.1	1.45
Las Hermanas	183.7	0.62	0.4	1.42	1.3	1.62	3 031.8	2.27	9.2	1.46
El Reposo	186.6	0.61	0.4	1.44	1.3	1.64	3 034.3	2.26	9.0	1.49
Non Pareil	190.0	0.63	0.4	1.45	1.3	1.63	3 023.7	2.27	9.1	1.48
Marper	178.6	0.64	0.4	1.44	1.3	1.64	3 020.7	2.25	9.1	1.47
Moruga	191.5	0.64	0.4	1.43	1.3	1.66	3 012.1	2.26	9.1	1.47
Means	186.9	0.62	0.4	1.44	1.3	1.64	3 030.0	2.26	9.1	1.47
	c	h	f	f	d	a	a	e	e	e

LSD Chemical means ( $P = 0.001$ ): ED<sub>50</sub> 7.2 Slope 0.02

\*A Benomyl B Cycloheximide C Fenpropimorph D Fosetyl - Al E Indole - 3 - Acetic acid F Isoprothiolane  
G Serinal H E 969 (Triazole) I Tridemorph.

## DISCUSSION

Investigations with isolates from various countries of South America showed significant differences in growth rates, colony density and appearances exist between isolates of pathotypes A and B of *C. perniciosa* (11). When grown in pairs on agar plates, mycelia of compatible isolates mingled freely whereas a distinct line of demarcation separated incompatible isolates. Generally no isolate in population A was compatible with those in population B, thereby endorsing the grouping of these isolates based on the reactions they caused on cocoa seedlings. Extrapolating from those results, the positive interactions between the Trinidad isolates suggest that genetic compatibility preponderates among the *C. perniciosa* population on the island. There is nevertheless some variation manifested in differences in colony growth and mycelial density. These differences are, however, typical of individual plates rather than of groups at various locations. Since a broom may arise from multiple basidiospore infections, some variation may be expected even among isolates from one broom. This was observed by Wheeler and Mepsted (11), who noted that the interchange of genetic material which occurs within a broom resulting from anastomoses of several mycelia may influence the interactions in culture of the new mycelia.

The possibility of using sensitivity to systemic fungicides as an aid in fungal taxonomy was first suggested by Edgington and Barron (4). Sub-

sequently, the natural and artificially acquired tolerance of fungal strains to fungicides have been reported in many pathogens. Significant differences between *C. perniciosa* isolates in their sensitivity to 2 triazole fungicides, hexaconazole and triadimenol were reported by McQuilken *et al* (10). The amount of each formulation required to reduce fungal growth of an isolate from Trinidad was significantly less than that required by isolates from Manizales (Colombia) or Castanhais (Brazil). In contrast, differences between three isolates from Manizales were not significant. Previously isolates from Colombia were grouped as pathotype A and those from Brazil and Trinidad characterised pathotype B (11).

Wheeler and Mepsted (11) acknowledged the problem of linking information from the cultural studies with differences in pathogenicity of the isolates. In the present case, however, the lack of outstanding differences between the groups of isolates in their behaviour in culture confirms the results of other investigations in which comparisons of the morphological, histopathological and biochemical reactions of inoculated cocoa seedlings and clonal plants showed no significant differences between isolates of *C. perniciosa* in Trinidad (7, 8, 9). The need still exists for further investigations to ascertain whether there is any correlation between these cultural characteristics and the pathogenicity of the strains in the field. This would ameliorate the present logistic problems encountered in securing a

Continuation Table 2. Variation in the ED<sub>50</sub> values and slopes of graphs showing the relationships between % inhibition of linear growth and the dosage concentration of isolates of *C. perniciosa* growing on media amended with chemicals.

Origin of isolates	F		G		H		I		Means	
	ED <sub>50</sub>	Slope								
Santa Cruz	48.4	1.67	210.8	2.00	1.3	1.08	3.1	0.61	389.6	1.42
St Augustine	48.6	1.67	209.8	1.99	1.3	1.09	3.2	0.61	389.6	1.42
La Reunion	48.3	1.65	212.2	1.92	1.3	1.09	3.1	0.60	388.4	1.41
Las Hermanas	48.5	1.64	212.0	1.96	1.3	1.09	3.2	0.60	387.9	1.41
El Reposo	48.4	1.65	213.7	1.97	1.3	1.09	3.2	0.60	388.7	1.42
Non Pareil	47.8	1.66	213.3	1.99	1.3	1.09	3.2	0.60	387.8	1.42
Marper	47.8	1.66	211.7	1.97	1.3	1.08	3.2	0.60	386.0	1.42
Moruga	48.0	1.67	208.5	1.98	1.3	1.08	3.1	0.60	386.1	1.42
Means	48.2	1.66	211.5	1.97	1.3	1.09	3.2	0.60	-	-
	d	c	b	b	f	g	f	i		

LSD Chemical means ( $P = 0.001$ ): ED<sub>50</sub> 7.2 Slope 0.02

\*A Benomyl B Cycloheximide C Fenpropimorph D Fosetyl - Al E Indole - 3 - Acetic acid F Isoprothiolane G Serinal H E 969 (Triazole) I Tridemorph

regular supply of inoculum and suitable host plants for comparative studies on the pathotypes of *C. per-*

*niciosa*, which can only be performed outside cocoa-growing regions.

#### LITERATURA CITADA

1. BARTLEY, B.G.D. 1969. Twenty years of cacao breeding at the Imperial College of Tropical Agriculture, Trinidad. International Cocoa Research Conference (2, Brazil) Proceedings p 29-33
2. BLISS, C.I. 1935. The calculation of the dosage - mortality curve. Annals of Applied Biology 22:134-167.
3. DELGADO, J.C. 1974. Studies on *Marasmius perniciosus* Ph.D. Thesis. University of Florida. 80 p
4. EDGINGTON, L.V.; BARRON, G.L. 1967. Fungitoxic spectrum of oxathiin compounds. Phytopathology 57:1 256-1 257.
5. EVANS, H. 1951. Report on investigations in progress in Trinidad with a summary of results achieved to date. London. Cocoa, Chocolate and Confectionery Alliance Ltd p 30-31.
6. EVANS, H.C. 1978. Witches' broom disease of cocoa (*C. perniciosa*) in Ecuador I. The fungus. Annals of Applied Biology 89:185-192.
7. LAKER, H.A. 1989. The reactions of cocoa (*Theobroma cacao* L.) seedlings and clonal plants to isolates of *Crinipellis perniciosa* in Trinidad. Tropical Agriculture (Trinidad) (In press).
8. LAKER, H.A.; SREENIVASAN, T.N.; RAJ KUMAR, D.; ELLIOT, A. 1988. Isozymes studies on the variability of *Crinipellis perniciosa* in Trinidad. International Congress of Plant Pathology (5, Japan) Proceedings (In press).
9. LAKER, H.A.; SREENIVASAN, T.N.; RAJ KUMAR, D. 1989. Investigations on the histopathology of cocoa seedlings inoculated with *Crinipellis perniciosa*. Canadian Journal of Botany. (In press).
10. McQUILKEN, M.P. 1988. Sensitivity of *Crinipellis perniciosa* to two triazole fungicides *in vitro* and their effect on development of the fungus in cocoa. Plant Pathology 37:499-506.
11. WHEELER, B.E.J.; MEPSTED, R. 1984. Pathogenic races of *Crinipellis perniciosa* (Stahel) Singer the causal fungus of witches' broom disease of cocoa *Theobroma cacao* L. London. Chocolate and Confectionery Alliance Ltd. 164 p

# Quantitative Changes in Polyphenol Oxidase and Protein during *Theobroma cacao* Seed Development<sup>1</sup>

M.K. Wong\*, P.S. Dimick\*

## ABSTRACT

Cacao trees, PSU-3 and PSU-20, were grown under greenhouse conditions and fruited green-colored and red-colored pods, respectively. Amounts of cocoa bean polyphenol oxidase (PPO) increased during the development of seeds in both. PPO activity of seeds from PSU-3 pods increased 60.7-fold from 81 days after pollination (DAP) to 163 DAP. Seeds from PSU-20 pods increased 44.0-fold from 120 to 175 DAP. Different seed colors from red pods were also examined for PPO activity. PPO activity of light purple-colored seeds ( $1.59 \times 10^4$  units/g seed) was similar to dark purple-colored seeds ( $1.56 \times 10^4$  units/g seed) at 144 DAP. Protein concentrations increased 30.2-fold from 81 to 163 DAP for seeds from PSU-3 but remained about the same for seeds from PSU-20 during seed development. Furthermore, protein concentration of light purple-colored seeds was greater than dark purple-colored seeds by 2.8-fold at 144 DAP.

## INTRODUCTION

**P**od color normally is a measure of maturation and ripening of cacao pods. The number of days to maturity varies and is within the range of 140-180 DAP. Green or dark red-purple colors can change to yellow, orange, or red depending on variety. Within cacao seeds, however, many changes can occur during maturation and ripening. As the seeds enlarge, they fill with a liquid endosperm (5). The liquid endosperm starts to harden by 110 to 120 DAP and continues to harden until the entire seed solidifies. During the enlargement phase, pigment (anthocyanin content) changes from white to dark purple in certain varieties (5, 9). Furthermore, lipid content increases dramatically during ripening (5). Although caffeine accumulates slowly until the later stages of develop-

## COMPENDIO

Arboles de cacao, PSU-3 y PSU-20 cultivado en un invernadero, produjeron mazorcas verdes y rojas, respectivamente. Las cantidades del polifenol oxidasa (PPO) aumentaron durante la madurez de las semillas en ambos. La actividad de polifenol oxidasa de semillas de PSU-3 aumentó 60.7 veces desde 81 días después de la polinización hasta 163 días. El polifenol oxidasa de las semillas de PSU-20 aumentó 44.0 veces desde 120 hasta 175 días. Semillas de diferentes colores de mazorcas rojas también fueron analizadas para la actividad de polifenol oxidasa. La actividad en semillas color violeta claras ( $1.59 \times 10^4$  unidades/grano de semilla) de 144 días fue similar a la actividad de las semillas violeta oscuras de 144 días ( $1.56 \times 10^4$  unidades/grano de semilla). Las concentraciones de proteína aumentaron 30.2 veces desde 81 hasta 163 días en las semillas de PSU-3, pero quedaron al mismo nivel en las semillas de PSU-20 durante su madurez. Además, las concentraciones de proteína en las semillas violeta claras fueron 2.8 veces más altas que en las semillas violeta oscuras de 144 días después de la polinización.

ment. Wright *et al.* (9) observed that the alkaloids, theobromine and caffeine, increase after an initial lag period. Fritz *et al.* (3) found that protein content increases in the soluble fraction from 112-151 DAP before leveling-off at 166 DAP. In contrast, microsomal protein concentration decreases with seed development. During the final days of pod ripening, seed protein concentration decreases (10) and there is a build-up of sugars in the pulp, which show an increase in acidity, tannins, and carbohydrates (6).

The use of greenhouses to grow cacao trees increases the availability of samples in non-growing regions while affording the advantage of environmental control. Due to self-incompatibility among cacao trees, cross-pollinations are often performed. Hence, the resulting hybrid fruit pods vary in color, shape, and size. Within any one pod, seed color may range from white to dark purple. Different degrees of pigmentation indicate different levels of polyphenols which may influence PPO activity, and thus, chocolate flavor. Furthermore, Criollo cacao seeds, which are white or pale pink in color and possess the finer flavor, have been compared to the varied purple colors of the bulk-grade Forastero cacao, although a

1 Received for publication 22 July 1989.

The authors wish to thank Dr. P.J. Fritz for the use of the *T. cacao* trees at The Pennsylvania State University. This work was supported in part by the American Cocoa Research Institute, McLean, VA. This is paper no. 8241 of the journal series of the Pennsylvania Experiment Station, University Park, PA 16802, USA.

\* Department of Food Science The Pennsylvania State University, University Park, PA 16802, USA

link between seed color and flavor has yet to be proven. The purpose of this study was to determine the PPO activity in two cultivars in order to relate the amount of enzyme with the development of the cacao seeds and cacao proteins and perhaps infer the importance of PPO to the time of harvest of pods and chocolate flavor development.

#### MATERIALS AND METHODS

##### Samples

Hand pollinations of flowering cocoa trees (*Theobroma cacao* L.) were carried out in greenhouses at The Pennsylvania State University. This study involved trees which were PSU-3 and PSU-20 derived from seeds of open pollination EXQ-100 and UF-667, respectively, collected in the field at the USDA Agricultural Station, Mayaguez, Puerto Rico. They were given PSU (Pennsylvania State University) numbers because they are unique clones. PSU-3 and PSU-20 fruited green and red-colored pods, respectively. Numerous flowers were used in pollination in order to maximize the number of fruit and, thus, samples for extraction and assay. During pod development, pod length was monitored monthly. After harvesting, pods were weighed and measured; and the seeds were removed and the testa and adhering pulp peeled off. Dark purple seeds were separated from light purple seeds. The seeds were quickly frozen in liquid nitrogen and stored at -30°C.

##### Extraction procedure

**Initial extraction.** Crude PPO extract (Fig. 1) was prepared by grinding 10 g of frozen cocoa in liquid nitrogen with a Janke and Kunkel model A10 S1 mill (3 x 15 sec bursts). Portions of 1 to 2 g were mixed with pH 8.0 extraction buffer (10 ml buffer/g seed)

containing 350 mM mannitol, 40 mM Tris-HCl, 5 mM ethylenediamine-tetraacetate (EDTA), 15 mM  $\beta$ -mercaptoethanol ( $\beta$ -ME), 2% polyvinylpyrrolidone (PVP)-10 000, and 100 mM diethylidithiocarbamate (DIECA). Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) and leupeptin were delivered to each extract resulting in final concentrations of 1.742 mg PMSF/g seed and 0.100 mg leupeptin/g seed. Initial extracts were centrifuged for 20 min at 12 000 x g at 4°C and the supernatants were used for PPO assay.

**Preparation of crude PPO.** The supernatant volumes from the initial extracts were measured and saturated to 65% with ammonium sulfate (430 g/l). The solutions were cooled on ice for 15 min before centrifuging 15 min at 10 000 x g. The pellets were resuspended in a minimum volume of 20 mM Tris, pH 7.3 at 25°C (Buffer A) for dialysis (3 500 MW cutoff, Bio-Rad, Richmond, CA) against Bufler A for 2 x 1 h. Retentate volumes were measured and then assayed for enzyme activity and protein concentration.

##### Enzyme assay

Assays for PPO were performed using Kim's (4) modification of procedures described in the Worthington Enzyme Manual (1) and by McCord and Kilara (7). The determination is based on the PPO-catalyzed oxidation of (-)-epicatechin to o-quinone which causes an increase in absorbance at 400 nm. Two ml 0.5M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 6.5 were mixed with 0.5 ml 0.001 M (-)-epicatechin and 50  $\mu$ l 0.005 M CuSO<sub>4</sub> in a glass cuvette and oxygenated for 5 min. After addition of sample, the cuvette was inverted to mix and then inserted into the spectrophotometer. Change in absorbance was calculated from the exponential portion of the curve. A Gilford (Oberlin, OH) Response UV-Vis spectrophotometer and printer was used to monitor change in absorbance.

##### Protein assay

The Bradford (2) method was used for protein determinations. Standard curves were made each day of a protein assay from samples of standard BSA at concentrations of 5, 10, and 15  $\mu$ g/ml.

#### RESULTS AND DISCUSSION

Investigations of seed proteins from higher plants have been performed in order to understand the mechanisms which underly gene expression. In particular, significant results have been shown by quantitating protein during seed development (3). In this study, a contrast in soluble and microsomal protein concentrations was demonstrated. Soluble proteins

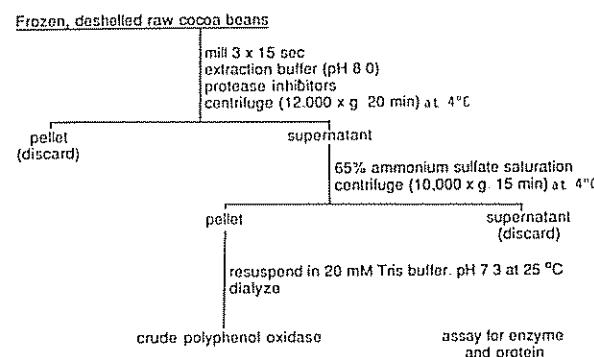


Fig. 1. Protocol for extraction of crude polyphenol oxidase from raw cocoa beans

increased during development of cacao seeds then leveled off with the onset of maturity, whereas microsomal protein concentrations decreased with seed development. In the present study, quantitative protein analysis of the crude PPO extract represented microsomal and soluble protein contents combined. Protein content was measured in order to express specific activity of PPO.

Based on daily observations, green pod development appeared more advanced than red pod development. Green pods were noticeably larger than red pods of the same age (Table 1) with a commensurate increase in the size and number of seeds. Based on visual observations, both red and green pods resembled Trinitario variety. The seeds after 144 days post-pollination from green pods were dark purple and numbered from 45 to 61 seeds per pod (Table 2). Seed weight and size remained essentially unchanged throughout the period studied. Furthermore, seeds from green pods exhibited more extensive hardening and coloring than seeds from red pods.

In Fig. 2 the increase in PPO activity is shown to be nearly parallel between seeds from green and red pods. The PPO activity of seeds from green pods is slightly greater than activity of seeds from red pods of similar ages. The PPO activity of seeds from green pods increases 60.7-fold from 81 to 163 DAP compared to 44.0-fold from 120 to 175 DAP for seeds from red pods. The enzyme activity continues to increase with age, although seed sizes and weights reach a plateau at 144 days. Also, dark ( $1.56 \times 10^4$  units/g seed) and light ( $1.59 \times 10^4$  units/g seed) demonstrate similar activity, indicating that pod or seed color, i.e.

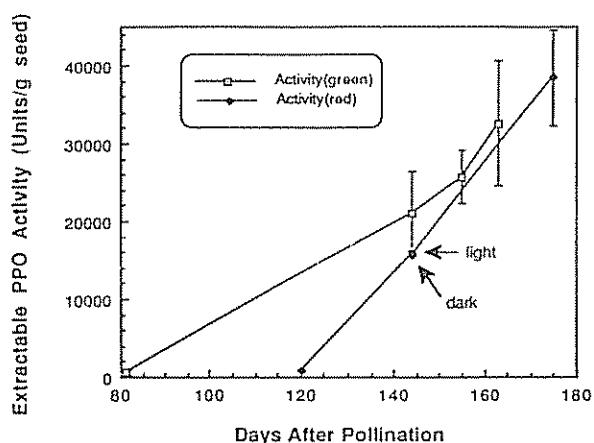


Fig. 2 Extractable polyphenol oxidase (PPO) activity of developing cacao seeds from green (EQX-100) and red (UF 667) colored pods with labeled values for light and dark purple seeds. Those points without standard deviation bars indicate lack of sufficient replicates.

the concentration of anthocyanins, does not influence the amount of PPO enzyme.

Clearly, pigmentation increases, seeds solidify, and folds develop throughout the cotyledon as seed development progresses. Younger seeds are opaque, contain a liquid endosperm, and lack any pigmentation. The hardening process appears to begin at the hypocotyl (placental) end of the seed, when growth has stopped, and spreads, causing an increase in mass but little change in size (length and width). Indeed, the light and dark purple colors of cacao seeds develop at different rates within any one pod with mechanisms which are not yet understood. However, it is known that the fine-flavored Criollo seeds are normally white.

Table 1. Shapes and sizes of cocoa pods harvested in this study at various ages.

Days after pollination	Weight (g)	Pod dimensions <sup>1</sup>					
		Length (cm)	Circum. (cm)	Apex shape number	Base shape number	Wall thickness (cm)	Dia. (cm)
<b>PSU-3</b>							
81	NA <sup>2</sup>	6.7	8.0	NA	NA	NA	2.3
144	410.0	16.7	25.2	1-2	0-1	1.2	7.9
155	465.8	18.3	25.2	1-2	0-1	0.9	8.0
163	392.3	16.8	25.5	1-2	0-1	1.1	7.8
<b>PSU-20</b>							
120	320.2	14.4	23.1	1	1	0.9	7.0
144	293.7	14.0	22.4	1	0-1	1.2	NA
175	244.6	14.0	22.1	1	1	1.0	7.0

1 Apex shape number refers to the form of the point opposite to the stem on a scale of 1 to 6. A value of 1 implies the most pointed form. Base shape number refers to the degree of basal constriction on a scale of 0 to 4. As the number becomes larger the degree of constriction near the stem becomes greater.

2 NA = not available

due to the lack of the anthocyanins which color the bulk grade Forastero seeds purple. A distribution of light and dark purple-colored seeds was observed in red pods with no apparent pattern (Table 2). Seed weight slightly increased from 0.63 g/seed at 120 DAP to 0.77 g/seed at 175 DAP. Seed sizes, however, remained about the same during this period of development.

Protein assays of cacao seeds from green and red pods revealed a dramatic difference. Protein concentrations of seeds from green pods increased 28.8-fold from 81 to 155 DAP before beginning to level off at 163 DAP with a total increase of 30.2-fold (Fig. 3). In obvious contrast, protein concentrations of seeds from red pods remained about the same during development. Light purple-colored seeds had a 2.8-fold higher protein concentration than dark purple-colored seeds. It is known that during higher plant seed development proteins accumulate in a short period of time (3). Possibly, protein concentrations peaked between harvest dates and subsequently declined since microsomal proteins are known to decrease with seed development (3).

Predictably, specific activity (SA), which relates total PPO activity to total protein content, increased more dramatically for seeds from red pods (Fig. 4). Specific activity increased 566-fold from 120 DAP to 175 DAP. Although total PPO activities among seeds from the green and red pods were only slightly different, large differences were observed in protein content. High specific activities of PPO in seeds from red pods reflected low protein contents whereas relatively low specific activities in seeds from green pods only increased slightly since the total PPO activity closely paralleled the protein content. Specific activity in-

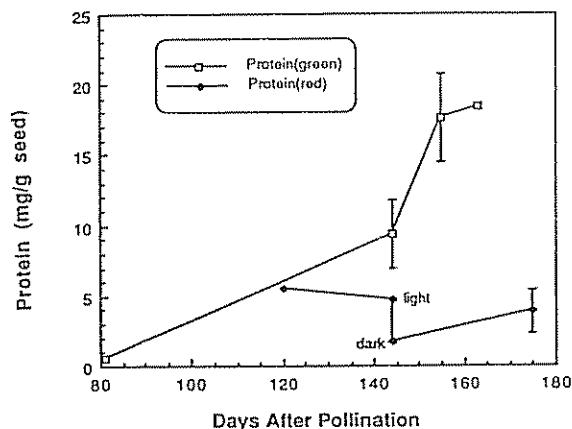


Fig. 3 Protein of developing cacao seeds from green (EQX-100) and red (UF 667) colored pods with labeled values for light and dark purple seeds. Those points without standard deviation bars indicate lack of sufficient replicates.

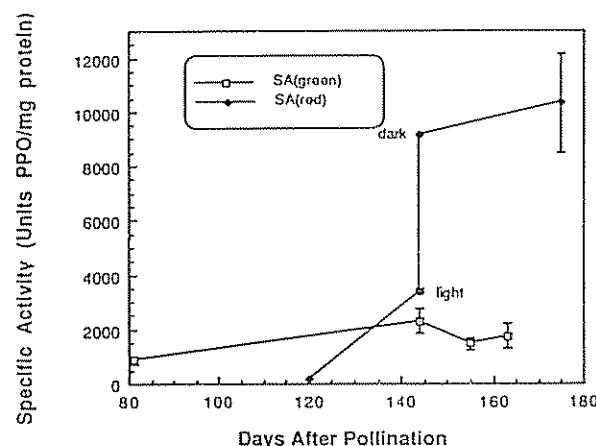


Fig. 4 Specific activity (SA) of polyphenol oxidase of developing cacao seeds from green (EQX-100) and red (UF 667) colored pods with labeled values for light and dark purple seeds. Those points without standard deviation bars indicate lack of sufficient replicates.

creased 2.6-fold from 81 DAP to 144 DAP but reached a plateau at 155 and 163 DAP with increases in SA of 1.7-and 2.0-fold, respectively.

#### CONCLUSIONS

An extraction procedure has been developed for cocoa bean PPO in order to quantitate PPO as rapidly as possible. The application of this method to obtain crude PPO is quite suitable for post-pollination studies in order to observe quantitative changes in PPO activity during seed development. Seeds from two separate trees which fruited green and red pods, respectively, were studied. PPO activity from each group of seeds increased with development. Light and dark purple-colored seeds were found in red pods only, but similar PPO activities were measured for each. Therefore, no relationship exists between amount of PPO activity and concentration of pigmentation. Larger differences were seen in protein contents. Protein concentrations of seeds from green pods increased with development. However, protein contents remained about the same for seeds from red pods. The results in this study represent two cultivars and further research is needed to determine if the trends found here occur in all cacao during development.

Ripe cacao pods are preferred for cocoa production. Certain biochemical changes are necessary, such as the build-up of pulp sugars and the increase in acidity, tannins, and carbohydrates (6). The combination of changes appears optimal, but it is not known whether an alteration of one of these would affect the quality of the resulting chocolate. Perhaps it is beneficial that PPO activity continues to increase until ripening since, in the ensuing fermentation, PPO activity declines rapidly (8).

Table 2. Pod color, seed counts and seed measurements of pods harvested at various ages.

Days after pollination	Seed count (%)			Seed measurements <sup>1</sup>		
	Dark purple	Light purple	Colorless	Weight (g/seed)	Length (cm)	Width (cm)
<b>PSU-3</b>						
81			51(100)	NA <sup>2</sup>	NA	NA
144	45(100)			1.12	2.2	1.1
155	61(100)			0.96	2.2	1.1
163	54(100)			0.99	2.2	1.1
<b>PSU-20</b>						
120	18(56)	13(41)	1(3)	0.63	2.0	1.1
144	8(24)	25(76)		0.72	2.0	1.1
175	29(100)			0.77	1.9	1.0

1 Measurements represent total weight of seeds without testa (g) divided by total number of seeds. Lengths and widths are the average of three representative seeds

2 NA = not available.

#### LITERATURE CITED

- ANONYMOUS. 1977 Polyphenol oxidase. In Worthington Enzyme Manual. Ed by L A Decker. N.J. Worthington Biochemical Corporation.
- BRADFORD, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry (USA.) 72:248
- FRITZ, P.J.; FRITZ, K.A.; KAUFFMAN, J.M.; PATERSON, G.R.; ROBERTSON, C.A.; STOESZ, D.A.; WILSON, M.R. 1985. Cocoa seeds: Changes in protein and polysomal RNA during development. Journal of Food Science 50:946
- KIM, H. 1987 Isolation and characterization of polyphenol oxidase from cocoa beans Ph.D. Thesis Pa , Pennsylvania State University.
- LEHRIAN, D.W.; KEENEY, P.G. 1980. Changes in lipid components of seeds during growth and ripening of cacao fruit. J Am Oil Chem. Soc 57:61.
- LOPEZ, A.S. 1986. Chemical changes occurring during the processing of cacao. In Proceedings of the Cacao Biotechnology Symposium. Ed. by P.S. Dimick. Pennsylvania State University College of Agriculture
- McCCORD, J.D.; KILARA, A. 1983. Control of enzymatic browning in processed mushrooms (*Agaricus bisporus*). Journal of Food Science 48:1479
- VILLENEUVE, F.; CROS, E.; MACHEIX, J.J. 1985. Effects of fermentation on the activity of peroxidases and polyphenoloxidases from cocoa seeds Café Cacao Thé 29:113.
- WRIGHT, D.C.; PARK, W.D.; LEOPOLD, N.R.; HASEGAWA, P.M.; JANICK, J. 1982. Accumulation of lipids, proteins, alkaloids and anthocyanins during embryo development in vivo of *Theobroma cacao* L. J. Am. Oil Chem. Soc. 59:475.
- ZAK, D.L.; KEENEY, P.G. 1976. Changes in cocoa proteins during ripening of fruit, fermentation, and further processing of cocoa beans. Journal of Agricultural and Food Chemistry 24:483.

# Un Modelo Económético del Mercado Internacional del Cacao desde la Perspectiva de los Países Centroamericanos<sup>1</sup>

H. Robinson\*

## ABSTRACT

This paper develops an empirical model of the international cocoa market from the perspective of the Central American countries. The model provides a conceptual framework for trade policy analysis and planning. The notion of "price taking behavior" on the part of these countries is tested and verified using a simple econometric estimation. The quantitative exercise involved the estimation of the coefficients of those factors influencing cocoa and cocoa products' equilibrium price at the world level. This approach results in the identification of adequate parameters and guidelines for designing an effective, successful production and export strategy for the Central American countries. The results clearly support the proposition that these countries face an infinitely elastic demand at the world equilibrium price level; as a result, the volume of their production (and export) does not affect it. The study revealed a potentially interesting variable: a statistically significant relation between the importing country's income and the price of cocoa. Because of its implications, such a finding should be the subject of a more thorough analysis. Finally, some general guidelines for cocoa trade policy decisions derived from the study are discussed.

## INTRODUCCION

**L**os países de Centroamérica (CA) son exportadores netos de cacao y sus derivados. Potencialmente este cultivo puede llegar a representar una fuente destacada de ingreso de divisas para estos países y, constituirse en un rubro de importancia dentro del proceso de ajuste de sus economías.

Durante 1986 las exportaciones de cacao y sus derivados del grupo de países de CA alcanzaron un volumen total de 96 700 toneladas métricas con un valor de alrededor de US\$190 millones (2).

Debido a que el Mercado Internacional del Cacao se caracteriza por bajas elasticidades precio de la demanda y de la oferta en el corto plazo, los precios del cacao tienden a fluctuar ampliamente como conse-

## COMPENDIO

Este artículo desarrolla un modelo empírico del mercado internacional del cacao desde la perspectiva de los países de centroamérica y define a su vez un marco conceptual para el análisis de políticas en este campo. Mediante una estimación económica muy simple, se evaluó y comprobó la validez y aplicabilidad de la noción de "price taking behavior" (aceptador de precios) por parte de los países centroamericanos en el mercado internacional del cacao. El modelo permitió la cuantificación de los coeficientes de los factores que tienen influencia sobre la determinación del precio de equilibrio de mercado. Esta cuantificación es indispensable para dictar pautas y fijar parámetros, que incorporados al proceso de formulación de políticas respectivo, permitirían diseñar una estrategia eficaz y exitosa para la producción y exportación de cacao por parte de este grupo de países. Los resultados obtenidos soportan ampliamente la tesis de que los países de Centroamérica (CA) enfrentan una demanda infinitamente elástica al nivel del precio de equilibrio del mercado internacional y que, por lo tanto, su volumen de producción no tiene influencia sobre la determinación de dicho precio. El estudio provee a su vez evidencia de un elemento novedoso: una gran significación estadística del ingreso promedio de los principales importadores en la determinación del precio de equilibrio, aspecto que debería ser objeto de un análisis más profundo para determinar la magnitud de sus implicaciones. Finalmente se brindan algunos lineamientos generales sobre el tipo de decisiones en materia de política de exportación de cacao que se derivan de los resultados encontrados.

cuencia principalmente de variaciones en el volumen de producción debido a cambios climáticos.

Por otro lado, el 90% del total del consumo de cacao a nivel internacional corresponde a los países industrializados y los de economía planificada. Dado que en estos países se espera sólo un moderado crecimiento de la población, se proyecta que el consumo a nivel mundial crecerá solo levemente durante lo que resta de este siglo. En cuanto a la producción se pronostica un crecimiento promedio del 1.7% anual hasta alcanzar los 2.5 millones de toneladas para el año 2000 (12).

No obstante, durante el quinquenio 1990-1995, la tasa de crecimiento podría ser algo menor, debido a que los bajos precios que prevalecieron durante el final de la década anterior afectaron el establecimiento de nuevas plantaciones.

1 Recibido para publicación el 8 de marzo 1990

\* Especialista en formulación y análisis de Proyectos del Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA).

Estos factores hacen prever que durante 1990 o 1991 se llegue al final de la caída en los precios reales y que como resultado del ajuste de la producción a los bajos precios experimentados en los últimos años, éstos se incrementen progresivamente hasta un nivel de US\$1 810 toneladas a fines de siglo (12).

Esta situación representa una valiosa oportunidad para que los países de CA puedan incrementar sus ingresos de divisas por concepto de exportación de cacao y sus derivados, objetivo que demanda la formulación e implementación de políticas y programas de producción y comercialización adecuadas.

En países pequeños como los de la región centroamericana, las políticas de producción y exportación de productos agrícolas básicos tienden a generarse con base en apreciaciones, parámetros y análisis de carácter interno. Sin embargo, en el caso del cacao y algunos otros productos, un enfoque estrictamente doméstico puede resultar insuficiente ya que no considera la situación del país frente al mercado internacional ni incorpora las interrelaciones existentes entre los diferentes países, sean éstos exportadores o consumidores.

En este sentido, los países de CA deben reconocer e incorporar en su proceso de formulación de políticas de comercio externo, la noción de que sus decisiones en materia de producción y exportación de cacao están condicionados por las acciones de los grandes productores e importadores, que son los que en última instancia determinan las condiciones de equilibrio de mercado.

Este enfoque global facilita el proceso de toma de decisiones y culmina en la formulación de políticas más acertadas que permiten establecer un nivel de producción y exportación óptimos.

Este artículo desarrolla un marco teórico-conceptual para la identificación de los factores que determinan el grado de influencia que tienen los países de CA en la determinación del precio de equilibrio del cacao a nivel mundial.

Mediante el diseño de un modelo econométrico, se cuantifican estos factores para luego ser incorporados como parámetros dentro de un proceso de toma de decisiones de políticas de comercio internacional más efectivas.

## MATERIALES Y METODOS

### Revisión de Literatura (13)

Entre los principales objetivos que se persiguen con el desarrollo de modelos de comercio internacional agrícola están: evaluar la teoría y proveer pronósticos; análisis de políticas y programas; y proyecciones para el proceso de toma de decisiones.

Debido a que las técnicas cuantitativas permiten contrastar el modelo teórico-conceptual con datos reales, el gran bagaje de teoría sobre comercio internacional representa una fuente importante de hipótesis para la evaluación empírica.

Si los resultados del ejercicio empírico brindan evidencia de que los datos son consistentes con la teoría, esto implica que la teoría puede ser utilizada para predecir eventos en condiciones reales.

El análisis de políticas en los modelos de comercio internacional involucra la predicción del efecto de posibles cambios en las políticas de producción domésticas sobre el precio de mercado, volumen de exportación e ingreso de divisas para un producto dado.

Aunque comúnmente el análisis de políticas en los modelos de comercio internacional incluye la estimación de los efectos probables de opciones alternativas de política, también estos se pueden orientar hacia la evaluación de las políticas existentes y el desarrollo de medios más eficientes para obtener los mismos objetivos.

Existen fundamentalmente cuatro tipos de modelos de comercio internacional de productos agrícolas: a) los modelos multi-regionales, b) los modelos de precio de equilibrio no-espaciales, c) los modelos de precio de equilibrio espaciales y d) los modelos bi-regionales.

Los modelos multiregionales son básicamente sistemas de ecuaciones simultáneas especificadas de tal manera que reflejen el comportamiento de un número de regiones y su interrelación comercial a través del mercado mundial.

La característica principal de los modelos de equilibrio no-espaciales es que por lo general incluyen mayor detalle de la situación del mercado doméstico y que a menudo son mejor validados que otros modelos.

multirregionales. Estos modelos proveen la posición comercial neta de cada región, pero no así los flujos comerciales ni la proporción del mercado que controlan.

Los modelos de comercio de productos agrícolas básicos de mayor difusión son los modelos de equilibrio espacial. Estos presentan las ventajas de generar flujos comerciales y las proporciones del mercado controladas por cada región. También se reconoce su capacidad de facilitar la introducción de cuotas y barreras no tarifarias y de generar un patrón espacial de precios que es consistente con los costos de transporte.

En los modelos bi-regionales, los países del mundo se dividen generalmente en dos grupos: el grupo de interés y el resto del mundo. Estos modelos son básicamente del sector agrícola doméstico que son "abiertos" al comercio internacional. Incluyen funciones de demanda de exportación u oferta de importación junto con los factores de interrelación entre los precios domésticos y los mundiales, que reflejan la determinación simultánea de la oferta, la demanda y el precio del producto en el resto del mundo.

No obstante que estos modelos presentan la desventaja de no incluir "flujos comerciales", resultan apropiados para el problema que se aborda en este estudio ya que explican el comercio neto entre el grupo de países de interés (Centroamérica) y el resto del mundo.

Al incluir estas interrelaciones en los modelos biregionales, debe establecerse si las exportaciones o importaciones de un país o región representan una porción significativa del total del volumen comercializado del producto a nivel mundial, ya que esto determinará si el precio se toma como una variable endógena o exógena. En el primer caso, el precio doméstico e internacional son determinados simultáneamente y por lo tanto los parámetros de la función de exceso de oferta o demanda del resto del mundo deben ser estimados (9).

En aquellos casos en que el volumen de producto comercializado por el grupo de interés sea bajo en relación al total mundial, el precio se incorpora como una variable exógena y no se requiere de la estimación de funciones de oferta o demanda en el resto del mundo.

En este sentido, es necesario evaluar si la situación del grupo de interés corresponde al caso de la economía pequeña y no tomar una decisión ad-hoc.

Appelbaum y Kohli (1) desarrollaron un procedimiento, ampliamente utilizado, para evaluar la hipó-

tesis de país aceptador de precios (price taking behavior). Su método aplica principios de dualidad a mercados no-competitivos y provee una prueba paramétrica explícita para evaluar dicha hipótesis. Sin embargo, siguiendo un criterio de simpleza, en este estudio se recurre a una prueba de significación utilizando la prueba de T-estadístico.

#### Especificación del modelo

El modelo empírico está basado en la cuantificación de los factores que determinan el precio del cacao y de sus derivados a nivel mundial, para establecer el grado de influencia que sobre dicha determinación tienen los países centroamericanos.

El análisis cuantitativo comprende la estimación empírica de la función de oferta de cacao a nivel mundial, en la que se incluyen los factores relevantes, y permite estimar los parámetros que definen el grado de influencia que tienen los países de CA en la determinación del precio del cacao a nivel mundial. El modelo incluye únicamente un producto y asume que los mercados domésticos están interconectados y que, por lo tanto, las acciones de los diferentes agentes repercuten sobre los otros.

La especificación de la función inversa de oferta mundial de cacao es la siguiente:

$$1 \quad P_{m_t} = \sum_{j=1}^n F(Q_{m_{t-1}}, Y_{m_t}, Q_{ca_{t-1}})$$

donde

$P_{m_t}$  = Precio del cacao a nivel mundial en el año t

$Q_{m_{t-1}}$  = Cantidad de cacao disponible en el mercado mundial excluyendo a Centroamérica en el año t-1

$Q_{ca_{t-1}}$  = Oferta total de cacao de Centroamérica en el año t-1

$Y_{m_t}$  = Producto Interno Bruto "per cápita" promedio de los cinco mayores importadores de cacao (EEUU, Alemania Federal, Inglaterra, Francia y Japón)

Esta especificación considera el precio como la variable dependiente la cual es determinada por la cantidad de producto disponible en el mercado y por el ingreso promedio de los países importadores en ese mismo año.

La selección de la forma de la función de oferta se basa en tres criterios generales (8): las especificaciones económicas *a priori* y los modelos previos, el poder de predicción y el grado de "idoneidad" del mo-

delo y por último el criterio de simpleza y conveniencia.

En este caso se optó por funciones semi-logarítmicas ya que han sido ampliamente utilizadas en este tipo de estimados. Las funciones, por lo tanto, son especificadas matemáticamente de la siguiente manera:

$$2 \quad PM_t = \sigma + \beta_1 \text{Log}(Qm_{t-1}) + \beta_2 \text{Log}(Ym_t) + \beta_3 \text{Log}(Qca_{t-1})$$

La estimación econométrica de esta función se realizó mediante análisis de regresión utilizando el método de mínimos cuadrados simple. Las propiedades estadísticas de los parámetros estimados fueron evaluadas en términos de su poder de predicción, idoneidad y el coeficiente de determinación ( $R^2$ ).

Se utilizaron datos de producción mundial y stocks de cacao, producción en los países de CA, el promedio del PIB per cápita de los cinco mayores importadores y el precio real del cacao en grano tipo "bahía" en New York correspondiente al período 1963-1984. Para uniformar las magnitudes de la producción mundial y centroamericana, se computaron índices de producción anual, calculados como porcentaje del volumen de producción mundial para 1963.

## RESULTADOS

Los resultados de la estimación econométrica se presentan en el Cuadro 1. El signo de los coeficientes de oferta mundial ( $Qm_{t-1}$ ) es consistente con las espe-

cificaciones económicas *a priori*. El signo y magnitud del coeficiente de la variable ingreso ( $Ym_t$ ) soporta la noción ya conocida de que el cacao es un bien "superior". El signo positivo del coeficiente de la variable de producción de Centroamérica ( $Qca_{t-1}$ ) implica una relación positiva entre ésta y el precio mundial, sin embargo la validez de este resultado es limitada por el grado de significación estadística del coeficiente, la cual se establece más adelante.

El valor del coeficiente de determinación ( $R^2$ ) del 65% es algo bajo lo cual podría estar sugiriendo la exclusión de alguna(s) variable(s) relevantes.

El paso siguiente en el análisis consiste en la evaluación de hipótesis sobre el grado de significación de los parámetros estimados, lo cual implica determinar cuál(es) de ellos son significativamente diferentes de cero.

Para realizar esta evaluación se utiliza el test del t-estadístico (7) aplicando la fórmula siguiente:

$$3 \quad t_n = \frac{\beta_n}{(Se \beta_n)}$$

significativo al nivel de  $1-\alpha$

donde

$t_n$  = valor crítico de t para el coeficiente n obtenido de la distribución de t para un nivel significativo del 99% y 18 grados de libertad.

$\beta_n$  = parámetro estimado

$Se(\beta_n)$  = error estándar del parámetro

$\alpha = 0.01$

Cuadro 1. Coeficientes estimados y propiedades estadísticas.

Variable	Coeficiente estimado	Error estándar	Cociente "t" 18 GL	Coeficiente estandarizado	Correlación parcial
$Qm_{t-1}$	-0.99355	0.37233	-2.6684	-0.66196	-0.5324
$Ym_t$	(0.33587)e <sup>-3</sup>	(0.63374)e <sup>-4</sup>	5.2997	0.77357	0.7807
$Qca_{t-1}$	24.717	11.606	2.1297	0.52210	0.4486
Constante	(0.20853)e <sup>-1</sup>	0.26998	(0.77239)e <sup>-1</sup>	0	0.1820

Coeficiente de Determinación: 0.6469

Coeficiente de Determinación  
Ajustado por Grados de Libertad: 0.5880

Variancia del estimado: (0.59985)e<sup>-1</sup>

Error estándar del estimado: 0.24492

Media de la variable dependiente: 0.76318

Cuadro 2. Resultados del Test significación ( $\alpha = 0.01$ , 18 GL).

Variable	Coeficiente	Valor del t-estadístico	Resultado
$Qm_{t-1}$	-0.99355	-2.6684	Significativo
$Ym_t$	(0.033587)e <sup>-3</sup>	5.2997	Significativo
$Qca_{t-1}$	24.717	2.1297	No significativo
Constante	(0.20853)e <sup>-1</sup> (-0.77239)e <sup>-1</sup>		No significativo

Las hipótesis respectivas son las siguientes:

$$H_0: \beta_n = 0$$

$$H_A: \beta_n \neq 0$$

La hipótesis nula a evaluar establece que cada uno de los coeficientes es igual a cero en contraposición a la hipótesis alternativa de que su valor es diferente de cero, es decir, que son significativos.

Los valores del t-estadístico fueron obtenidos de una tabla de porcentajes de probabilidad de la distribución de t para 99% de probabilidad y se presentan en el Cuadro 2

Los resultados del test implican que los coeficientes de las variables producción mundial ( $Qm_{t-1}$ ) e Ingreso ( $Ym_t$ ) son significativos, mientras que por otro lado, el coeficiente de la variable de producción centroamericana ( $Qca_{t-1}$ ) no es significativa y estadísticamente no difiere de cero.

## DISCUSION

### La situación del mercado internacional del cacao desde la perspectiva de los países centroamericanos

Los resultados obtenidos en la estimación econometrífica soportan la noción de que para los países de Centroamérica el precio del cacao a nivel mundial debe ser tratada como una variable exógena ya que enfrentan una demanda infinitamente elástica\*.

Lo anterior implica que estos países pueden comercializar en el mercado internacional de cacao un volumen mayor de producto sin llegar a afectar su precio

Con base en la evidencia empírica recolectada, la situación que enfrentan los países de CA puede ilustrarse de la manera que se presenta en la Fig. 1. En dicha figura la oferta y la demanda de cacao en grano (a nivel primario) en el mercado local de cada país corresponden a  $O_L$  y  $D_L$  respectivamente

Si únicamente existiese la posibilidad de vender el cacao en el mercado local, el precio prevaleciente sería  $P_L$ , que corresponde al punto de intersección entre las curvas de oferta y demanda locales ( $O_L$  y  $D_L$ ).

Para aquellos precios por encima de  $P_L$ , los productores nacionales producirían una cantidad de producto superior a la que los consumidores locales estarían dispuestos a comprar, produciéndose un desbalance entre la oferta y la demanda locales. Por medio de la cuantificación de las cantidades alternativas de cacao que los productores nacionales estarían dispuestos a producir a precios por encima de  $P_L$ , es posible trazar una curva de exceso de oferta del país (EO), que equivale a una función de oferta de cacao para el mercado internacional u oferta de exportación.

El modelo se completa con la inclusión de la demanda y la oferta por el producto procesado (a nivel secundario) que corresponden a  $D'_L$  y  $O'_L$  respectivamente. Similarmente el precio de equilibrio del producto procesado o derivados del cacao corresponde a  $P'_L$ \*\*. La función de exceso de oferta de cacao procesado se muestra como  $E'O$ .

Para establecer la situación de los países de CA en el mercado internacional, se debe considerar la situación de sus economías. Como se recordará, anteriormente se determinó que, estos poseen economías de mercado relativamente abiertas, lo cual implica que los precios en el mercado internacional son los precios vigentes en el mercado local.

Por otro lado, su producción, como se comprobó mediante el ejercicio econometrífico, es pequeña con relación al volumen total de la oferta en el mercado, por lo que éstos no tienen influencia en la determinación del precio del cacao a nivel mundial. Para ellos, este precio es dado y debe considerarse como una variable exógena o predeterminada. Incorporando estos

\* En términos de teoría económica esto implica que estos agentes son aceptadores de precios en el mercado internacional.

\*\* Nótese que  $D'_L$  y  $O'_L$  se han trazado asumiendo que el margen de mercadeo o costo unitario de procesamiento es constante.

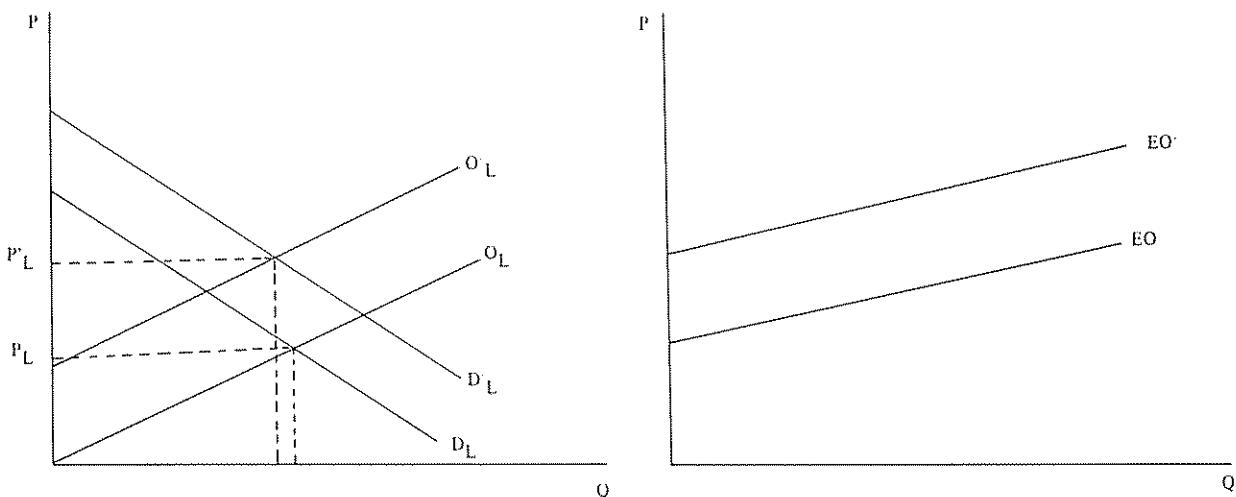


Fig. 1. "Demanda y oferta de cacao en los países centroamericanos".

conceptos, es posible completar el modelo tal y como se ilustra en la Fig. 2

En esta figura se establece la demanda que enfrentan los países de Centroamérica la cual es perfectamente elástica al nivel del precio de equilibrio en el mercado mundial ( $P_m'$ ). Esto significa que pueden exportar la totalidad de su producción de cacao a un mismo precio. De igual manera  $P_m'$  corresponde al precio de los derivados del cacao a nivel mundial que también rige en los países de CA.

Para estos países, el precio internacional está por encima del precio de equilibrio que existiría en el mercado local en ausencia de comercio exterior, por lo tanto, la cantidad ofrecida a nivel local es mayor a la demanda a dicho precio. Se produce, en consecuen-

cia, una cantidad de cacao en grano equivalente a  $Q_3$ . De este total,  $Q_2$  se procesa localmente y la diferencia ( $Q_3 - Q_2$ ) se exporta

Con relación al producto procesado, la cantidad de derivados de cacao que se procesan localmente es  $Q_4$ , de la cual  $Q_1$  se consume localmente exportándose la diferencia ( $Q_4 - Q_1$ ) a mercados en el exterior

El modelo también permite estimar el monto del ingreso de divisas por concepto de exportación de cacao y sus derivados según la ecuación siguiente:

$$4 \quad I = [ P_m (Q_3 - Q_2) + P_m' (Q_4 - Q_1) ] \\ = P_m Q + P_m' Q'$$

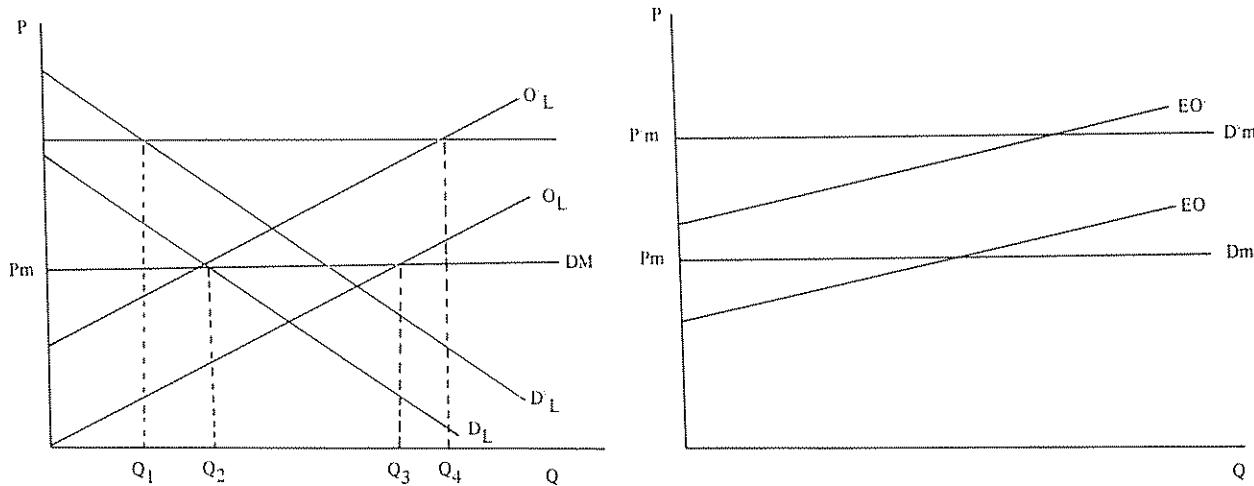


Fig. 2. "Situación de los países de Centroamérica en el mercado internacional del cacao".

### Implicaciones para la política de comercio externo de cacao de los países de Centroamérica

El hecho de que para los países de CA el precio del cacao sea un factor completamente externo y pre-determinado, significa que la única variable que pueden manejar para obtener un ingreso de divisas adecuado, es el volumen de producto exportado. En consecuencia, la determinación del volumen de exportación óptimo resulta de suma importancia. (El nivel óptimo responde a un objetivo nacional que puede ser la maximización del ingreso de divisas, la utilización más eficiente de los recursos del país, etc.). Este volumen se calcula según la relación siguiente:

$$5 \quad Q_t = Q_m + Q'_m = \frac{l_i}{P_m * P'_m}$$

donde

$Q_t$  = cantidad total de producto a exportar (cacao en grano procesado)

$l_i$  = ingreso de divisas (objetivo) del país  $i$   
y las demás variables fueron definidas anteriormente

El nivel de apertura de la economía de un país puede calcularse por medio de la elasticidad de transmisión de precios (ETP) que mide el grado en que los precios domésticos responden a las variaciones en el precio internacional.

a ETP se define matemáticamente como:

$$6 \quad \epsilon_{P_L, P_m} = \frac{\delta P_L}{\delta P_m} * \frac{P_m}{P_L}$$

Se deduce de la ecuación seis, que la ETP tendrá un valor unitario en el caso de aquellos países en los cuales un cambio en el precio internacional se corresponde con un cambio de igual magnitud en el precio doméstico y será menor que uno en aquellos casos en que la respuesta del precio doméstico sea menos que proporcional a la variación en el precio internacional. El caso extremo corresponde a una economía completamente cerrada en donde la ETP es cero.

El supuesto de que las economías de los países de CA sean abiertas, implica que la elasticidad de transmisión del precio internacional (ETP) tiene un valor unitario. Sin embargo, en la realidad la ETP es específica para cada país, y variará en la proporción en que las políticas internas distorsionen la condición de equilibrio y la respuesta a las variaciones en el precio internacional.

Tomando este aspecto en consideración, se puede completar el modelo incorporando a la ecuación cinco la noción de la ETP de la siguiente manera:

$$7 \quad Q_{t,i} = \frac{\delta P_L}{\delta P_m} * \frac{P_m}{P_L} \frac{l_i}{P_m P'_m}$$

$$= \epsilon_{P_L, P_m} * \frac{l_i}{P_m P'_m}$$

### CONCLUSIONES

El modelo desarrollado permitió comprobar la proposición de que los países de CA enfrentan una demanda infinitamente elástica a nivel del precio internacional de cacao, noción proveniente de la teoría y que se fundamenta en el hecho de que su volumen de producción es muy reducido en relación a la oferta total en el mercado.

La anterior proposición tiene varias implicaciones de trascendencia. En primer lugar el potencial para la expansión de las exportaciones de cacao de CA es muy grande, sin embargo al definir un programa de incremento de la producción debe tomarse en consideración que los precios de este producto son dictados por los costos de producción de los grandes exportadores. Por consiguiente, el margen de utilidad de los productores en los países centroamericanos estará determinado por su eficiencia relativa frente a los productores en los países de alta producción. Si los productores centroamericanos son más ineficientes que los africanos y brasileños, existirá el peligro de que los precios desciendan por debajo de los costos de producción en CA afectando la rentabilidad del cultivo. Esta situación podría eventualmente conducir a la necesidad de imponer un subsidio, lo cual es económicamente ineficiente, o a la eliminación de plantaciones por parte de los agricultores, y al fracaso del programa de expansión a mediano plazo.

En segundo lugar, es claro que si bien es cierto una política de expansión de la producción y exportación de cacao por parte de los países de CA es viable, su éxito en el largo plazo sólo podrá asegurarse si esta política se instrumenta mediante un programa de incremento de la eficiencia productiva, más que por medio de un aumento en el área de producción.

Otra conclusión importante que se deriva del análisis cuantitativo lo es el hecho de que el nivel de ingreso de los países importadores tiene un efecto marcado sobre el precio internacional del cacao, elemento que por sus implicaciones debería ser objeto de un análisis más detallado. Por el momento, resulta evidente que

la variable ingreso debería ser considerada como un parámetro en la elaboración de proyecciones y en la formulación de políticas de producción y exportación en los países productores.

Finalmente, una implicación no menos trascendente que se deriva del estudio, se refiere al hecho de que los países centroamericanos no tienen incentivo económico alguno para unirse al Convenio Internacional

del Cacao, puesto que manteniéndose al margen de dicho Convenio pueden beneficiarse de los altos precios que la acción de éste genere, y no tendrían que enfrentar la imposición eventual de cuotas de exportación (i.e. pueden actuar como "Free Riders"). Se debe aclarar no obstante, que esta es una apreciación puramente económica que no toma en consideración aspectos de orden geopolítico y estratégico que generalmente tienen un gran peso en las iniciativas de integración.

#### LITERATURA CITADA

- 1 APPELBAUM, E.; KHOI, U.P. 1979 Canada-U.S Trade: Test for the small open economy hypothesis. Canadian Journal of Economics. 12:1-14
- 2 BANCO CENTROAMERICANO DE INTEGRACION ECONOMICA 1989 Situación actual y perspectivas de la actividad cacaotera en Centroamérica 1989. Tegucigalpa, Hon., 310 p.
- 3 BAUMOL, W.J. 1977 Economic theory and operations analysis Englewood Cliffs, N J, Prentice Hall
- 4 FAO 1986. Proyecciones de productos básicos agrícolas a 1990. Roma, Italia
- 5 FAO. 1986 Anuario de Comercio. Roma Italia v.40
- 6 GILL AND DUFFUS. Cocoa statistics Londres, England
- 7 GUJARATI. 1978 Basic econometrics. New York, McGraw-Hill
- 8 HU, T-W. 1975. Basic econometrics. An introductory analysis Baltimore, University Park Press.
- 9 KINDLEBERGER, C.P.; LINDERT, P.A. 1978 International economics Illinois, Richard D. Irwing Inc
- 10 Mc CALLA, A.F.; JOSLING, T. 1985. Agricultural policies and world markets New York, McMillian Publishing
- 11 ROBINSON, H. 1987. An economic analysis of the world market for bananas: Impact of an international banana agreement M.S Thesis University of California, Davis.
- 12 THE WORLD BANK. 1986. Price prospects for major primary commodities Washington, D.C
- 13 THOMPSON, R.L. 1981. A survey of recent U.S. developments in international agricultural trade models. Washington, D.C. Bibliographies and Literature of Agriculture no. 21.

# *Theobroma cacao* DNA: Protocols for RFLP Analysis<sup>1</sup>

M.L. Mirazon\*, G. Gora-Maslak\*, L. McHenry\*, P.J. Fritz\*

## ABSTRACT

This paper demonstrates the applicability of restriction fragment length polymorphism (RFLP) technology to *T. cacao* L and gives detailed protocols for its use. Genomic DNA (gDNA) from two cocoa trees in the Penn State Greenhouse collection was hybridized to a cocoa gDNA clone (pTC101) in Southern blot experiments for detection of RFLPs. Two restriction endonucleases were used to digest the plant DNA and in one case a polymorphism was identified. The availability of methods for using RFLPs as new genetic markers offers a new time-saving method for germplasm identification in *T. cacao* as perfection of RFLP methodology will allow knowledge of genetic variability to be determined at the seedling stage. When RFLPs are correlated with desirable agronomic traits, improvement in breeding programs can be expected to follow.

## COMPENDIO

Este trabajo demuestra la aplicabilidad de la tecnología del polimorfismo restringido de longitud de fragmentos (PRLF) aplicada al cacao (*Theobroma cacao* L.) y da protocolos detallados para su utilización. El genoma DNA (gDNA), de dos cacaoteros de la colección existente en los invernaderos de Penn State, fue hibridizado a un clone g DNA (pTC101) procedente de los experimentos de Southern para detectar PRLF. Se utilizaron dos endonucleasas de restricción para digerir el DNA; en un caso, se identificó polimorfismo. La disponibilidad de métodos para utilizar los PRLF como herramienta genética, ofrece un método nuevo y rápido para identificar germoplasma de *T. cacao* pues la perfección de la metodología PRLF permite conocer la variabilidad genética a ser determinada en la etapa de plántula. Cuando se correlaciona el PRLF con características agronómicas deseables, se pueden esperar resultados ventajosos en los programas de fitomejoramiento.

## INTRODUCTION

DNA markers, first described as tools for genetic analysis in 1974 (14), and later used in linkage studies and in monitoring genetic traits in humans (6), are now being used successfully in higher plants (4, 5, 7, 15, 19). The method depends upon the ability of restriction endonucleases to catalyze cleavage of DNA at specific recognition sites yielding polydeoxynucleotides of defined lengths. The method has been called restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis.

Differences in RFLPs are an expression of the genetic heterogeneity encountered among individuals of a species; they are visualized when genomic DNA

is digested with a restriction endonuclease, electrophoresed, transferred to a solid support, and hybridized to a labelled probe.

The use of RFLPs as genetic markers has broad potential application in plant genetics, for individual, varietal and parental identification, mapping and monitoring of quantitative traits, analysis of genome organization, measurement of genetic diversity, and development of detailed linkage maps (4, 5, 6, 7, 15, 19). Extensive mapping using RFLPs has been done with maize, tomato, lettuce and peppers (16, 17).

Many of the proposed uses of RFLPs are identical to previously developed approaches using isozymes as molecular markers. Though isozyme markers have been quite useful in attempts to characterize cocoa germplasm (1, 2, 21, 22, 23, 38), their use is limited, first because not all genes code for enzymes and second, because much of a plant genome is composed of non-coding regions. In contrast, a potentially unlimited number of RFLPs exist, which should allow much wider use of the molecular marker approach to identify cocoa strains.

1 Received for publication 13 March 1990.

Published as Paper No. 7877, Journal Series, Pennsylvania Agricultural Experiment Station. This work was supported in part by an endowment from the American Cocoa Research Institute (ACRI) and a grant from the United States Agency for International Development. We thank Dr. Paul Chomet of the Cold Spring Harbor Laboratory, for providing modifications of the DNA isolation method

\* ACRI Cocoa Molecular Biology Laboratory, Department of Food Science, The Pennsylvania State University, University Park, PA 16802, USA.

The use of RFLPs for germplasm identification in *T. cacao* L. would be particularly useful to cocoa breeders, who historically have used morphological markers to identify cocoa varieties (3, 9, 10, 11, 12, 28, 29, 30, 32, 33, 35, 36). Such markers are often subjective, influenced by environment, and are generally applicable only to mature trees. In contrast, RFLPs identify genetic differences at the DNA level, are not influenced by the environment, and can be detected at very early stages of plant development, helping to minimize the time and cost of planting and maintaining "unsuitable" material.

The purpose of this report is to give detailed protocols for RFLP analysis in cocoa and to demonstrate the general applicability of RFLP analysis to the cocoa plant.

## MATERIALS AND METHODS

### Source of plant material

The plants used in this study were growth in the cocoa greenhouse maintained at The Pennsylvania State University (PSU). Presently, the collection includes 27 five-year-old trees that originated from seed propagation of clones EQX-100 and UF-667. For the present study PSU 3 (EQX-100 origin) and PSU 20 (UF-667 origin) were used.

### DNA preparation

Total DNA was obtained from PSU 20 and PSU 3 leaf tissue by a modification of the method of Malmberg *et al.* (25): 1 g of fresh or frozen tissue was ground, using a mortar and pestle, to a fine powder in the presence of either liquid nitrogen or dry ice in sufficient amount to ensure that the grinding would occur without thawing of the leaf tissue. The powdered material was added to 6 ml of ice-cold extraction buffer (2.52 g urea, 0.35 M NaCl, 50 mM Tris-Cl pH 8.0, 20 mM EDTA, 1% Sarkosyl) in a small beaker on ice. The importance of maintaining the tissue in a frozen state until the first centrifugation cannot be over-emphasized. The mixture was transferred to a 15 or 30 ml Corex tube, the tube was placed in crushed ice, and the mixture dispersed with a Tissumizer (Tekmar Co., Cincinnati, OH) according to the following schedule: 30 s burst, 30 s wait, 30 s burst. The mixture was then centrifuged 5 min at 10 000 xg at 4°C. The supernatant was decanted and strained through Miracloth (CalBiochem, San Diego, CA). Subsequently an equal volume of phenol/chloroform: isoamyl alcohol, 24:1 (32) was added and mixed gently for 10 min at room temperature, and

centrifuged at 5 000 xg for 5 min. The aqueous (upper) phase was removed (making sure that none of the interphase was picked up) and mixed 10 min at room temperature with an equal volume of chloroform: isoamyl alcohol, 24:1, followed by centrifugation. The aqueous phase was removed and 1/10 vol of 4.4 M ammonium acetate, pH 5.0, plus 1 vol ice-cold isopropanol were added and mixed well. At this point a white, stringy cloud of DNA formed. After standing in ice for 30 min, the DNA mass could be removed with a glass stirring rod. The DNA was then washed in 75% ethanol and resuspended in 200 µl of 10 mM Tris-Cl pH 8.0/1 mM EDTA pH 8.0 (TE). This volume usually yields a DNA concentration of about 0.5 g/l when starting with 1 g of leaf tissue. DNA does not always dissolve readily; usually several hours or perhaps overnight may be necessary for complete solubility.

### Preparation of partial cocoa leaf genomic library for probe selection

Hpa II-digested genomic DNA was ligated to Acc I-digested pUC 13 (37) using T4 ligase, and then transformed (8, 27) into *E. coli* strain DH5 (BRL, Bethesda, MD). Transformants were plated on LB/Amp/X-Gal agar plates (8, 26, 27) to identify clones. Positive clones were first identified by blue-white selection, then screened for the presence of inserts by extracting DNA with a rapid plasmid isolation procedure (8, 27) and subsequent analysis by gel electrophoresis. Plasmid DNA containing useful probes was then prepared by a large-scale plasmid procedure (8, 26, 27, 31). Plasmids containing cocoa DNA are designated pTC (plasmid *T. cacao*) followed by a number. Numbers 1-99 have been reserved for chloroplast or mitochondrial DNA. A useful method for preparing probes suitable for plant RFLP analysis has recently been published (18).

### Probe labelling

Total plasmid DNA was nick-translated (BRL, Bethesda, MD, or IBI, New Haven, CT, kit) in a 50 x 1 reaction mixture containing 13 g probe DNA, 25 mM Tris-Cl pH 7.8, 50 mM, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 µg bovine serum albumin (BSA), 1 mM DTT, 500 µM dGTP, dCTP, dTTP, 400 µM biotinylated dATP (BRL), 4 ng DNase I and 4 units DNA Polymerase I. Incubation was for 2 h at 15°C, after which the labeled probe was separated from unincorporated nucleotides by chromatography on G-50 Sephadex. Radioactive probes can be prepared by substituting <sup>32</sup>P-dATP for the biotinylated nucleotide. The biotinylated probes can be stored for approximately two years.

## RFLP analysis

**Hybridization to probe.** Two g of leaf DNA from PSU and 2 g from PSU 20 were digested with a series of restriction endonucleases. Digestion products were separated by electrophoresis in 1% agarose gels, stained with ethidium bromide to ensure proper digestion, transferred to nitrocellulose sheets by the Southern procedure (34), and hybridized with biotin labeled pTC101 (see below). Leaf DNA fragments hybridizing to the probe were visualized by appearance of blue bands. Details of the hybridization and visualization procedures are described below.

Nitrocellulose (NC) sheets containing digested cocoa DNA were prehybridized 3 h at 42°C in 100 l/cm<sup>2</sup> of a solution containing 50% formamide, 5X SSC (0.75 M NaCl, 80 mM sodium citrate), 5X Denhardt's (0.1% Ficoll 400, 0.1% polyvinylpyrrolidone, 0.1% BSA), 25 mM sodium phosphate pH 6.5 and 0.5 mg/ml denatured salmon sperm DNA (Sigma Chem. Co., St Louis, Missouri). Prehybridization solution was replaced by hybridization solution: 45% formamide, 5X SSC, 1X Denhardt's 20 mM sodium phosphate pH 6.5, 0.2 mg/ml denatured salmon sperm DNA, 5% dextran sulfate and denatured (10 min 100°C), labelled probe. Overnight hybridization was done at 42°C. The sheets were then washed twice in 2X SSC, 0.1% SDS 3 min at RT, twice in 0.2X SSC, 0.1% SDS 3 min at RT, twice in 0.16X SSC, 0.1% SDS 15 min at 42°C, and rinsed in 2X SSC. Application of the non-radioactive DNA detection system was according to the manufacturer's instructions (BRL). The NC sheets were washed 1 min in 0.1 M Tris-Cl (pH 7.5)/0.15 M NaCl (buffer 1), incubated 1 h at 65°C in 3% BSA in buffer 1 (buffer 2), re-hydrated 10 min at room temperature in buffer 2 and incubated 10 min with 1 g streptavidin-alkaline phosphatase conjugate (BRL) per ml buffer 1. The sheets were then washed twice in buffer 1 and once in 0.1 M Tris-Cl (pH 9.5)/0.1 M NaCl/50 mM MgCl<sub>2</sub> (buffer 3).

**Visualization of polymorphisms (BluGene,™ BRL):** To visualize hybridizations with the biotinylated probe, the NC sheets were incubated in heat-sealed plastic bags, 3 h in 330 mg nitro-blue tetrazolium (NBT)/166 mg of 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (BCIP) per ml buffer 3. The reaction was carried out in the dark. To terminate color development, the sheets were washed in 20 mM Tris-Cl (pH 7.5)/0.5 mM EDTA (stop buffer).

Although the manufacturers of the DNA detection system recommend storing the sheets dry by baking them 1-2 min at 80°C under vacuum, we observed

that this causes weak bands to fade; we therefore prefer to store the sheets in stop buffer in a sealed plastic bag.

## RESULTS

**Selection of probes and restriction endonucleases:** A partial genomic library was constructed in the 2.7 kilobase pair plasmid pUC 13. Inserts averaging 1 kb or less were cloned in the lac Z gene (13). Initially several clones were selected as potentially useful probes but only one proved to contain a low copy number sequence (i.e. a sequence occurring only once or a few times in the cocoa genome). Clones containing repetitive cocoa DNA gave smears instead of discrete bands and thus could not be used in the search for polymorphisms. Fig. 1 shows that this recombinant plasmid (pTC101) has a cocoa insert of approximately 400 bp.

The choice of restriction endonucleases was initially based on their cost and ability to catalyze digestion of cocoa DNA to completion, since incomplete digestion also results in smears upon hybridization with the probe. The enzymes selected for analysis were EcoRI and Hind III.

**Detection of a polymorphism between two randomly selected trees:** Fig. 2 shows the electrophoretic pattern of cocoa leaf DNA from trees PSU 3 and PSU 20 digested with EcoRI and Hind III. A replica of the gel was obtained by transferring the DNA to nitrocellulose paper followed by hybridization to a biotinylated probe (pTC101). Fig. 3 shows the resulting hybridization pattern. When digested with EcoRI, DNA from PSU 20 exhibits three distinct fragments of approximately 3.8, 2.1 and 0.99 kbp. By contrast, DNA from PSU 3 digested with the same enzyme exhibits only two of those fragments (2.1 and 0.99 kbp). Thus one genetic difference between the two trees can be detected by this combination of probe and enzyme. In contrast, the trees are indistinguishable when the DNA is digested by Hind III, since both show the same hybridization pattern, with fragments of approximately 6.5, and 1.0 kb (Fig. 3 lanes C and D). The sizes of the restriction fragments were calculated with the aid of a computer sizer program (Map, BIONET, Intelligenetics, Mountainview, CA).

## DISCUSSION

Our results indicate that this method is applicable to *T. cacao* and that a polymorphism can be detected between two randomly selected trees. The detected genetic variation could result from various kinds of

genotypic alterations, for example, one or more bases could differ, resulting in the loss of a cleavage site or formation of a new one; alternatively, insertions or deletions of blocks of DNA within a fragment could alter its size. For instance, digestion with Eco RI revealed a 3.8 kbp fragment that is present in PSU 20 DNA, but not in PSU 3 DNA. This might be due to a DNA insertion in PSU 20 that contained part of the probe sequence. It is also possible that one of the cleavage sites that defines the 3.8 kb fragment is missing in PSU 3 DNA and that the probe sequence contained in such fragment is present in the 2.1 kbp fragment. The fact that some hybridization bands are stronger than others in the same DNA lane may imply that they contain more copies of the cloned DNA sequence than weaker hybridization bands. Or, the weaker bands could contain only part of the target sequence, resulting in a partial hybridization of those

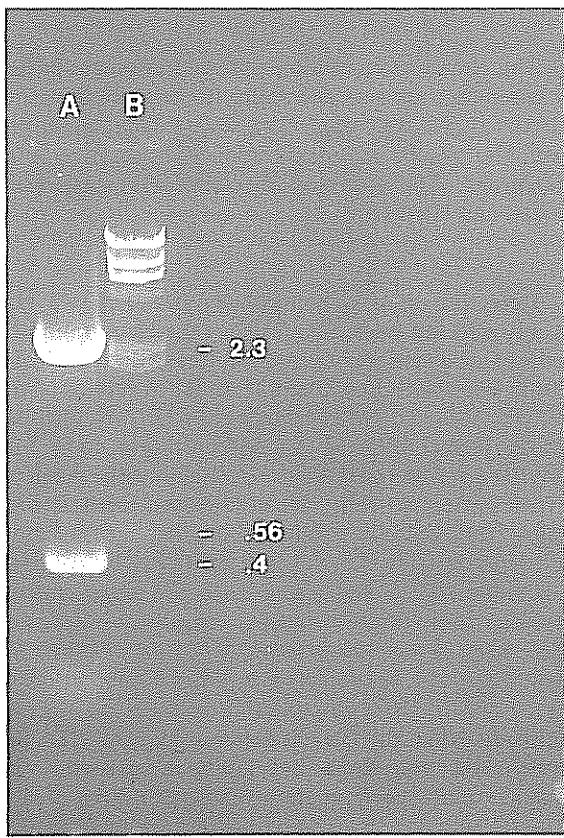


Fig. 1 Preparation of probe. Experimental details of DNA preparation are given in materials and methods. Electrophoretic analysis of the clone pTC101. 14 g of plasmid DNA were cut with 15 U of EcoRI and Hind III (lane A). Lane B contains 1.2 g of the DNA fragment size standard DNA digested with Hind III. The DNA was loaded onto a 1% agarose gel, electrophoresed for 1.5 hr (50 MA) and stained with ethidium bromide (6.0 mg/ml). Photography was done using a Polaroid MP-4 camera, a 325 nm Transilluminator and a red filter. Film exposure (Polaroid type 55) was for 1.5 min.

fragments, while the stronger bands could contain the entire cloned sequence, resulting in a total hybridization and a stronger signal (Fig. 3 lane B).

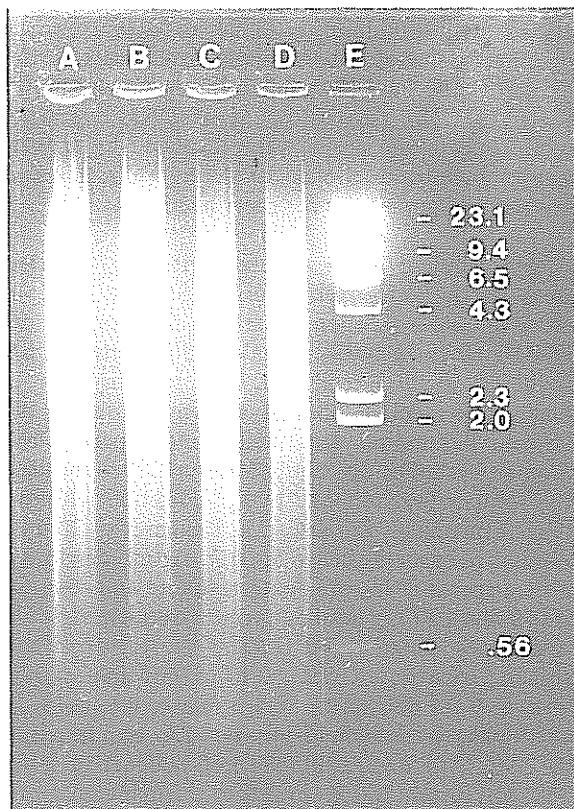


Fig. 2 Electrophoresis of cocoa genomic DNA 1% agarose gel (stained with ethidium bromide at 6.0 mg/ml) containing 1 g PSU 3 DNA (lanes A & C), 1 g PSU 20 DNA (lanes B and D), cut with 20 U EcoRI (lanes A and B) and 20 U Hind III (lanes C and D). Lane E contains a fragment size standard (DNA cut with Hind III). Electrophoresis was for 2.5 hr at 120 V (85 mA). Photography was as described in legend to fig. 1

When we compared the sensitivity of the biotin non-radioactive labelling system to the classical radioactive labelling system (data not shown), we saw no differences. The suitability of biotinylated probes should lead to extensive use of this extremely sensitive technique in the cocoa growing countries, where research facilities may not be equipped for the use of radioactive materials. The use of non-radioactive probes as an alternative for detection of specific DNA sequences has been discussed (20, 24).

Further work is in progress to expand the application of RFLP analysis to the cocoa plant by preparing

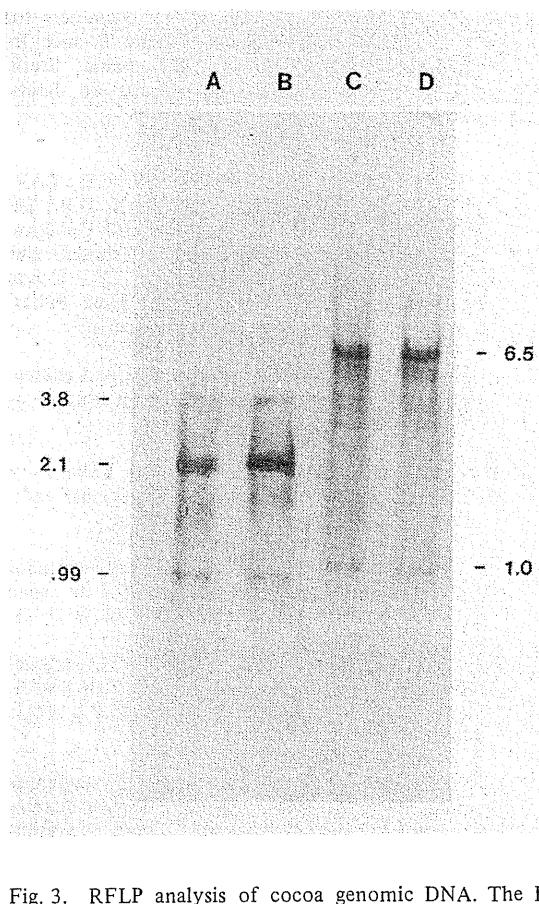


Fig. 3. RFLP analysis of cocoa genomic DNA. The DNA from the agarose gel shown in fig. 2 was transferred to nitrocellulose and hybridized with biotinylated pTC101.

more probes and by using more enzymes. The technique promises to be a powerful tool for germplasm identification in *T. cacao*, to say nothing of its uses in selecting superior trees at the seedling stage.

#### LITERATURA CITED

1. AMEFIA, Y.K., CILAS, C.; DJIEKPOR, E.K.; PATRIOT, M. 1984. Etude du polymorphisme enzymatique chez le cacaoyer. I. Mise au point d'une méthode d'extraction et mise en évidence d'un locus spécifiant une estérase. *Café, Cacao, Thé* 28:89-94.
2. ATKINSON, M.D.; WITHERS, L.; SIMPSON, M.J.A. 1986. Characterization of cacao germplasm using isozyme markers. A preliminary survey of diversity using starch gel electrophoresis and standardization of the procedure. *Euphytica* 35:741-750.
3. BARTLEY, B.G. 1986. Seed size inheritance. St. Augustine, Tri.; Annual Report on Cacao Research 1985. Imperial College of Tropical Agriculture. p. 23-25.
4. BECKMANN, J.S.; SOLLER, M. 1983. Genetic polymorphism in varietal identification and genetic improvement. *Theoretical and Applied Genetics* 67:25-33.
5. BECKMANN, J.S.; SOLLER, M. 1983. RFLPs in genetic improvement: methodologies, mapping and cost. *Theoretical and Applied Genetics* 67:35-43.
6. BOTSTEIN, D.; WHITE, R.; SKOLNICK, M.; DAVIS, R.W. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using RFLPs. *American Journal of Human Genetics*. 32:314-331.
7. BURR, B.; EVOLA, S.V.; BURR, F.A.; BECKMAN, J.S. 1983. The application of RFLP to plant breeding. *Genetic Engineering v.5*, p. 45-59.
8. DAVIS, R.W.; BOTTSTEIN, D.; ROTH, J. 1980. A Manual for Genetic Engineering. Advanced Bacterial Genetics. N.Y., Cold Spring Harbor.
9. ENRIQUEZ, G.A.; SORIA, V.J. 1966. Estudio de la variabilidad de varias características de las mazorcas de cacao (*Theobroma cacao* L.). *Fitotecnia Latinoamericana* 3(1-2):99-118.
10. ENRIQUEZ, G.A.; SORIA, V.J. 1967a. Selección y estudio de los caracteres útiles de la flor para la identificación y descripción de cultivares de cacao. *Cacao (C.R.)* 12(1):8-16.
11. ENRIQUEZ, G.A.; SORIA, V.J. 1967. A study of certain leaf characteristics of cacao (*Theobroma cacao* L.). *Tropical Agriculture (Tri.)* 44(2):117-123.
12. ENRIQUEZ, G.A.; SORIA V.J. 1968. The variability of certain bean characteristics of cacao (*Theobroma cacao* L.). *Euphytica* 17(1):114-120.
13. GLOVER, D.M. 1985. DNA Cloning. IRL Press Ltd. Oxford, England, v.1, p. 89-100.
14. GRODZICKER, T.; WILLIAMS, J.; SHARP, J.; SAMBROOK, J. 1974. Physical mapping of temperature-sensitive mutations of adenoviruses. *Symp. Quant. Biol.* 39:439-446.
15. HELENTJARIS, T.; KING, G.; SLOCUM, M.; SIEDENSTRANG, L.; WEGMAN, S. 1985. RFLPs as probes for genetic diversity and their development as tools for applied plant breeding. *Plant Mol. Biol. Rep.* 5:109-118.
16. HELENTJARIS, T.; SLOCUM, M.; WRIGHT, S.; A.; NIENHUIS, J. 1986. Construction of genetic linkage maps in maize and tomato using RFLPs. *Theoretical and Applied Genetic* 72:761-769.
17. LANDRY, S.; KESSELI, R.V.; FARRARA, B.; MICHELMORE, R.W. 1987. A genetic map of

- lettuce with RFLP, isozyme, disease resistance and morphological markers. *Genetics* 116:331-337.
18. LANDRY, B.S.; MICHELMORE, R.W. 1985 Selection of probes for restriction fragment length analysis from plant genomic clones. *Plant Mol Biol Rep* 3:174-179
19. LANDRY, B.S.; MICHELMORE, R.W. 1987. Methods and applications of RFLP analysis to plants. In *Tailoring Genes for Crop Improvement* p 25-44
20. LANGER, P.R.; WALDROP, A.A.; WARD, D.C. 1981 Enzymatic synthesis of biotin-labelled polynucleotides: Novel nucleic acid affinity probes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 78:6633-6637
21. LANAUD, C.; BERTHAUD, J. 1984. Mise en évidence de nouveaux marqueurs génétiques chez *Theobroma cacao* L par les techniques d'électrophoresc. In *International Cocoa Conference (9 Togo Africa) Proceedings* p 249-253
22. LANAUD, C. 1986 Utilisation des marqueurs enzymatiques pour l'étude génétique du cacaoyer: *Theobroma cacao* L I Contrôle génétique et "linkage" de neuf marqueurs enzymatiques. *Café, Cacao, Thé* 30:259-270.
23. LANAUD, C. 1986 Utilisation des marqueurs enzymatiques pour l'étude génétique du cacaoyer: *Theobroma cacao* L. II Etude du polymorphisme de six systèmes enzymatiques. *Café, Cacao, Thé (France)* 30:271-280.
24. LEARY, J.J.; BRIGATTI, D.J.; WARD, D.C. 1983 Rapid and sensitive colorimetric method for visualizing biotin-labelled DNA probes hybridized to DNA or RNA immobilized on nitrocellulose: Bio-blots. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 80:4045-4049
25. MALMBERG, R.; MESSING, J.; SUSSEX, I. 1984 *Molecular Biology of Plants - A Laboratory Course Manual*. N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory p 86.
26. MANIAIIS, I.; FRITSCH, E.; SAMBROOK, J. 1982 *Molecular Cloning A Laboratory Manual* N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory
27. MILLER, J. 1972 *Experiments in Molecular Genetics*. N.Y. Cold Spring Harbor Laboratory.
28. OSTENDORF, F.W. 1957. Identifying characters for cacao clones. In *Reunião do Comitê Técnico Interamericano de Cacau 6*, 1956, Bahía, Brasil. Salvador, Bra Instituto de Cacau da Bahia p 89-110
29. POUND, F.J.; COPE, F.W.; CHEESMAN, E.E.; BARTLEY, B.G.; JOLLY, A.C.; MURRAY, D.B.; DE VERTEUIL, L.L. 1986. Selection and Genetics. Fifty Years of Cocoa Research in Trinidad and Tobago: 1930-1980 St. Augustine, Tri., Cocoa Research Unit, The University of West Indies p 3-31.
30. RUINARD, J. 1964 Variability of various pod characters as a factor in cacao selection. *Euphytica* 13(1):19-23
31. SCHRADER, N.I.; HALLEY, B.W. 1980 Laboratory methods for hormone action and molecular endocrinology. Tex., Baylor University.
32. SORIA, V.J.; ESQUIVEL, O. 1968. Algunos resultados del programa de mejoramiento genético de cacao en el IICA, Turrialba Cacao (C.R.) 13(2):19-23
33. SORIA, V.J.; OCAMPO, F.; PAEZ, G. 1974. Parental influence of some cacao clones on the yield performance of their progenies. *Turrialba (C.R.)* 24(1): 58-65.
34. SOUTHERN, E.M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of Molecular Biology (England)* 98:503-517.
35. TOXOPEUS, H. 1969. The second Nigerian breeding program. In *Conference Internacional de Pesquisa em Cacau (2, 1967 Salvador e Itabuna, Bra) Memorias Bahia, Bra, CEPLAC* p. 129-132.
36. VELLO, F. 1965. Estudos sobre a segregação do caráter cor de amendoas de cacao (*Theobroma cacao*). In *Informe Annual 1965 Itabuna Bra, Centro de Pesquisa do Cacau* p. 10.
37. VIEIRA, J.; MESSING, I. 1982. The pUC plasmids, an M13 mp7-derived insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. *Genetics* 99:259-268.
38. YIDANA, J.A.; KENNEDY, A.J.; WITHERS, L. 1987. Variation in peroxidase isozymes of cocoa (*Theobroma cacao* L.). In *International Cocoa Research Conference 10*. (Santo Domingo, R.D.). Proceedings

# Rescate *in vitro* de Embriones Provenientes de Semillas Aplanadas de Cacao (*Theobroma cacao*)<sup>1</sup>

T. Palma,<sup>\*</sup> V.M. Villalobos<sup>\*\*</sup>

## ABSTRACT

The aim of this study was to develop a methodology for obtaining embryos from flat-shaped cacao seeds considered as haploids. The hybrids EET 62 x SCA 6 and Pound 7 x UF 613 were used. The behavior of the differentiated embryos allowed determination of an appropriate method for this purpose. Hybrid embryos were cultivated in a Murashige-Skoog medium supplemented with Thiamine-HCl 1 mg l<sup>-1</sup>, piridoxine-HCl mg<sup>-1</sup>, nicotinic acid 1 mg l<sup>-1</sup>, glycine 4 mg l<sup>-1</sup>, inositol 200 mg l, glutamin 200 mg l, casein hidrolizate 200 mg l<sup>-1</sup>, sucrose 4000 mg l<sup>-1</sup>, and gel rite 1500 mg l<sup>-1</sup>. The embryos were maintained at 27 ± 2°C with a 16 h photoperiod. The percentage of plantlets that developed varied from 16% to 87%, and plants obtained through this technique totalled 411. Of the developed plantlets, 2% were haploids. Ploidy levels were obtained through chromosome analysis. The growth medium used for embryo rescue was a factor in the morphogenetic capacity of the sexual embryos used in this study.

## INTRODUCCION

Los programas de mejoramiento genético de cacao se basan en la producción de híbridos entre los grupos criollo, forastero y trinitario (8). Los híbridos son altamente heterocigotos debido al origen de sus progenitores. Esta heterogeneidad aunada a la incompatibilidad y a un ciclo de reproducción largo, han justificado la búsqueda de plantas homocigotas autocompatibles y vigorosas (6). La identificación y estudio de plantas haploides de cacao y la subsiguiente duplicación de su genoma representa la mejor alternativa para la obtención rápida de líneas o genotipos isogénicos, permitiendo acortar el ciclo de selección y obtención de individuos homocigotos.

El interés por los haploides espontáneos en cacao, se inició con Duvlin (4) quien publicó la existencia y las posibilidades de uso de estas plantas con fines de

## COMPENDIO

El presente estudio tuvo como objetivo definir la metodología para rescatar embriones provenientes de semillas aplanadas de cacao consideradas como haploides. Para esta investigación se utilizaron los híbridos EET 62 x SCA 6 y POUND-7 x UF-613. El comportamiento de los embriones diferenciados permitió determinar un medio apropiado para el rescate *in vitro* de embriones provenientes de semillas aplanadas. El medio consistió de las sales MS suplementado en mg/l con: tiamina-HCl 1, piridoxina - HCl 1, ácido nicotínico 1, glicina 4, inositol 200, glutamina 200, caseína hidrolizada 200, sacarosa 4 000 y gel rite 1 500. Los embriones fueron incubados a una temperatura de 27 ± 3°C y un fotoperíodo de 16 horas. El porcentaje de plántulas desarrolladas fue muy variable fluctuando de 16 a 87% y el total de plantas obtenidas por esta técnica fue de 411. Los embriones y plántulas desarrolladas mostraron evidencias morfológicas características de plantas haploides existentes en cacao. Posteriormente se verificó el nivel de ploidía en las plantas obtenidas mediante el conteo de cromosomas en hojas jóvenes. El resultado mostró un 2% de plantas haploides. El medio de cultivo empleado para el rescate de embriones influyó en diferentes respuestas morfológicas, observándose organogénesis y embriogénesis somática en los embriones sexuales cultivados, provenientes de los híbridos estudiados.

mejoramiento. Duvlin (5) trató de establecer una relación entre el porcentaje de haploidía y el carácter aplanado de semillas de cacao, carácter de baja frecuencia entre las semillas normales. Lanaud (8) realizó un análisis enzimático permitiendo demostrar que la mayoría de los haploides de cacao tienen por origen la autofecundación del progenitor hembra. No existen antecedentes sobre la obtención de plantas haploides de cacao aún cuando Adu-Ampomah *et al.* (1) cultivaron anteras para este fin. Más aún la regeneración de plantas de cacao ha sido muy limitada. La presente investigación pretendió estudiar las mejores condiciones *in vitro* que permitieran el rescate eficiente de embriones haploides y el crecimiento *in vitro* de estas plántulas hasta llevarlas a condiciones de suelo

## MATERIALES Y METODOS

El trabajo se realizó en la Unidad de Biotecnología del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza, CATIE, Turrialba, Costa Rica.

<sup>1</sup> Recibido para publicación el 6 de febrero 1990

\* Instituto Tecnológico de Cartago

\*\* Programa Mejoramiento de Cultivos Tropicales. CATIE, Turrialba

### Medios de cultivo para el rescate de embriones

Se estudió la respuesta en el crecimiento de los ejes embrionales de los híbridos 'EET 62 x SCA-6' y 'POUND-7 x UF-613', utilizando el medio básico de Murashige y Skoog (MS, 1962). Los medios se solidificaron con el gel rite. Se estudiaron siete tratamientos, cinco de los cuales estuvieron constituidos con diferentes concentraciones de caseína hidrolizada y en todos los casos con 200 mg l<sup>-1</sup> de glutamina (Cuadro 1). En un segundo experimento se analizaron cuatro tratamientos de glutamina (en mg l<sup>-1</sup>): 0, 200, 400 y 600 y se mantuvo una concentración constante de 200 mg l<sup>-1</sup> de caseína hidrolizada. En forma adicional se probaron tres variantes al medio de cultivo: 1) Sales completas MS; 2) Sales completas MS más agua de coco al 10% y 3) Sales completas MS más 200 mg l<sup>-1</sup> de glutamina y 1 000 mg l<sup>-1</sup> de caseína hidrolizada.

Previa remoción de la sarcotesta, las semillas se sumergieron en blanqueador comercial al 2.5% de hipoclorito de sodio. A esta solución se le adicionó una o dos gotas de Tween-20 y se agitó durante 15 minutos, luego en una cámara de flujo laminar, las semillas se lavaron tres veces con agua destilada estéril. Posteriormente se aislaron los ejes embrionarios de los cotiledones y se sembraron en los diferentes medios. Los embriones se colocaron en una cámara de crecimiento con un fotoperiodo de 16 horas, una temperatura de 27 ± 2°C durante el día y 23 ± 2°C por la noche. La intensidad lumínica se ajustó a 2 000 lux.

Cuadro 1. Composición de los medios de cultivo utilizados para el primer experimento de rescate de ejes embrionarios en cacao con diferentes concentraciones de caseína hidrolizada.

Medio de cultivo	Caseína hidrolizada mg L <sup>-1</sup> **
1. MS	0
2. MS*	0 + 200 mg/l de glutamina
3. MS	200 + 200 mg/l de glutamina
4. MS	400 + 200 mg/l de glutamina
5. MS	600 + 200 mg/l de glutamina
6. MS + 1 000 mg l <sup>-1</sup> inositol	1 000 + 200 mg/l de glutamina
7. MS + agua de coco al 10%	0

\* Los tratamientos 2, 3, 4 y 5 contenían (en mg l<sup>-1</sup>): 1 de tiamina HCl; 1 de piridoxina; 1 de ácido nicotínico; 4 de glicina y 200 de inositol.

\*\* Todos los medios fueron suplementados con 200 mg/l de glutamina.

El medio que fue seleccionado para el rescate de embriones de semillas aplanas fue el tratamiento 3 (Cuadro 1). Se emplearon 15 ml de medio de cultivo en tubos de ensayo de 15 cm y 2.5 cm y se mantuvieron en las condiciones descritas anteriormente.

Cuando las plántulas desarrollaron el segundo par de hojas, generalmente después de alcanzar una longitud de 3 a 4 cm de lámina foliar, se transfirieron a un medio MS diluido al 50% donde se mantuvieron durante 15 días. Luego se trasladaron al invernadero bajo riego con nebulizaciones a intervalos de 12 segundos por hora.

Para el conteo de cromosomas se estudiaron ápices del vástago de dos meses de edad, empleando el método de aplastado y usando acetocarmín como colorante, se hicieron análisis citogenéticos de todos los individuos regenerados y al contar los cromosomas en las células de las hojas jóvenes.

Para determinar el medio de cultivo que permitiera el rescate y desarrollo de los embriones provenientes de semillas planas, se utilizó un diseño completamente aleatorio con cuatro repeticiones y 10 embriones por unidad experimental. Las variables medidas en cada embrión fueron las siguientes: porcentaje de sobrevivencia, número de hojas, longitud de la lámina foliar más pecíolo (mm), longitud del epicotilo (mm), longitud del eje hipocotilo-radicular (mm) y número de raíces laterales. Estas variables se cuantificaron cada siete días durante los 35 días que permanecieron en cultivo.

### RESULTADOS

Los ejes embrionarios desprovistos de los cotiledones mostraron el mayor crecimiento en un medio MS enriquecido con caseína hidrolizada y glutamina. En los Cuadros 2 y 3 se señalan los parámetros evaluados y la respuesta a los diferentes medios del cultivo. Los resultados obtenidos en los embriones cultivados provenientes de semillas aplanas de cacao indican que el porcentaje de plántulas desarrolladas fue variable y los valores fluctuaron de 16 a 87%.

Las plántulas haploides se identificaron por características morfológicas y mediante el conteo de cromosomas en hojas jóvenes. Esto permitió identificar nueve plantas haploides equivalente al 2% (Fig. 1B).

Fue evidente la organogénesis y embriogénesis somática en los dos híbridos estudiados en esta investigación. El paso de las plantas al invernadero se realizó a los seis meses posteriores a su germinación, dos meses después se determinó un 7% de pérdidas de

estas plantas por problemas de adaptación a las condiciones de invernadero. El total de plantas transferidas a condiciones de invernadero fue de 411 provenientes, todas ellas, de ejes embrionarios rescatados por la técnica *in vitro* (Fig. 1A).

#### Morfología de los individuos rescatados *in vitro*

Las 411 plantas obtenidas a partir de ejes embrionarios rescatados *in vitro*, fueron analizadas morfológicamente, las características más sobresalientes se destacan a continuación:

Los epicotilos fueron en general desde conspicuos y bien formados hasta ausentes en algunos casos, otros fueron anómalos, curvados, cortos y gruesos, con ramificación simpodial y brinsal y dorsiventrales. El hipocotilo fue normal, aunque algunos presentaron formas anómalas, comprimidos, dorsiventrales, rudimentarios y engrosados. Las radículas evidencia-

ron una variada morfología destacando las delgadas y elongadas, inconspicuas, vestigiales atrofiadas y no visibles; los cotiledones aún cuando estuvieron presentes en la mayoría de los casos, éstos fueron anómalos, peciolados, con foliolos mostrando cinco nervaduras mayores longitudinales, estriadas o acródromas, algunos fueron carnosos, los nudos cotiledonares sin desarrollo. Los protofilos mostraron formas escuamiformes, basales irregulares, asimétricos y aserrados. Las hojas superiores con lámina de borde sinrado lobado, normalizándose después del tercer nudo en dirección acrópeta. Algunas semillas mostraron dos embriones fusionados ontogénicamente en el cuello de la raíz. Otros fueron mal formados, espatulados y amorfos. La mayoría de estas características fueron cambiando en la medida que las plantas crecían en el invernadero, hasta mostrar, en términos generales tallos y hojas relativamente normales, aún cuando fueron pequeños

#### DISCUSION

En el presente estudio fue evidente que los embriones provenientes de semillas aplanadas de cacao presentan deformaciones principalmente en los cotiledones, limitando su germinación en condiciones de invernadero. El medio básico (MS) modificado y enriquecido con glutamina ( $200 \text{ mg l}^{-1}$ ) y caseína hidrolizada ( $200 \text{ mg l}^{-1}$ ) permitió el desarrollo de estos embriones y permitió la obtención de individuos que en condiciones normales difícilmente lograrían desarrollar hasta plantas completas (Figs. 1A y B).

La mayor respuesta de los ejes embrionales se logró en el medio MS enriquecido con glutamina y caseína hidrolizada (tratamiento 3). En apariencia, se presentó un efecto sinérgico entre estos componentes, ya que cuando se adicionaron en forma separada al medio, la respuesta de los ejes embrionarios fue inferior. La glutamina, por ser una fuente de nitrógeno reducido, parece que funciona como agente de transporte y almacenamiento del nitrógeno (10). Estudios comparativos realizados sobre la utilización de glutamina y aspargina en embriones en forma de torpedo, de 12 especies de plantas, demostró sin excepción el gran efecto promotor que ejerce la glutamina que mostró ser superior en respuesta que la aspargina. La caseína hidrolizada, utilizada para proporcionar al medio una mezcla natural de aminoácidos, para la nutrición nitrogenada tiene además un aparente efecto promotor debido a su alta presión osmótica (13).

El desarrollo de embriones provenientes de semillas planas de cacao, permitió caracterizar diferentes tipos morfológicos que eventualmente podrían correlacionarse con los tipos de haploides existentes en



Fig. 1. Plantas de cacao obtenidas a partir de embriones rescatados de semillas aplanadas A. Muestra de las 411 plantas obtenidas de ejes embrionarios germinados *in vitro* y transferidos a suelo seis meses después de la germinación. B. Características morfológicas de una planta haploide (izquierda), comportamiento con una planta diploide normal (derecha)

Cuadro 2. Promedio de las variables: porcentaje de sobrevivencia, longitud del epicotilo, número y longitud de hojas y número de raíces en ejes embrionarios de cacao del híbrido EEI-62 X SCA-6 cultivados *in vitro* durante 35 días, en 7 medios de cultivo.

Medio de cultivo Glutamina (mg)	Porcentaje de sobrevivencia	D	Longitud hipoc-raíz (cm) <sup>1</sup>	D	Longitud epicotilo (cm)	D	Número de hoja	D	Longitud hoja (cm) <sup>2</sup>	D	Número raíces laterales	D
1 MS	85.0	a	3.9	c	0.2	b	0.5	c	0.6	c	4.4	ab
2 Sales MS <sup>3</sup>	75.0	a	4.8	ab	1.3	a	2.6	ab	2.3	b	7.2	ab
3 MS + 200	77.5	a	5.1	a	1.6	a	3.2	a	2.8	a	9.7	a
4 MS + 400	77.5	a	5.0	a	1.3	a	2.2	b	1.9	b	7.8	ab
5 MS + 600	67.5	a	5.0	a	1.5	a	2.5	ab	2.1	b	8.2	ab
6 MX <sup>4</sup>	77.5	a	5.0	a	0.2	b	0.8	c	0.5	c	6.7	ab
7 MS + AC	77.5	a	4.0	b	0.3	b	0.8	c	0.6	c	4.1	b

1. Prueba Duncan en donde los valores con la misma letra no difieren estadísticamente entre si ( $P = 0.05$ ).

2. Longitud del pecíolo más la lámina foliar

3. Las vitaminas, inositol y sacarosa modificados

4. Se adicionó  $1\text{,}000\text{ mg l}^{-1}$  de inositol.

cacao, mediante el conteo cromosómico o el uso de técnicas electroforéticas. Estas respuestas morfológicas posiblemente estaban predeterminadas genéticamente en los ejes embrionarios. Se considera que las condiciones *in vitro* definidas por este estudio no influyeron determinantemente en la expresión morfológica ni genética de los individuos regenerados. Importante es resaltar el hecho de que los medios de cultivo no incluyeron reguladores del crecimiento, evitando así posibles alteraciones genéticas y epigenéticas, principalmente las auxinas.

Lanaud (8) efectuó el rescate de embriones provenientes de semillas aplanadas de cacao en un medio con macroelementos MS diluido en un 50%, microelementos de Heller, Fe EDTA, vitaminas Morel, glu-

cosa al 2% y BA ( $10^{-7}\text{ mg l}^{-1}$ ); sin embargo el porcentaje de plántulas que sobrevivieron más de tres meses después de transferido al invernadero (67%) fue menor al obtenido en el presente estudio (93%).

Los resultados aquí presentados muestran una gran habilidad morfogénica de los embriones inmaduros del cacao. Al respecto, Valverde y Villalobos (15) estudiando pH, luz y concentraciones de sacarosa, demostraron esta habilidad durante la embriogénesis somática del cacao.

El empleo del medio MS modificado y Enriquecido con glutamina y caseína hidrolizada permitió la organogénesis en los híbridos estudiados. Esta regeneración de plantas se obtuvo en un medio carente de re-

Cuadro 3. Promedio de las variables: porcentaje de sobrevivencia, longitud hipocotilo-radicular, longitud del epicotilo, longitud y número de hojas y número de raíces en ejes embrionarios de cacao del híbrido POUND-7 X UF 613 cultivados *in vitro* durante 35 días, en 7 medios de cultivo.

Medio de cultivo Caseína (mg)	Porcentaje de sobrevivencia	D	Longitud hipoc-raíz (cm) <sup>1</sup>	D	Longitud epicotilo (cm)	D	Número de hojas	D	Longitud hojas (cm) <sup>2</sup>	D	Número raíces	D
1. MS	72.5	ab	5.2	c	0.6	c	1.3	d	0.6	c	6.6	ab
2. Sales MS <sup>3</sup>	60.0	bc	5.6	bc	1.1	bc	2.8	c	2.3	b	11.5	a
3. MS + 200	60.0	bc	6.5	ab	1.2	bca	3.0	c	2.5	ab	8.3	ab
4. MS + 400	52.5	c	7.2	a	2.2	a	4.2	ab	3.1	a	5.6	b
5. MS + 600	55.0	c	6.5	ab	1.0	bc	3.3	bc	2.6	ab	6.0	ab
6. MS <sup>4</sup>	80.0	a	6.0	bc	0.7	bc	2.8	c	0.7	c	4.1	b
7. MS + AC	82.5	a	5.9	bc	1.7	ab	4.5	a	1.3	c	7.6	ab

1. Prueba Duncan en donde los valores promedios con la misma letra no difieren estadísticamente entre si. ( $P = 0.05$ )

2. Longitud del pecíolo más la lámina foliar.

3. Las vitaminas, inositol y sacarosa modificados

4. Se adicionó  $1\text{,}000\text{ mg l}^{-1}$  de inositol.

guladores de crecimiento, a diferencia de Lanaud (8) quien reportó la regeneración de embriones somáticos a partir de hipocotilo y cotiledones de semillas planas de cacao, en un medio MS modificado y suplementado con BA ( $10^{-7}$  mg l<sup>-1</sup>).

Aún cuando los genotipos estudiados fueron diferentes, posiblemente la presencia de la BA influyó en la sobrevivencia de los embriones.

El presente estudio complementa y extiende los resultados obtenidos por Duvlin (5) y Lanaud (8) ya

que ha sido posible definir un medio de cultivo sin reguladores del crecimiento y ha permitido el rescate de embriones de semillas aplanadas las cuales en condiciones normales difícilmente podrían lograr la formación de plantas completas. La relevancia de este estudio radica en dos aspectos fundamentales, el primero está relacionado con el aumento de la base genética del género *Theobroma*, por lo antes referido, y segundo por permitir el rescate de plantas haploides, las cuales aún cuando se encontraron en baja frecuencia (2%) serán de gran utilidad para subsecuentes estudios de cultivo de tejidos y genética molecular.

#### LITERATURA CITADA

1. ADU-AMPOMAH, F.; NOVAK, J.F.; VAN DURREN, A. 1987 Embrioid and plant production from cultural cocoa explants. In International Cocoa Research Conference (1987, Santo Domingo, R.D.) Proceedings, p 129-136
2. ADU-AMPOMAH, F. 1987 Determination of methodology to obtain shoot tip culture of cocoa. In International Cocoa Research Conference (1987, Santo Domingo, R.D.) Proceedings p 136-142
3. ARCHIBALD, J.F. 1954 Culture *in vitro* of cambial tissue of cocoa. Nature 173:351-352.
4. DUVLIN, P. 1972 Polyembryonic et haploidie chez *Theobroma cacao* L. Café, Cacao, Thé 16:231-295.
5. DUVLIN, P. 1973. Les "fèves plates" une nouvelle source d'haploidie chez le cacaoyer (*Theobroma cacao* L.). Café, Cacao, Thé 17:25-36.
6. DUVLIN, P. 1984. Cacao. In Handbook of Plant Cell Culture: Crop Science. Ed. by P.V. Ammirato; D.A. Tuans, W.R. Sharp, Y. Yamada. v 3, p. 541-563.
7. HALL, T.R.H.; COLLINS, H.A. 1975. Initiation and growth of tissue cultures of *Theobroma cacao* L. Annals of Botany 39:555-570.
8. LANAUD, D.L. 1987. Nouvelles données sur la biologie du cacaoyer (*Theobroma cacao* L.) Thèse Docteur d'Etat Paris, France Université de Paris Sud p irr
9. LANAUD, D.L. 1987 Origine génétique des plantes à phénotype maternel issues de croisement intra ou interspécifiques de fèves plates ou de graines polyembryonées. Chez *Theobroma cacao* L. Café, Cacao, Thé 31:3-14.
10. MULLER, L.; KRIKORIAN, A.D. 1985. Glosario de los términos más frecuentemente empleados en el cultivo de tejidos vegetales. Turrialba, C.R., CATIE. s.p.
11. ORCHARD, J.E.; COLLINS, N.A.; HARDWICK, K. 1979. Culture of shoot apices of *Theobroma cacao* L. Physiologia Plantarum (Denmark) 42:207-210.
12. PASSEY, A.J.; JONES, O.P. 1983. Shoot proliferation and rooting *in vitro* of *Theobroma cacao* L. Type amelonado. Hortscience 58:589-592
13. RAGAAVAN, V.; SRIVASTAVA. 1982. Embryos culture. In Experimental embryology of vascular plants. Ed. by B.M. Johri New York, Springer Verlag. p 195-320
14. THOMPSON, W.; COLLINGS, G.B.; ISSAC, H.S.; HARDWICK, K. 1987 Isolation of protoplast from *Theobroma cacao* L. In International Cocoa Research Conference (1987, Santo Domingo, R.D.) Proceedings p 623-626
15. VALVERDE, L.; VILLALOBOS, V. 1990. Effect of pH, light and sucrose concentrations for *in vitro* somatic embryogenesis of cocoa (*Theobroma cacao* L.). Turrialba, C.R. (in press)
16. WANG, Y.G.; YANICK, J. 1984 Inducing precocious germination in asexual embryos of cocoa. Hortscience 19(6):839-841.

# Relación entre la Posición de la Semilla en Frutos de Cacao (*Theobroma cacao*), su Longitud y el Diámetro y Altura de las Plántulas<sup>1</sup>

W. Phillips-Mora\*

## ABSTRACT

A study was conducted at La Lola, Limón Province, Costa Rica to determine whether seed position in cocoa fruits affects seed length, seedling height and stem diameter. Seeds were extracted from the central and apical areas of fruits from 'SPA-9', 'IMC-67', 'EET-400' and 'UF-613' cultivars. Seed length was determined and flat seeds were counted and discarded. Of the remaining seeds, 20 were sown per cultivar. Height of seedlings was determined at 23, 36, 57, 93 and 120 days, and stem diameter at 1, 2, and 3 months. It was found that seeds originating from the fruit apex were shorter, and that flat seeds were few and only found in the apical areas of some fruits of the 'EET-400' and 'SPA-9' cultivars. Given that the position of the seed within the fruit had no specific effect on stem diameter and seedling height, if poorly developed seeds are discarded all the remaining ones can be sown.

## COMPENDIO

En La Lola, Limón, Costa Rica (40 msnm 26.5°C y 3670 mm), se determinó el efecto de la posición de la semilla en frutos de cacao, sobre la longitud de la semilla y sobre el diámetro y altura de las plántulas. De mazorcas de los cultivares 'SPA-9', 'IMC-67', 'EET-400' y 'UF-613', se extrajo las semillas de la parte central y de los extremos. Se les midió su longitud y se contó y eliminó las semillas aplandadas. De las restantes se sembraron 20 semillas por cultivar. Se midió la altura de las plántulas a los 23, 36, 57, 93 y 120 días y el diámetro a los 1, 2 y 3 meses. Se encontró que las semillas del extremo distal eran más cortas y que las semillas aplandadas se presentaban en muy pequeña proporción, únicamente en los extremos de algunos frutos del 'EET-400' y 'SPA-9'. Dado que, la posición en el fruto de la cual procedía la semilla no tuvo efecto significativo sobre el diámetro y altura de las plántulas, si se eliminan las semillas mal desarrolladas todas las restantes pueden ser utilizadas para la siembra.

## INTRODUCCION

**A**lgunos agricultores opinan que la posición de las semillas en las mazorcas de cacao tienen influencia en el vigor de las plántulas (2). Se ha indicado que las mejores semillas para la siembra son las de la parte media de los frutos y que las localizadas en los extremos deben desecharse (7, 10). Estas apreciaciones se deben probablemente a que en los extremos de los frutos de cacao las semillas son más pequeñas, ligeramente deformes (6) y más livianas (9). Dublin (4) menciona además, que en los extremos hay una mayor presencia de semillas aplandadas o vanas (4).

Las diferencias en el tamaño de las semillas debidas a su posición en el fruto es un factor importante a considerar, pues el tamaño de la semilla se ha relacionado con el vigor de las plántulas, poniendo en desventaja a las provenientes de semilla pequeña (5).

Phillips y Enriquez (11) evaluaron tres tamaños de semilla (pequeña = 1.5-2.2 cm; mediana = 2.3-2.8 cm; y grande = 2.9-3.5 cm) y encontraron un marcado

efecto de su longitud sobre el diámetro y la altura de las plántulas. Estos parámetros son comúnmente utilizados debido a que se ha informado que tienen una alta correlación con la producción de los árboles adultos (1, 8).

Hardy (9), aún cuando encontró que las semillas de los extremos del fruto tienen menor peso, recomendó utilizar todas las semillas de la mazorca en tanto se eliminen las mal desarrolladas. Cardoso (3) llegó a la misma conclusión, debido a que no obtuvo ningún efecto de la posición de la semilla sobre su germinación ni sobre la altura de las plántulas a los tres meses de edad.

Dado los criterios controvertidos con respecto al uso de la semilla de los extremos de los frutos de cacao, se hace necesario dilucidar mejor este aspecto, lo que contribuiría a mejorar la selección de las semillas que serán entregadas a los agricultores.

El objetivo de esta investigación fue determinar el efecto de la posición de la semilla en frutos de cuatro cultivares de cacao, sobre la longitud de las semillas y sobre el diámetro y altura de las plántulas.

1 Recibido para publicación el 2 de abril 1990

\* Programa de Mejoramiento de Cultivos Tropicales Apt 7170 CAIIE, Turrialba, Costa Rica

## MATERIALES Y METODOS

El ensayo se realizó en la Finca Experimental La Lola, Limón, Costa Rica (40 msnm 26.5°C y 3670 mm). De nueve mazorcas de polinización abierta de cada uno de los siguientes cv: 'SPA-9', 'IMC-67', 'EET-400' y 'UF-613', se extrajo las semillas de la parte central y de los extremos (aproximadamente seis semillas por extremo). Se contó y eliminó las semillas aplanas, y de las restantes se seleccionó al azar 20 semillas de cada posición y cultivar, a las que se les midió su longitud. Estas fueron sembradas en bolsas de polietileno y atendidas de acuerdo con los procedimientos normales de vivero, que mensualmente incluía, una fertilización (5 g/planta de 18-10-6-5) y una aplicación de fungicida e insecticida (10 g de Kocide + 5 ml de Malathion en 3 785 l)

Se midió la altura de las plántulas a los 23, 36, 57, 93, 106, y 120 días, y el diámetro a los 2, 3 y 4 meses. A cada variable se le aplicó el Análisis de Variancia y la Prueba de Duncan.

## RESULTADOS Y DISCUSION

Se encontró que las semillas de la parte proximal y media de los frutos tuvieron una longitud similar, pero disirieron de las provenientes del extremo distal, las cuales fueron más cortas (Cuadro 1). Esto confirma en parte lo observado por Figueiredo (6), quien indica, que las semillas de los extremos son más pequeñas. Estas diferencias en tamaño pueden deberse

a características intrínsecas del fruto o bien, a que la extrechez usual del extremo distal de la mazorca, afecta físicamente el desarrollo de las semillas ubicadas en esa posición.

Los cultivares mostraron un amplio rango en la longitud de las semillas, siendo las más largas las del 'UF-613' con 3.01 cm y las más cortas las del 'IMC-67' con 2.54 cm (Cuadro 1).

Las semillas aplanas se presentaron solamente y en una proporción aproximada al 10%, en los extremos distal y proximal de algunos de los frutos del 'EET-400' y del 'SPA-9', pero no fueron observadas en la parte central de ningún fruto, ni tampoco en los cultivares 'UF-613' e 'IMC-67' (Cuadro 1). La presencia de semillas aplanas únicamente en los extremos del fruto, coincide con lo indicado por Dublin (4), sin embargo, en la presente investigación se presentó igual cantidad de semillas aplanas en ambos extremos del fruto y no con mayor frecuencia en el extremo distal como afirma este autor.

La posición en el fruto de la cual procedía la semilla, no tuvo efecto significativo sobre el diámetro y altura de las plántulas de cacao (Cuadros 2 y 3). Unicamente en la primera medición de altura a los 23 días, las semillas de la parte central superaron a la de las otras posiciones, pero en las siguientes lecturas se compensó el crecimiento de las plántulas (Cuadro 2). Para el diámetro, no se obtuvo efecto significativo en ninguna de las lecturas (Cuadro 3).

La menor longitud obtenida en las semillas del extremo distal, no afectó el desarrollo de las plántulas, a causa de que este parámetro varió poco con respecto a las otras posiciones. El marcado efecto del tamaño de la semilla sobre el desarrollo de las plántulas encontrado por Phillips y Enríquez (11), se debió a la utilización de semillas que diferían mucho en su longitud.

El promedio de las seis mediciones de altura por cultivar, no arrojó diferencias notables respecto a la posición de la semilla (Fig. 1). El promedio de todos los cultivares mostró un efecto compensatorio entre las tres posiciones de semilla (Fig. 1). Igual efecto fue observado para el diámetro de las plántulas (Fig. 2).

Para los cultivares no se encontró una relación directa entre el tamaño de la semilla y la altura de las plantas. Por ejemplo, el cultivar con semilla más grande ('UF-613') tuvo la menor altura promedio al momento del transplante (cuatro meses), en tanto que, el cultivar con semilla más pequeña ('IMC-67'), mostró una de las mayores alturas (Cuadro 2). Para

Cuadro 1. Longitud promedio de semillas y cantidad de semillas aplanas en tres posiciones de la mazorca y en cuatro cultivares de cacao. La Lola, 1986.

	Long. de semilla (cm)	Semillas aplanas
<b>Posiciones</b>		
Proximal	2.85 a <sup>1</sup> -2	6 <sup>3</sup>
Media	2.86 a	0
Distal	2.68 b	6
<b>Cultivares</b>		
UF-613	3.01 a <sup>4</sup>	0
EET-400	2.79 b	6
SPA-9	2.75 b	6
IMC-67	2.54 c	0

1 Promedio de 80 semillas

2 Valores en cada columna con la misma letra, no tienen diferencias significativas (Duncan P = 0.05)

3 Corresponde a la observación de las semillas de nueve frutos/cultivar.

4 Promedio de 60 semillas

Cuadro 2. Altura de plántulas de cacao provenientes de semillas de tres posiciones en la mazorca y de cuatro cultivares. La Lola, 1986.

	Días de edad de la planta					
	23	36	57	93	106	120
	Altura (cm)					
<b>Posiciones</b>						
Media	12.3 a <sup>1-2</sup>	21.1 a	22.6 a	27.3 a	31.0 a	36.0 a
Proximal	10.8 b	20.9 a	22.2 a	26.8 a	31.9 a	35.4 a
Distal	10.7 b	20.6 a	22.1 a	26.7 a	31.3 a	36.3 a
<b>Cultivares</b>						
SPA-9	10.7 ab <sup>3</sup>	22.2 a	23.7 a	28.3 a	32.7 a	37.7 a
EET-400	11.0 a	21.3 b	22.6 b	26.9 ab	30.8 ab	35.0 bc
IMC-67	9.9 b	20.4 c	21.6 c	26.7 b	32.6 a	36.6 ab
UF-613	6.7 c	19.8 c	21.2 c	25.8 b	29.5 b	34.2 c

1 Promedio de 80 plantas

2 Valores en cada columna seguidos por la misma letra, no tienen diferencias significativas (Duncan P = 0.05).

3 Promedio de 60 plantas.

el diámetro el 'UF-613' superó a los otros cultivos, los cuales tuvieron un diámetro similar entre sí (Cuadro 3)

zorcias las semillas son más pequeñas Una vez eliminadas las semillas mal desarrolladas, todas las restantes podrían ser utilizadas para la siembra.

### CONCLUSIONES

La posición de la semilla en los frutos de cacao no influye sobre el diámetro y altura de las plántulas resultantes, aún cuando en el extremo distal de las ma-

Cuadro 3. Diámetro de plántulas de cacao provenientes de semillas de tres posiciones en la mazorca y de cuatro cultivares. La Lola, 1986.

	Meses de edad de la planta		
	1	2	3
	Diámetro (mm)		
<b>Posiciones</b>			
Media	4.1 a <sup>1-2</sup>	5.0 a	5.7 a
Proximal	3.9 a	4.9 a	5.6 a
Distal	3.9 a	4.8 a	5.6 a
<b>Cultivares</b>			
UF-613	4.2 a <sup>3</sup>	5.3 a	6.0 a
SPA-9	4.1 a	4.9 b	5.6 b
EET-400	3.7 a	4.9 b	5.4 b
IMC-67	3.8 a	4.6 c	5.4 b

1 Promedio de 80 plantas

2 Valores en cada columna seguidos por la misma letra, no tienen diferencias significativas (Duncan P = 0.05).

3 Promedio de 60 plantas

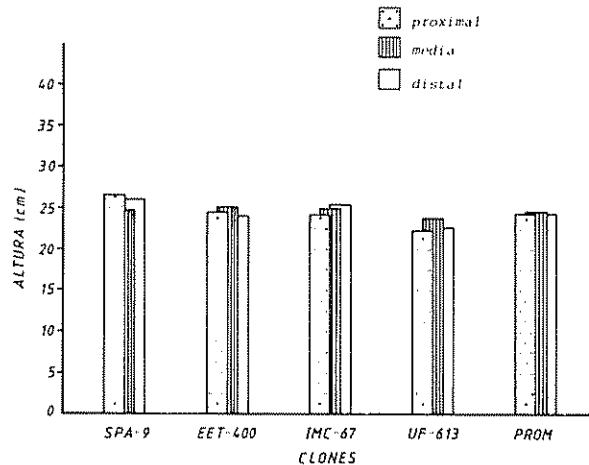


Fig. 1 Altura promedio de plántulas de cacao provenientes de semillas de cuatro cultivares y tres posiciones en la mazorca (promedio de seis lecturas) La Lola, 1986

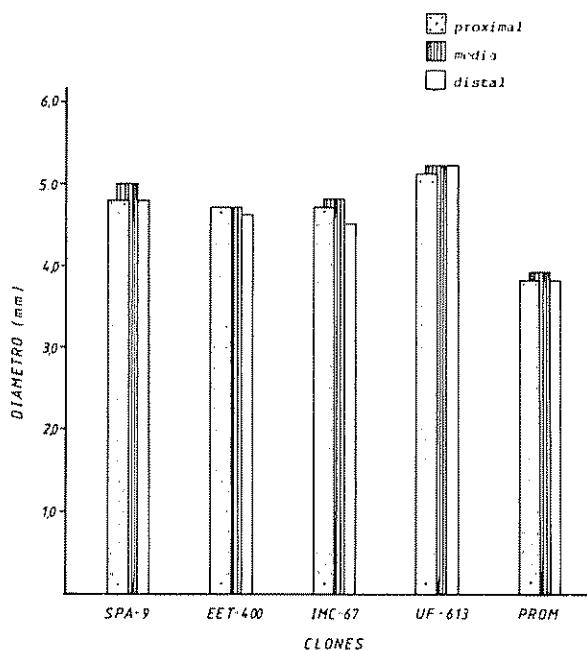


Fig. 2. Diámetro promedio de plántulas de cacao provenientes de semillas de cuatro cultivares y posiciones en la mazorca (promedio de tres lecturas). La Lola, 1986.

#### LITERATURA CITADA

1. ASCENSO, J.C. 1960. The inheritance of and relationships among growth characters of young cacao seedlings. Thesis (Missao de Estudos Agronómicos do Ultramar). West Indies, Tri., Imperial College of Tropical Agriculture 72 p
2. BARROS, O. 1977. Semillas de cacao para la siembra Cacaotero Colombiano (ed.) 2:12-16.
3. CARDOSO, M. 1963. Influencia da posição das sementes no fruto do cacau sobre a germinação e desenvolvimento das mudas. Bragantia (Bra.) 22(36): 461-464.
4. DUBLIN, P. 1973. Les "feves plates" une nouvelle source d'haplóidie chez le cacaoyer (*Theobroma cacao*). Café, Cacao, Thé (Francia) 17(1):25-36.
5. ENRIQUEZ, G.; SORIA, J. 1979. Selección temprana por vigor de plántulas de cacao híbrido. Turrialba, Costa Rica, CATIE. 13 p
6. FIGUEIREDO, S.F.L. 1986. Conservação da viabilidade da semente de cacau. II Tipificação do fruto e descrição da semente e da germinação. Revista Theobroma (Bra.) 16(2):75-88.
7. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. 1980. El Cacao. Roma, Italia. 33 p.
8. GLENDINNING, D.R. 1960. Relationship of growth to yield. Euphytica (Holanda) 9(3):351-355.
9. MANUAL DE CACAO. 1961. Ed por F. Hardy. Turrialba, Costa Rica, IICA. p. 137-146.
10. MORALES, M.O. 1949. Construcción y aprovechamiento de los semilleros de cacao. Agricultura Tropical (Col) 5(8):17-18.
11. PHILLIPS, M.W.; ENRIQUEZ, G. 1988. Efecto del tamaño de semilla y la fertilización convencional sobre el diámetro y altura de plántulas de cacao (*Theobroma cacao*). In Reunión del PCCMCA [34, San José, C.R.]

# World Cocoa Marketing Systems, Problems and Priorities: An Importer's Perspective<sup>1</sup>

J.J. Scheu\*

## ABSTRACT

The current attitude towards cocoa and the cocoa market in the majority of exporting countries is archaic and must be modified through the introduction of more customer-oriented marketing policies, if revenues derived from cocoa exports are to be enhanced and farm income is to be improved. The price history for cocoa is discussed and the fundamental forces in price formation are identified. Various options in marketing cocoa and primary cocoa products are suggested. More attention must be paid to immediate post-harvest processing and quality control, farm and storage sanitation, individual contract performance and greater reliability of transportation. The need to diversify production and make it more price-responsive, as well as improving accessibility of overseas markets, is explained. Methods for training marketing personnel are suggested, and the long-term prospects of cocoa production and consumption are explored.

## Purpose of the paper

After a period of chronic undersupply, the cocoa market is now undergoing a period of relatively low cocoa prices, which is generally projected to continue over the next few seasons. While it is impossible to forecast the prices for cocoa in the world market, the structure of current world production and world consumption indicates a period of ample physical stocks in terms of yearly usage. These stocks and the relatively slow response of consumption to lower price levels will effectively prevent prices from increasing substantially over the forthcoming seasons.

Moreover, international or unilateral action to push prices to higher levels is unlikely to be taken, given the lack of funds available to the International

## COMPENDIO

Si se pretende aumentar las divisas generadas con las exportaciones de cacao y mejorar los ingresos de los productores, habrá que modificar la actitud anticuada que actualmente se tiene con respecto al cacao y su mercado en la mayoría de los países exportadores del producto, introduciendo políticas de comercialización dirigidas al consumidor. En este trabajo se reseña la trayectoria del precio del cacao a través de los años y se identifican los factores principales que inciden en el establecimiento de los precios. Asimismo, se plantean algunas opciones para la comercialización del cacao y de sus derivados y se hacen varias sugerencias, entre otras, prestar más atención al procesamiento del cacao inmediatamente después de la cosecha, a las condiciones sanitarias en la finca y al almacenamiento, así como al comportamiento de contratos individuales y al mejoramiento del transporte. Se explica la necesidad de diversificar la producción, haciéndola más sensible a cambios de precio, y la de mejorar el acceso a mercados en el exterior. Se recomiendan métodos para la capacitación del personal de mercadeo y se analizan las perspectivas a largo plazo para la producción y el consumo de cacao.

Cocoa Organization, the current disarray among its members, the difficulties in finding a successor agreement, and the financial state of the major producing countries.

Thus, barring a major crop disaster, producers will have to come to grips with the need to optimize cocoa revenues under conditions of low world market prices.

This paper will examine current internal marketing systems in the major producing areas and describe some changes which might usefully be considered by these countries' producers to control further depletion of public funds and enhance both producer and fiscal benefits derived from cocoa exports, and to lessen the dependence on a single crop.

## The historic background of current exporters' marketing policies

It is generally common for cocoa exporting countries to follow a marketing policy of distribution based on the concept of a strong demand from abroad and the need to allocate tight supplies to the most responsive market, at prices and terms of sales pri-

1 Received for publication 26 March 1990

\* President, The Cocoa Merchants' Association of America, Inc., United States of America. The opinions expressed in this paper are the author's own and do not necessarily coincide with those of the Cocoa Merchants' Association of America, Inc., which has no position on such issues as beans' versus products' exports and future cocoa prices. While Mr. Scheu is a Registered Commodity Trading Advisor with the U.S. Commodity Futures Trading Commission, nothing in this paper shall be construed as an offer to buy or sell commodities.

marily oriented towards the exporting country's fiscal and shipping policy needs. This philosophy is more pronounced the higher the rank of the country takes on the list of exporters.

A short review of the commodity's price history may be helpful at this stage because it will set the background against which the marketing systems were developed, and it will also suggest what changes may be opportune.

Ironically, although cocoa has followed a pattern of more seasons with falling rather than rising prices, it is still being marketed as if it were a scarce commodity. This phenomenon has its roots in the period when cocoa was, indeed, a commodity in short supply. Although the cocoa market has often been touted as a "free market," it should not be overlooked that its history is one of ubiquitous government intervention in the producing countries internal marketing.

This intervention was originally aimed at providing a market for the commodity when normal commercial activity was suspended during World War II. In the period immediately following the war, the marketing philosophy was strongly influenced by a prevailing mood of socialism in Western Europe.

As the European economy recovered from the war and cocoa could again be shipped freely to the major consuming markets, the stocks accumulated during wartime were quickly used up, and the then current production was no longer able to cope with an expanding demand, particularly as the crops in West Africa were hit by the swollen shoot disease. The resulting shortage caused prices to reach unprecedented highs of \$1 300 per metric ton in 1954 dollars, or, assuming a 4.5 percent per annum inflation rate, of \$6 300 per metric ton at current rates. These levels provoked strong buyers' resistance, which effectively reduced world demand for cocoa.

As West African production recovered in the face of declining consumption, world cocoa supplies again became abundant, and prices dropped to levels of \$150 per metric ton in 1965 dollars, or \$700 in current values.

Low market levels encouraged consumption, and prices advanced again in 1978 to \$5 500 per metric ton in 1978 dollars, or \$9 327 in current dollars, only to drop again to the \$1 100 range which we are currently experiencing (the values are approximate spot values in U.S. dollars for typical Grade I West African cocoa beans, basis ex dock U.S.)

#### Attempts to control world market prices have failed

During the initial period of major price increases and subsequent decline after World War II, there were several unilateral attempts to control prices; when the second cycle of ups and downs occurred, the International Cocoa Agreement was in place.

Clearly, neither unilateral attempts at price control nor international intervention to prevent price fluctuations were successful. For example, the 1957 attempt by Brazil's CACEX to withhold cocoa succeeded at first in reversing a period of falling prices, but it also set the stage for the cocoa glut which developed in the early 1960s. In the process, Brazil also lost millions of dollars, ended up having to discount cocoa butter exports to the U.S.S.R., and had to destroy cocoa cake which had gone bad, causing enormous financial losses to the international trading community.

Ghana sold a major part of its crop to an international non-cocoa trading house with the understanding that the surplus would be disposed of through unconventional channels, but the deal fell apart in 1965, the cocoa reappeared on the traditional market, and this failure caused the market to drop further. In more recent history, the Ivory Coast's attempts to control important blocks of tonnage, also through the use of restrictive contracts with trade houses, had the same result.

Because of the repeated critical shortages of cocoa beans in the past and because of the complexity of the ultimate demand for cocoa in the consuming countries, cocoa processors and chocolate manufacturers tend to take a very long-term view in their procurement policies. It is not uncommon for these industries to have commitments for up to two years in the future. Clearly, a major chocolate manufacturer with an established consumer franchise must be certain of his supplies, so that he can maintain his presence on the shelf.

Except for Nigeria, which dismantled its Cocoa Marketing Board three years ago, the larger West African countries still generally follow cocoa marketing philosophies typical of the former colonial regimes. They consider the task of finding buyers as being one of allocation rather than one of business-minded merchandising.

Unfortunately, the actions taken by the Ivory Coast —reserving large quantities of its crop for exclusive marketing by one or two large trading

houses—in effect destroyed a very efficient distribution network. This network provided a multitude of outlets which were competitive with each other. It performed efficiently in finding customers for Ivory Coast cocoa, while, at the same time, it assured the buyers of reliable quality deliveries and diversified shipment and payment terms.

Ivory Coast's decision had another result which the planners did not anticipate. As the set-aside of Ivory Coast cocoa came about relatively early in the crop season, world cocoa bean processors became concerned about the continuity of their bean supplies. They therefore looked actively for a replacement, which was available in the form of Malaysian cocoa; this source was relatively unknown in the markets, and suffered from a reputation of supplying small beans with high acidity. The Ivory Coast action changed all that, and Malaysian cocoa is now much more readily accepted by the bean processing industry. In addition, many trade houses, having been effectively blocked out of the market by the Ivory Coast, thus found another lucrative field of activity.

We see, then, that in the face of often erratic marketing philosophies of the producing countries, cocoa bean processors cannot normally assure their anticipated supplies by approaching exporters directly.

On the other hand, exporters must face the uncertainties of the current and future crop, the economic measures yet to be taken by their governments in such matters as export levies, exchange rates and support for the local processing industry, and possibly uncertain shipping schedules. For example, how can one expect that an exporter in Brazil is making a long-term binding shipment commitment considering the situation in which that country finds itself today?

#### The role of international cocoa trade

The task of bridging the gap between the needs of the industry and those of the exporters falls to the international cocoa trade. It is thanks to the merchant-importers' community that exporters can sell when it is in their best interest, which most often is not at the time when the industry needs to buy.

Likewise, thanks to the international cocoa trade the industry can contract for its cocoa needs at a time and on terms which would be impossible for exporters to provide.

The function of the merchants' community is thus essential, but it can only be performed if the opportunities to transfer price risks continue to exist and con-

tractual obligations between individual sellers and buyers are respected. Therefore, the existence of a futures markets for cocoa beans has become vital for the survival of the international cocoa trading community. The futures markets allow the transfer of price risks from distributors, who are not willing to assume market risks, to outside investors, who are. Because of this risk-transfer aspect, practically all cocoa sold from origin to the industry is directly or indirectly linked to the use of futures markets.

The economic benefits of futures markets in the marketing of major commodities as a distribution cost-lowering device has been demonstrated amply elsewhere. In addition, the availability of a futures market tends to mitigate long-term price fluctuations rather than accentuating them, as is commonly believed, while in the short term, even daily, fluctuations help to attract investors' funds to the market.

Another vital requirement for the survival of a viable international cocoa trading community is the strict observance of contractual obligations entered into individually between buyers and sellers. In that respect, the introduction of standard contracts issued by the various national cocoa trade associations and the modalities set in place for the resolution of disputes have been very helpful.

Cocoa differs fundamentally from other tropical or subtropical produce. It has no competition from production in the consuming countries as is the case of synthetic rubber or oil crops. It is a complex food and flavor ingredient and not a simple beverage such as coffee and tea. Indeed, while approximately two-thirds of the bean equivalent in tonnage is being used by the world's chocolate industry, the remaining one-third, which ultimately is converted into cocoa powder, is an important flavor ingredient for food industries including baking, dairy, non-chocolate confectionery and biscuit manufacturing.

Another typical aspect of cocoa, which it shares with some of the more exotic spices, is the fact that it has historically been produced in the tropics and consumed in the temperate climatic zones (Mexico and other Central American countries, Western Samoa and Jamaica are notable exceptions). Only recently has there been a significant change in this tendency, in the form of an expansion of Brazil's internal consumption. However, we would suspect that southern Brazil, which enjoys a temperate climate, is the major contributor to this increase in domestic consumption.

The price elasticity of cocoa is inversely proportional to its flavor related use. For example, during the period of high cocoa bean prices in the late 1970s

the demand for cocoa powder greatly exceeded the demand for cocoa butter, which is used almost exclusively in the manufacturing of chocolate.

At that time, cocoa butter became a by-product in the manufacture of cocoa powder, with prices reacting accordingly. For example, while cocoa cake, the raw material for the manufacture of powder, is normally sold at a fraction of the price for cocoa beans, it reached prices of a multiple instead, and high quality cocoa powder was reportedly traded at \$9 000 per metric ton, or at \$14 600 per metric ton in current values. In contrast, the same powder is currently being sold for less than \$1 200 per metric ton.

This phenomenon is explained by the fact that the amount of cocoa used as flavor in a finished product represents relatively little in terms of percentage of the overall cost. Even if the price of salt, for example, should quadruple, there would be little affect on its overall demand, because the cost of salt in a single meal is negligible. On the other hand, a drop in salt prices will not necessarily mean that people will use more because its price is lower.

Cocoa flavor is unique, and it is not easily substituted, which only reinforces this aspect of lower price elasticity. Various attempts have been made to quantify cocoa's price elasticity. We tend to view these attempts with suspicion given the general quality and trustworthiness of international cocoa statistics. Indeed, they may have led to quantifications and projections that are unreliable.

While chocolate consumption is strongest in the coolest and most affluent parts of the globe, the consumption of cocoa and chocolate-flavored products other than chocolate tends to be greater in the warmer and less economically privileged markets.

Consequently, demand for cocoa butter and cocoa liquor is strongest in northwestern Europe, while the United States tends to be a net user of cocoa cake.

It has been amply demonstrated elsewhere that world cocoa consumption is responsive to economic conditions in the consuming countries, climate and price levels. The first two factors tend to change slowly, but there is also a lag in consumers' response to prices, as cocoa bean usage depends not only on the demand for chocolate.

While consumption is thus relatively stable, production tends to show greater variations from season to season. There has been a strong increase in produc-

tion primarily from the Ivory Coast and the Far East. These areas produced the quantities shown in the following Table 1.

During this time, estimated world consumption has increased from 1 630 000 metric tons to around 2 200 000 metric tons, which is an average percentage annual increase of 5.1 percent. Given these parameters, it was inevitable that a major crisis developed; following are the fundamental reasons for it.

It should be obvious that it is not possible for world-wide demand for a food product of general consumption with the complex outlets of cocoa to develop a 16.6 percent annual growth rate over six years. In fact, 5.1 percent is a respectable increase and is in excess of the combined population increase and economic growth in the cocoa-consuming countries.

An additional consideration is that even the large cocoa-consuming countries have not reached their full potential in *per capita* consumption. The country with the highest *per capita* consumption is Switzerland with 4.29 kg/yr. West Germans consume only 2.74 kg of cocoa beans per year, the U.S. 1.98 kg, the U.S.S.R. 0.72 kg, and Japan 0.67 kg/yr. While one should not expect that the Japanese will turn into Swiss overnight, these figures clearly illustrate that the world has not reached its saturation point as far as cocoa bean consumption is concerned.

Contrary to other tropical food commodities, cocoa has also received recent good reviews on its health aspects, notably in the area of dental caries prevention, the suppression of the lactose allergy factor, and its suspected beneficial effect on blood cholesterol.

Such considerations are difficult to quantify. They make it impossible, therefore, to forecast either the magnitude or the timing of the next bullish cocoa bean price cycle, but they also provide justification for the belief that such a trend will be forthcoming. When it comes, producers should be ready for it.

Table 1. Cocoa production in thousands of metric tons.

	1982/83	1988/89	Average annual rate of increase (%)
Ivory Coast	355	800	14.5
Malaysia	70	230	21.9
Indonesia	9	60	37.2
The three countries	434	1 090	16.6

### Criteria for a new marketing policy

It is always good commercial policy to find out what the customer needs and then give it to him. The more these needs are filled, the more willing the customer will be to pay a fair price. It is suggested that current marketing practices by the producing countries do not generally cater to the most important needs of the customers.

If, then, a modification of the marketing philosophy in the producing countries becomes necessary, what aspects should be considered, and what objectives should be set?

Barring a major crop disaster, one must face the probability that cocoa prices are not going to improve rapidly to the levels experienced in the late 1970s. Smaller cocoa-exporting countries must address the question of how they can survive in a climate of increased competition from very large and potentially low-cost producers, at a time when their reserves for price stabilization, if any, are dwindling.

Given the above criteria, an exporting country would want to establish a long-term production and exporting policy which would address the following options:

- Export cocoa beans
- Process the beans locally into cocoa liquor
- Process the beans into cocoa butter and cocoa cake
- All of the above

Once a decision has been made on which of these options should be adopted, a channel of commercialization from the farm to the exporter or the domestic processor, and a channel of export marketing for the beans and/or the products must be developed.

Here again, the country has various options:

- Allow individual private enterprise to purchase cocoa from the farmers at the market price of the day and let these enterprises sell the beans—or the products, if a domestic processing industry exists—for export at world market prices.
- Allow the above system, but introduce an internal stabilization device to shelter the producer from the fluctuations in the world market for cocoa.
- Establish a central marketing body which purchases the cocoa from the producers at a predetermined

and stable price and have the same body market the cocoa at world market prices.

- A combination of some or all of the above.

### Bean exports versus product exports

There has been great attention paid to the transformation of cocoa beans into primary products, so as to recapture the "processing margin" for the exporting country and to provide opportunities for industrial investment, technology transfer and employment.

As we described above, there is a certain logic that cocoa beans should be transformed into cocoa cake to be exported to the U.S. and into cocoa butter, to be exported to Europe, rather than having the beans sent to either destination and then shipping the less-desirable product across the North Atlantic.

However, an unbiased analysis of all the factors involved will reveal that such processing activities are generally economically less interesting than the simple export of cocoa beans, particularly in the smaller producing countries. The manufacturing process of transforming cocoa beans into cocoa liquor, cocoa cake and cocoa butter is relatively simple, and no great transfer of technology is involved, as these machines respond more readily to good foremanship and *ad hoc* processing modifications than to the latest technological improvements. Rather than cutting edge technology, strong emphasis on sanitation and an efficient operation is the key to success.

The efficiency per dollar invested increases with size of operation. Therefore, the most efficient cocoa processing plants are units which grind in excess of 50 000 metric tons of beans per year, and are located in the hub of European consumption, where factory inventories can be minimized and delivery to customers is made in bulk form literally overnight. These plants can add capacity on an incremental basis at a fraction of the cost of processing one ton of beans at a new processing plant to be installed in a small producing country. Moreover, to be economical, a cocoa processing plant must be operated on a three-shift-a-day and fifty-weeks-a-year basis. Bean supply for such an endeavor in a small country with seasonal crop availabilities would simply not be there.

It should also be borne in mind that the marketing of cocoa products is infinitely more complex than the marketing of raw beans, as sanitation aspects, particularly in processing, product specification, consistent availability of the merchandise, and greatly decreased fungibility are important ingredients in the marketing mix.

On the other hand, if there exists a good (or even modest) domestic market for cocoa products in the producing country or in the immediate economic sphere of influence, then the economic feasibility of installing a small processing facility to meet this local demand can be more easily demonstrated. It could be attractive to add production for export on an incremental basis to take advantage of existing excess capacity. Such a facility would also be available for the processing of inferior cocoa, which while still sound, may not meet the export grade quality levels, for example, because of bean size. By eliminating these beans from the market at an economically attractive price, the development of a black market and subsequent adulteration of export qualities can be effectively prevented.

The point is that, at least in cocoa, the concept of capturing the processing margin by cocoa producing countries is not a firm and fast doctrine, but must be explored on a case-by-case basis. Ample experience with such endeavors exists elsewhere, and in every instance these industries depend on either a strong internal demand for their product, or on tax advantages and other disguised direct and indirect government subsidies, while they reduce rather than enhance the country's foreign exchange earnings capability.

Given the political realities existing in every country, realities that will differ from case to case, the considerations in the evaluation of the advantages and disadvantages of each of these options cannot all be purely economic. Indeed, as all of the above options are currently in existence in the cocoa-producing countries, it is interesting to observe which priorities were addressed in the choice of these systems, and how these systems have fared over time in the witches' cauldron of the world cocoa market.

However, regardless of the option chosen by a country, one of the first priorities clearly must be the reduction of production and marketing costs and the diversification of farm income. In those areas where cocoa cultivation has been modified from the traditional high shade-low farm input growing method to a system of low shade-high fertilizer and insecticide input, the return to the former practices may be considered. In a period of increased concern about the overflow of farming chemicals into the public water supply, the danger of chemical residues in the product, and the depletion of the world's tree canopy, a return to the classical cocoa culture may be ecologically beneficial and particularly well-suited to smaller subsistence farmers.

Likewise, the diversification of present cocoa acreage into additional crops, preferentially with a different cropping pattern than cocoa, may have the added attractive aspect of using farm labor on a full-time yearly basis. These complementary crops may, in some instances, even be used as shade, and thus increase the overall farm income per acre. Successful recent introductions of such practices involving rubber have been reported from Brazil, while intercropping with coconut, for example, has a long tradition in the Pacific Islands.

In an environment of increasing population and concomitant demand for more fresh food, the production of locally marketable crops, including small farm animal husbandry, should also be considered.

In other words, as a measure to stabilize farm income, we favor diversification over systems of price supports during low price periods and excess payments during periods of high cocoa prices. In a minimally controlled economy, producers will find it advantageous to adapt quickly to buyers' needs. Crop diversification also allows the price to fulfill its task, namely to allocate resources where they are most urgently needed. Thus, a drop in cocoa prices could induce farmers, particularly small family farms, to spend more time on raising pigs, bananas, beans or cassava, thereby reducing the supply of cocoa and increasing the supply of more urgently needed commodities.

If we consider the alternative of firmly locking cocoa farmers into a marketing board system, where prices remain stable over a period of seasons, cocoa price would have no effect on the supply side of the equation, and economic distortions will inevitably result. As experience in many countries has amply shown, these economic distortions then give rise to an entirely new set of economic and political problems, the solution of which often exacerbate rather than assuage a complex situation.

Unfortunately, in ranking priorities in the identification of objectives to be met by the applicable internal marketing systems, the buyer's need has often been removed from the exporters' direct area of influence and has been subrogated to internal political objectives and/or to ideological considerations.

The justification often given for the existence of price stabilization mechanisms in the producing countries is the perceived need by the "small, primitive" farmer to be relieved of the worry caused by an unpredictably fluctuating income, and to protect him

from the exporters' predatory commercial and credit practices in purchasing his cocoa. We rather suspect that these comments are *ad hominem* arguments rather than supportable facts, and are, therefore, inclined to discount them.

In practice, some countries, such as the Ivory Coast in 1985, 1986, 1987 and 1988, the income earned by the cocoa farmers was unrealistically high, thus leading to a vast overexpansion of production at a time when the world market had already begun to fall. Consequently, the lower world market prices were not allowed to exert their deterrent effect on production until it was too late.

In other countries, the difference paid to the farmer and the revenue obtained by the central marketing authority was such that, even during periods of high world cocoa prices, there was no incentive for the farmers to produce more. Thus, the world market prices did not encourage increased output in this particular area, but they did open incentives for newcomers to cocoa in other areas of the world using advanced technology and aggressive marketing techniques to fill the gap.

It should also be noted that, regardless of the specific needs of the cocoa-producing and exporting community, significant incentives or deterrents can be created through management of domestic currency.

In theory, all domestic marketing systems are meant to optimize income for the producers. In practice, they often create instability, uncertainty, lessen the incentive to produce high-quality material, impede long-term marketing strategies, interfere with the use of the cocoa exchanges, alienate buyers, and divert revenue to areas unrelated to cocoa.

In the determination of a new marketing strategy for cocoa, the responsibility for current low prices should be faced realistically. While it is easy to blame the international chocolate industry (quite unjustly) for not doing enough to expand demand, the well-documented slow response to lower prices and relative price inelasticity of cocoa must be accepted to be an economic fact of life. Indeed, if it were possible to expand consumption more rapidly, the processing industry surely would have done so in the quest for additional profits.

Cocoa has historically shown a cyclical price behavior. There is nothing in the current situation which indicates that this cyclical nature has disappeared, although the periods between the highs and lows may be longer than in the past. A contributing

factor may have been the actions taken by the various producing countries, as discussed above, and by the existence of the International Cocoa Organization's buffer stock, which appears to act as a psychological price depressant in the eyes of many.

The prospect of lower cocoa bean prices is an incentive to place cocoa production and marketing on a more sound commercial basis. Wasteful practices should be eliminated, and a more customer-oriented marketing philosophy and more professionalism must be applied to the selling of cocoa. There are ample opportunities for exporters to familiarize themselves with the workings of the international cocoa market. With very few exceptions, exporters tend to shy away from the use of the international commodity exchanges, either out of fear of the unknown, or because of the closely related belief that these exchanges are casinos, which they are not. This attitude is simply wrong, harmful and, above all, costly. Moreover, it is easy to correct, if the will to do so exists.

Among the more practical measures to be adopted is greater reliability of contract performance and improved quality control. Receiving cocoa on the docks in Amsterdam or in Norfolk should not be a surprise party, where nobody knows what to expect. Shipping practices, preshipment storage conditions and post-harvest treatment and sanitation must be improved.

Bean size must be standardized, extraneous matter and waste must be eliminated, and grading and fumigation certificates must be authentic, if the exporter is to optimize his return. Furthermore, the still-shocking record of maritime claims must be significantly improved.

Admittedly, these are difficult concepts to adopt during periods of lower prices. It is at this time, however, when the buyers are in a position to choose the best offer, that they will favor those origins and exporters which give them more value for their money. This choice does not exist when cocoa is in short supply.

Another important aspect in improving an exporter's ability to optimize his return is the relationship he is able to build up over a period of time with his buyers. It is for this reason that the Ivory Coast action of favoring one or two big trade houses at the expense of literally dozens of smaller firms is tragic, because it has eliminated the country's access to a multitude of special selling opportunities which can only be taken advantage of by specialized and established trading firms.

Experience has shown that, in cocoa, bigger is not necessarily better. While there may be less glamour in selling smaller quantities (at modest profit margins, but with clearly definable and affordable risks) than in the movement of big blocks which attract global attention, many years of experience have shown that it is the professional operator with a good, solid knowledge of the market who will eventually prevail

A cocoa exporter would, therefore, find it of great advantage to identify such a firm or firms, which may be agents or importers, and establish a personal relationship. Young people with the potential of becoming export managers should be allowed to work over a period of time in the overseas offices of cocoa importers and dealers, both in the U.S. and in Europe. Many firms are quite ready to accept such trainees.

However, perhaps the most important change required is a change in the attitude of both seller and buyer. Exports and importers form part of the same distribution chain — one cannot exist without the other. The cost of distribution of a commodity is as important as its production, as the ultimate formation of price is at the processor's factory door. In the competition with other producing countries, the exporter with the most efficient cost structure will be the one who can provide his supplier — the farmer — with the highest revenue. Transportation and other distribution costs, such as insurance, finance and

import formalities from f.o.b. exporting country to factory door, even for a product which is exempt from import duties, may now amount to more than \$250 per metric ton, not including the importers' profit — if any. This is a lot of money

This consideration begs the question whether the many attempts by the producing countries' governmental agencies at interfering with the free market structure are not economically self-defeating. We are thinking especially of such common measures as exporters' quotas, restricted access to foreign funds and other *de facto* or *de jure* impediments to trade on foreign cocoa exchanges, and the imposition of totally self-destructive cargo sharing arrangements such as limiting shipment to certain flag vessels only.

By restructuring the cocoa market in all its segments, so that it is as free as possible, and hence is allowed to respond to price immediately, we not only enhance farmers' income during the periods of low prices, but we also support a trading and distributive community essential to the efficient distribution of the product. Moreover, we assure a continued supply to the processing industry, a supply which will be increasingly needed as we inevitably move towards increased *per capita* consumption throughout the world. Finally, a quicker response of production to price will mitigate rather than exacerbate price extremes, the inevitable result of what are ironically called "price stabilization" measures.

#### REFERENCES

- ARTHUR, H.B. 1971. Commodity Futures as a Business Management Tool. USA, Harvard University
- BARON, P. 30 January 1990. Article in London Financial Times
- CURTIS, B.N., et al. 1987. Cocoa — a trader's manual. Geneva, ITC/UNCTAD/GATT.
- GILL & DUFFUS Group Ltd. Market report

- IICO. May 1989. Cocoa consumption in the USSR. London, IICO
- IICO. 1989. The World Cocoa Economy: Review of Recent Developments and Outlook for the Next Three Years. London, IICO
- JOURNAL OF COMMERCE, 26 January 1990.
- US DEPARTMENT OF AGRICULTURE. World Cocoa Situation. Washington, DC, USA, USDA, Foreign Agricultural Service

# Relação Cacau/Chocolate Derivada dos Produtos Chocolatados Exportados pelo Brasil, 1970-1985<sup>1</sup>

F. Monteiro de Andrade\*, H. Estrela Barroco\*\*

## ABSTRACT

Exports of Brazilian chocolate products have been growing at a steady rate over the years. However, the proportion of cacao contained in these products remains unknown. The current study will discuss the nature of the products exported as chocolate and define the cacao/chocolate ratio. The methodology employed for the different types of chocolate aggregation is a discussion of the nature and subsequent adoption of the conversion factors employed by the International Cocoa Organization (ICCO). The data refer to the period 1970 to 1985 and were obtained from CACEX publications. After a review of the literature dealing with chocolate and its classification (according to the Brazilian Commodities Nomenclature - NBM), only some of the products classified in this publication as chocolates were selected. With the subsequent application of the conversion factors, a growing tendency of cacao utilization in chocolate manufacturing was observed. This has led to the conclusion that Brazilian policies on export incentives should take into account the cacao/chocolate ratio in export products with a view to establishing objectives, together with a means of assuring the improvement of rules and standards in line with chocolate production laws.

## INTRODUÇÃO

### Importância e objetivos

**A**s exportações brasileiras de manufaturados têm crescido a elevadas taxas nos últimos anos. Dentre os produtos manufaturados, o chocolate vem-se destacando com o crescimento de suas exportações. Isto, além de agregar valor às exportações, pode contribuir para uma menor dependência do Brasil em relação às flutuações dos preços internacionais do cacau, principal componente para a fabricação de chocolate e um dos produtos primários mais importantes da pauta de exportações do Brasil.

<sup>1</sup> Recebido para publicação el 13 decembro 1989

\* Economista, M.S., Técnico Convênio IICA/CLPLAC  
Brasília-DF – CEP 70.070

\*\* Economista, D.S., Assessor da CEPLAC/SECRI/COECE  
Brasília-DF – CEP 70.070

## RESUMO

As exportações brasileiras de produtos de chocolate vêm se destacando com um crescimento percentual ao longo dos anos. No entanto, é a relação do conteúdo de cacau embutido nestes produtos desconhecida. Com isto, o presente estudo procura discutir a natureza dos produtos exportados como chocolate e determinar a relação cacau/chocolate nas exportações brasileiras de produtos chocolatados. A metodologia usada para agregação dos diversos tipos de chocolates é a discussão da natureza destes e posterior adoção de fatores de conversão utilizados pela ICCO (International Cocoa Organization). Os dados referem-se ao período 1970 a 1985 e foram obtidos de publicações da CACEX. Após revisão de literatura a respeito de críticas e divergências do chocolate e sua classificação segundo a NBM (Nomenclatura Brasileira de Mercadorias), optou-se pela seleção de apenas alguns itens classificados como chocolate. Com a exclusão dos itens restantes na lista, e posterior aplicação dos fatores de conversão, percebe-se uma tendência crescente do uso de cacau na fabricação de chocolates exportados, por isso, as políticas brasileiras que incentivam a exportação de chocolate devem ter em vista a relação cacau/chocolate nos produtos de exportação como forma de delinear os objetivos a serem alcançados, bem como uma maneira de fiscalizar o cumprimento às normas e padrões estabelecidos em lei para produção de chocolate.

Em termos conceituais, o chocolate é tido como o produto advindo do processo de manufatura adequado, a partir da mistura de um ou mais ingredientes, tais como farelo de cacau ou "cocoa nibs", massa ou pasta de cacau, também chamado "cocoa liquor", manteiga de cacau, açucares, produtos lácteos e ingredientes opcionais de acordo com as normas e tipos desejados de chocolate (9, 10).

Conforme a proposição de normas e padrões técnicos para a produção de chocolates no Brasil, elaborados sob a determinação da Portaria 91/84 do Ministro da Agricultura, e ainda, não sancionada, encontra-se a seguinte tipologia para os chocolates brasileiros:

- A Chocolate amargo e meio amargo
- B Chocolate ao leite
- C Chocolate ao leite desnatado

- D. Chocolate ao creme de leite.
- E. Chocolate em pó:
  - E.1. Chocolate em pó.
  - E.2. Chocolate em pó de alto teor de gordura.
  - E.3. Chocolate em pó solúvel.
- F. Chocolate cobertura.
- G. Chocolate granulado ou em flocos.
- H. Chocolate Fondant.
- I. Chocolate branco.
- J. Outros tipos de chocolate.
  - J.1. Chocolate para dietas especiais.
  - J.2. Outros produtos que contêm chocolate (xarope de chocolate, chocolatados e misturas à base de cacau para bebidas).

A linhagem dos produtos finais encontrados no mercado brasileiro, segue classificação semelhante à existente no mercado internacional, ou seja: as barras ou maciços, com ou sem introdução de passas, nozes, castanha de cajú, etc; os "fillings" (produtos recheados), os quais vem galgando projeção internacional através do volume produzido; as pastilhas, etc.

O consumo de chocolate no mercado internacional apresentou, nos últimos anos, uma tendência relativamente constante, enquanto persistiu uma tendência crescente no volume produzido. Dentre os principais países consumidores de chocolate, a Suíça tem-se destacado como maior consumidor per capita de chocolate, tendo apresentado, no período 1973/82, um consumo de 9.7 quilogramas/pessoa/ano. A pesar do aumento no consumo interno de chocolate em alguns países, como, por exemplo, no Brasil, Áustria e Noruega, nos demais, o consumo per capita ficou mais ou menos constante ao longo do tempo. O consumo médio per capita dos maiores consumidores de chocolate, no período 1973/82, foi de 4.7 quilogramas/pessoa/ano (6).

Nos últimos anos, o Brasil tem aumentado substancialmente as exportações de chocolate, passando de 5 mil toneladas, em 1978, para 33.8 mil toneladas de chocolate exportadas, em 1984. Esse fato tem contribuído duplamente para a economia brasileira: em primeiro lugar, porque agrega valor ao produto exportado, contribuindo também para o aperfeiçoamento e desenvolvimento de novas tecnologias de produção de chocolate; em segundo lugar, porque o aumento do consumo interno de cacau pelas indústrias chocolateiras pode levar a uma diminuição da oferta de cacau brasileiro no mercado internacional, o que possibilitaria um aumento das cotações do cacau brasileiro nas bolsas de mercadorias de Nova Iorque e Londres.

As exportações brasileiras de chocolate e de outras preparações alimentícias que contenham cacau, são

regidas pela Resolução CBN-45 de 07.12.79 do Ministério da Fazenda, constando da posição 18.06 da Nomenclatura Brasileira de Mercadorias – NBM.

A necessidade de se estudar a relação cacau/chocolate, tem seu fundamento no fato do chocolate ser um produto cujo ingrediente básico é o cacau. Dessa forma, quanto mais cacau existir no produto final, deixa-se de usar, por exemplo, sucedâneos da manteiga de cacau, açúcar, etc.

A relação cacau/chocolate nos mercados europeus (Fig. 1), apresenta-se com uma tendência decrescente, ao passo que no Japão mantém-se com uma tendência ligeiramente positiva, ou seja, aos poucos vem utilizando mais derivados de cacau na fabricação do chocolate. Os Estados Unidos mantêm-se na mesma proporção da relação cacau/chocolate ao longo do período observado.

O fato de a relação cacau/chocolate vir diminuindo em alguns países é um sintoma de que cada vez mais se utilizam açúcar, recheios diversos e sucedâneos para os derivados de cacau, objetivando uma redução no preço final do produto, visto que um dos insumos mais caros na fabricação do chocolate é o cacau e seus derivados. Para exemplificar esse fato, a Organização Internacional do Cacau (11) destacou que: "as medidas tomadas pelas indústrias chocolateiras para reduzir os custos de produção, devido principalmente aos preços dos insumos, foram:

- a) combinar os preços de compra dos produtos adquiridos previamente;
- b) considerar a utilização de sucedâneos ou equivalentes da matéria-prima, pois particularmente no que se refere à manteiga de cacau, um aumento no

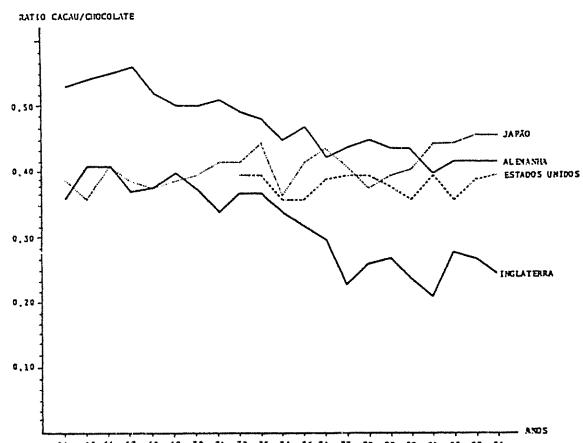


Fig. 1. Evolução da Relação Cacau/Chocolate em 04 Mercados Selecionados, 1964 – 1984.

Fonte: Andrade (2).

- preço do cacau em amêndoas daria novos incentivos à utilização de outros tipos de sucedâneos;
- c) substituir os componentes do cacau utilizados na fabricação do chocolate por outros ingredientes, como nozes, frutas secas, etc.; utilizar uma maior proporção de recheios que contenham produtos que não sejam o cacau; ou simplesmente reduzir dentro das prescrições estipuladas pela lei, a percentagem dos componentes de cacau".

A análise dessas exportações levou a se tentar uma separação de alguns produtos que estão distoando com a conceito de chocolate. Neste sentido, foi feita crítica às exportações de chocolate dessa posição e, segundo Barroco (5), uma nova interpretação e alocação dos diferentes tipos de produto qualificaria melhor os índices a serem obtidos.

Este fato poderia levar a se ter mensurações dessa relação com maior exatidão, obtendo-se índices mais confiáveis à respeito das quantidades de cacau absolutas pelas indústrias chocolateiras brasileiras na fabricação do chocolate.

Assim sendo, o presente estudo teve por objetivo destacar os itens, dentre os da Posição 18.06 da NBM e que se enquadram no conceito de chocolate, a fim de, usando de uma metodologia adequada e definida, determinar a relação cacau/chocolate nas exportações brasileiras entre 1970 e 1985.

#### Metodologia

O processo para determinação da produção brasileira de chocolate é o simples somatório de todos os tipos de chocolate produzidos internamente. Este tipo de metodologia, apesar de ser usada em alguns países, introduz um viés na obtenção do volume final do produto, pois mascara o uso efetivo de cacau e seus derivados no produto chamado chocolate, além de agregar ainda, o volume dos diferentes tipos de produtos como oleaginosas, frutas etc., introduzidos na massa de chocolate. Tal constatação torna-se bastante expressiva, no momento em que se analisa o comportamento dos diferentes produtos existentes no mercado nacional e internacional, principalmente porque os produtos recheados apresentam-se com um volume considerável na produção dos diversos tipos de produtos.

Os "fillings" ou recheados vêm aos poucos ocupando lugar de destaque nas compras dos consumidores e consequentemente na produção das indústrias. Surgiram basicamente da necessidade de baratear o preço dos produtos contendo chocolate, frente aos atuais custos de produção, uma vez que é praticamente impossível reduzir preço dos produtos tradicionais, a não ser introduzindo no processo tecnológico o uso

de sucedâneos da manteiga de cacau, ou reduzindo o peso no produto final; (Tendência, Junho de 1984).

As estatísticas relativas ao consumo de cacau em amêndoas e de derivados de cacau pelas indústrias chocolateiras são de modo geral, elaboradas (quando não se dispõem de estatísticas específicas), tomando-se como base o volume total de chocolate produzido, aplicando-se posteriormente um único fator de conversão de valor 0.40, segundo a FAO (8), a fim de transformar chocolate em sua equivalência em termos de cacau em amêndoas.

No entanto, este fator desconsidera os vários tipos de produtos conceituados como chocolate, cuja composição é bastante diversa, principalmente no teor de cacau imbutido.

Assim, o procedimento correto para a agregação dos diversos tipos de chocolate exportados visando a elaboração de estatísticas, é a adoção criteriosa dos fatores de conversão utilizados pela ICCO, combinando com informações fornecidas pelas indústrias brasileiras de chocolate. Com isto, tem-se, segundo a ICCO, os seguintes fatores:

Barra e Cobertura . . . . .	0.50
Recheados . . . . .	0.30
"Milk Crumb" . . . . .	0.15
Outros Produtos de Chocolate . . . . .	0.35

Destes, os dois últimos não são utilizados na pesquisa por não serem adequados às características do chocolate produzido e exportado pelo Brasil no período analisado. Para completar os fatores apresentados, optou-se por um fator de 0.70 para o chocolate em pó e um outro de 0.15, para o item "qualquer outro produto de chocolate", devido à pressuposição de que existe um conteúdo bem pequeno de cacau imbutido nos mais variados produtos aí alocados.

Apesar de correto, somente poucos países fazem uso desses fatores preconizados pela ICCO, para efeito de cálculos estatísticos, devido à necessidade de dados especificados por produto.

Por outro lado, ao observar-se as normas de NBM – Posição 18.06 no Quadro 1, percebe-se claramente que alguns produtos distoam do conceito de chocolate. Em vista disto, selecionou-se os produtos da subposição 02, itens 01 (chocolate em pó), 02 (chocolate granulado), 03 (chocolate em pastilha, barra ou tablete), 04 (chocolate em pasta) e 99 (qualquer outro) assim como da subposição 04 itens 02 (bombons e balas), 04 (nogado) e 06 (amendoim confeitado com chocolate). Os outros itens da posição

foram propositalmente deixados de fora por serem totalmente incompatíveis com a definição de chocolate.

Após a aplicação dos fatores de conversão, por cada série de produto, calculou-se a relação cacau/chocolate a cada ano. Esta relação foi ponderada pelo uso dos fatores. Também, foi calculada a relação cacau/chocolate ponderada, após a exclusão do item 99 da subposição 02, ou seja, qualquer outro tipo de chocolate, pois verificou-se que esta posição representa uma parcela considerável das exportações brasileiras sem, no entanto, estar totalmente compatível com o conceito de chocolate.

A série de dados utilizada, abrange os anos de 1970 a 1985 e os dados foram obtidos da publicação "Comércio Exterior, Exportação - Mercadorias por Países e Portos", da Carteira de Comércio Exterior do Banco do Brasil - (7).

## RESULTADOS

Da análise do Quadro 2, observa-se inicialmente o considerável aumento nas exportações brasileiras de chocolates de todos os tipos, entre 1970 e 1985. Esse aumento, representou 64 vezes o valor inicial, ou seja, passou de 194 toneladas em 1970, para 12 500 toneladas em 1985. O produto que mais se exportou foi aquele que corresponde ao item 99 da posição 18.06 da NBM - qualquer outro tipo de chocolate, que correspondeu à 91% do total exportado no período analisado. A seguir, sobressairam-se: bombons e bolos de chocolate, 5,8%; chocolate em pastilha, barra ou tablete, 1,5% e o chocolate em pó, com um percentual de 1,3%.

A participação de alguns produtos na pauta de exportação é recente a partir de 1980, como por exemplo: chocolate granulado, chocolate em pastilha, barra e tabletes e chocolate em pasta.

Os resultados procedentes da aplicação dos fatores de conversão cacau/chocolate, sobre os dados do Quadro 2, podem ser vistos e analisados conforme apresentados no Quadro 3. Observa-se uma variação muito grande e positiva no percentual de cacau em amêndoas exportado sob a forma de chocolate no período analisado, alcançando 1 700%. Este aumento demonstra a viabilidade de uso de cacau em amêndoas nos produtos finais dos chocolateiros e que foram exportados pelo país entre 1970 e 1985.

Apesar de se ter considerado um fator pequeno 0,15 para o item "qualquer outro tipo de chocolate",

**Quadro 1. Classificação e caracterização de chocolate segundo a Nomenclatura Brasileira de Mercadorias (NBM).**

Código	Mercadoria
Posição	Subposição e item
18.06	Chocolate e outras preparações alimentícias que contenham cacau.
	00 00
	01.00 Cacau em pó, açucarado
	02.00 Chocolate
	01 Em pó
	02 Granulado
	03 Em pastilha, barra ou tablete
	04 Em pasta
	99 Qualquer outro
	03.00 Preparações para a alimentação infantil ou para usos dietéticos ou culinários, à base de farinha, amidos, féculas ou extrato de malte, contendo 50% ou mais de cacau.
	04.00 Preparações açucaradas (produtos de confeitaria)
	01 Doce de leite
	02 Bombons ou balas
	03 Caramelos
	04 Nogado
	05 Geléias e pastas de frutas
	06 Amendoin confeitado com chocolate
	99 Qualquer outro

Fonte: NBM, CACEX

conforme explicado na metodologia, este apresentou-se como o mais representativo dos oito itens selecionados para estudo.

No cálculo da relação ponderada cacau/chocolate, para todo o período, percebe-se que houve uma tendência crescente de uso de cacau nos chocolates até o ano de 1980, revertendo-se após, numa tendência negativa, ou seja, uma tendência a se colocar menos cacau em amêndoas na fabricação do chocolate. Este fato pode ser explicado através dos seguintes fatos: 1) maior produção dos produtos recheados (filled) pela tendência de consumo do mercado; 2) uso de produtos sucedâneos e 3) maior percentual de açúcar e/ou sucedâneos.

Chama-se atenção (Quadro 3) que o ano de 1970 é atípico, ou seja, foi o ano que praticamente só se

Quadro 2. Quantidade de chocolate exportado de diversos tipos, 1970-1985.

Tipos Anos	Chocolate em pó	Chocolate granulado	Chocolate em pastilha, barra ou tablete	Chocolate em pasta	Qualquer outro tipo de chocolate	Bombons ou balas	Amendoim confeitado com chocolate	Nogado	Unidade: kg
									Total anual
1970	171 697	-	16 414	-	-	6 342	-	-	194 453
1971	-	-	-	-	384 460	-	-	-	384 460
1972	-	-	-	-	1 185 742	-	-	-	1 185 742
1973	-	-	-	-	4 934 033	-	-	-	4 934 033
1974	481 208	-	-	-	8 362 387	45 941	-	-	8 889 536
1975	177 612	-	-	-	17 622 801	53 192	1 160	-	17 854 765
1976	31 497	-	-	-	19 533 528	135 639	1 375	-	19 702 039
1977	26 172	-	-	-	36 973 021	116 221	546	-	37 115 960
1978	78 402	-	-	-	315 847	227 435	229	-	621 913
1979	94 069	-	-	-	514 867	501 825	-	-	1 110 761
1980	198 241	182	188 941	104 217	1 054 185	1 723 340	-	-	3 269 106
1981	86 413	1 404	387 391	258 437	1 657 627	1 855 291	-	-	4 246 563
1982	51 811	272	226 976	1 252	1 197 698	667 157	222	-	2 145 383
1983	115 368	433	358 994	26 724	6 331 483	568 867	1 095	1 200	7 404 174
1984	49 457	733	434 198	23 315	11 277 663	998 727	2 504	10 144	12 796 741
1985	148 600	1 645	401 374	80 677	10 980 085	903 853	5 907	-	12 522 141
Total	1 710 547	4 669	1 997 874	494 622	122 325 442	7 803 830	13 038	11 344	134 377 780

Fonte: CACEX, Comércio Exterior. Exportação - Mercadorias por Países e Portos, 1970-1985

exportou chocolate em pó. No entanto, esta tendência observada, foi decorrente do significativo peso do item de maior expansividade nas exportações ("qualquer outro tipo de chocolate").

Quando se exclui este item do cálculo, nota-se exatamente o oposto, ou seja, existe uma tendência negativa do uso de cacau na fabricação dos chocolates exportados até 1979, mudando logo a seguir para uma tendência positiva (Quadro 4). Estas novas relações cacau/chocolate calculadas ficam bem próximas do que vêm ocorrendo nos principais países consumidores, ou seja, "ratios" próximos de 0.36.

Esta mudança assinalada para o cálculo do Quadro 4, demonstra a vantagem da metodologia da ICCO, quando adaptada e complementada para sua aplicação às características do chocolate brasileiro, em comparação com a metodologia até então recomendada pela FAO (Food Agricultural Organization), que aplica um único fator de conversão, no valor de 0.40 sobre a quantidade física do chocolate.

No Quadro 4, vê-se que na análise onde se computam todos os itens selecionados, apresenta um fator ponderado total de 0.17 no período, ao passo que, quando se exclui o item "qualquer outro tipo de chocolate", encontram-se um fator ponderado total

de 0.38 no período. Para efeito de comparação, a diferença entre o fator de conversão da FAO (0.40) e o fator ponderado da ICCO, quando complementado e adaptado para o chocolate brasileiro (0.38), representa em termos quantitativos, 158 toneladas de cacau em amêndoas exportadas no período em estudo.

Dessa forma, pode-se dizer que a análise feita excluindo-se o item explicado, ou seja, "qualquer outro tipo de chocolate" demonstrou estar mais próxima da realidade chocolateira mundial, e, por isso, parece ser a melhor para aplicações em estudos futuros.

#### CONCLUSÃO

Apesar das limitações do estudo, principalmente no que se referiu à exclusão de alguns itens da Posição 18 06 da NBM, pois estes não apresentaram uma afinidade com o conceito de chocolate, e, portanto, estavam em desacordo com a classificação da NBM segundo critica de Barroco (3), tem-se por conclusão:

1) A metodologia de cálculo da ICCO quando adaptada e complementada objetivando a elaboração da relação cacau/chocolate é mais realista que a da

Quadro 3. Quantidade de cacau exportado sob a forma de chocolate, segundo fatores de conversão, 1970–1985.

Tipos Anos	Chocolate em pó	Chocolate granulado	Chocolate em pastilha, barra ou tablete	Chocolate em pasta	Qualquer outro tipo de chocolate	Bombons ou balas	Amendoim confeitado com chocolate	Nogado	Unidade: kg
									Total anual
Fator de conversão	0.70	0.50	0.50	0.50	0.15	0.30	0.30	0.30	—
1970	120 188	—	8 207	—	—	1 903	—	—	130 298
1971	—	—	—	—	57 669	—	—	—	57 669
1972	—	—	—	—	177 861	—	—	—	177 861
1973	—	—	—	—	740 105	—	—	—	740 105
1974	336 846	—	—	—	1 254 358	13 782	—	—	1 604 986
1975	124 328	—	—	—	2 643 420	15 958	348	—	2 784 054
1976	22 048	—	—	—	2 930 029	40 692	413	—	2 993 182
1977	18 320	—	—	—	5 545 953	34 866	164	—	5 599 303
1978	54 881	—	—	—	47 377	68 231	69	—	170 558
1979	65 848	—	—	—	77 230	150 548	—	—	293 626
1980	138 769	91	94 471	52 109	158 128	517 002	—	—	960 570
1981	60 489	702	193 696	129 219	248 644	556 587	—	—	1 189 337
1982	36 268	136	113 488	626	179 655	200 147	67	—	530 387
1983	80 758	217	179 497	13 362	949 722	170 660	329	360	1 394 905
1984	34 620	367	217 099	11 658	1 691 649	299 618	751	3 043	2 258 805
1985	104 020	823	200 687	40 339	1 647 013	271 156	1 775	—	2 265 813
Total	1 197 383	2 336	998 938	247 313	18 348 813	2 341 150	3 916	3 403	23 151 459

Fonte: Cálculos da Pesquisa

Quadro 4. Relação ponderada cacau/chocolate derivada do chocolate brasileiro exportado, 1970–1985.

Anos	Relação cacau/chocolate	
	Todos os itens*	Excluindo-se o sub-item “Qualquer outro tipo de chocolate”
1970	0.67	0.67
1971	0.15	—
1972	0.15	—
1973	0.15	—
1974	0.18	0.61
1975	0.15	0.60
1976	0.15	0.37
1977	0.15	0.37
1978	0.27	0.40
1979	0.26	0.24
1980	0.29	0.36
1981	0.28	0.36
1982	0.25	0.37
1983	0.19	0.41
1984	0.18	0.37
1985	0.18	0.40
Fator ponderado	0.17	0.38
Total do período		

\* Ver Quadro 3

Fonte: Cálculos da Pesquisa

FAO, pois pondera os diversos tipos e padrões de chocolates produzidos e exportados.

2) As Políticas Brasileiras que incentivam a exportação de chocolate, como forma de oferecer uma alternativa para o escoamento da produção brasileira de cacau, devem ter em vista a relação cacau/chocolate, como uma maneira de se ter certeza de que o objetivo será atingido, e, até mesmo, como uma forma de fiscalizar os industriais quanto à obediência às normas e padrões estabelecidos em lei para a produção de chocolate

3) A classificação da NBM para os produtos chocolateados, não vem espelhando a realidade, ou seja, vários produtos alocados na Posição 18.06 nada têm a ver com o conceito de chocolate. Portanto, urge uma reavaliação das normas de classificação da NBM.

4) A demora em se publicar as normas e padrões técnicos para a produção de chocolates no Brasil vem acarretando prejuízos para os consumidores e chocolateiros

5) É necessário que se forme um grupo interministerial objetivando a elaboração de normas e padrões técnicos para a produção de “Produtos de Fantasia” no Brasil, ou seja, produtos que estão sendo processados e comercializados com o nome de chocolate, sem contudo, ser chocolate. Esta prática demonstra uma distorção de mercado caracterizando-se desse modo um “abuso” contra os consumidores.

## LITERATURA CITADA

1. A DOCE expansão do consumo de chocolate 1984 Bra Tendência no. 71.
2. ANDRADE, F.M. 1988 Algumas considerações sobre o mercado internacional de chocolate Tese M.S. Viçosa, Bra., Imprensa Universitaria. 80 p.
3. BARROCO, H.E. 1984 Consumo de chocolate no Brasil: Valores corrigidos Brasilia, CEPLAC Série Estudos Económicos no 6 16 p
4. BARROCO, H.E. 1983. O mercado de chocolate e suas divergências: Estatísticas. Itabuna, Bra., CEPLAC. Série Estudos Económicos no. 1 13 p
5. BARROCO, H.E. 1983. Exportações de chocolate e a nomenclatura brasileira de mercadorias Enviado à CACEX (não publicado)
6. BARROCO, H.E.; MENEZES, J.A.S. 1987 Aspectos físicos, econômicos e políticos do chocolate brasileiro, 1976-1982 Brasilia, Bra., CEPLAC Série Estudos Económicos no 10 92 p
7. CACEX. s.f. Comércio Exterior, exportação: Mercadorias por países e portos Série 1976-1982 Rio de Janeiro, Bra
8. FAO 1957 Algumas notas de economia mundial de cacau em medidas de estabilização Roma, Italia. 12 p
9. FAO 1978 Recomended international standard for chocolate Roma, Italia. 37 p
10. ICCO 1976 Estudio de la capacidad de producción y consumo de cacao Londres 21 p
11. ICCO 1978 Obstáculos a la fabricación de productos alimenticios que contengan cacao y chocolate

## Una nota sobre el cacao Lacandón

Entre las variedades más aberrantes de cacao, se encuentra la descrita con el nombre de "Lacandón" por Faustino Miranda (4), quien la encontró en Caribal Lonjá, Chiapas, en la selva lacandona Cuatrecasas (2), en su revisión taxonómica del género *Theobroma*, lo describe como *T. cacao* spp *cacao* forma *lacandonense*, distinguiéndola por las características del fruto. Aunque éstas son de interés, lo que más llama la atención en la descripción de Miranda es el porte, que califica de casi trepador; como él dice, sería único en el género. El tronco de unos 12 cm de diámetro por 6 m de alto, tiene ramas extendidas que se apoyan en otros árboles, dando la impresión de que sin ese soporte el árbol no se sostendría.

Luis Siller, antes Jefe del Departamento de Cacao del Ministerio de Recursos Naturales de México, había encontrado otros árboles de cacao en las cercanías de las ruinas mayas de Bonampak, famosas por las pinturas de las paredes. No había encontrado flores ni frutos. En junio de 1982, Siller, el autor y unos técnicos de la estación experimental de Tapachula viajamos a esa región de Chiapas, y encontramos en el asentamiento de Sinai, Municipio de Ococingo, numerosos árboles silvestres en flor. Este sitio está sobre la carretera que conduce de Palenque en Bonampak, y está como otros asentamientos, en un área en que se tala la selva para cultivos y potreros. Los árboles eran abundantes en ese sitio y tenían una florescencia profusa en los troncos y las ramas principales. Las flores son blancas, con los pétalos angostos, más parecidas al "Lagarto" que a las de los cultivares comerciales. No había frutos. Los árboles presentaban las características descritas por Miranda, con troncos entre los 10-15 cm de diámetro y tallos hasta de 15 m, que no llegaban hasta la altura de los árboles más elevados. La selva lacandona en esta región fluctúa entre los 20-25 m de altura y los árboles, de muy diferentes especies, tienen las copas a una altura uniforme. Como lo señaló Miranda, la selva lacandona es tupida y por consiguiente oscura. Se pudo ver que los árboles

de cacao en ese ambiente no tenían ramas en la parte inferior, y en la superior las horquetas típicas de esta especie estaban reducidas a una o dos ramas largas, de las cuales, a su vez, una vertical forma una horqueta similar. Así, el tronco delgado y largo parecía más bien un bejuco grueso, con nudosidades donde estaban las horquetas, y que trepaba apoyado en otros árboles, pero que no tenía diferencia sustancial con el hábito de crecimiento simpodial típico del cacao. Esto lo pudimos observar más claramente en ejemplares que crecían solitarios en los potreros, donde los colonos los habían respetado al cortar la selva. En estos árboles era fácil distinguir el tronco formado de ramas ortotrópicas, y en las horquetas las pocas ramas laterales que salen de ellas muy cercanas al tronco.

Este es evidentemente un cacao silvestre, como lo sugiere Miranda. Aunque la selva lacandona estuvo poblada extensamente por los Mayas, como lo comprueban las ruinas numerosas que se encuentran en ella, es posible que los indios de esta región, no necesariamente los Mayas, domesticaran el cacao a partir de una o varias de estas poblaciones silvestres. Hasta ahora, esto es más aceptable que suponer que el cultivo del cacao fuera traído de América del Sur, donde también se conoce silvestre, ya que la evidencia histórica y arqueológica prueba que el cultivo prehispánico del cacao se extendió desde el Sur de México hasta un área que corresponde aproximadamente con la frontera actual entre Costa Rica y Panamá (1, 3). Jorge León.

## REFERENCIAS

1. BERGMANN, J.F. 1969. The distribution of cacao cultivation in pre-Columbian America. Annals of the Association of American Geographers 59(6):85-96
2. CUATRECASAS, J. 1964. Cacao and its allies Contributions of the U.S. National Herbarium 35(6):375-614
3. LEÓN, J. 1959. Área de origen y dispersión inicial del cultivo del cacao. Actas de XXXIII Congreso Internacional de Americanistas 1:251-258.
4. MIRANDA, F. 1962. Cacao silvestre en la selva lacandona, Chiapas, México. Cacao (C.R.) 7(4):10-11.

## Notas y Comentarios

### La evolución por endosimbiosis: una mujer y su teoría

Al comentar, hace algún tiempo, que algunas transferencias de genes se habían descubierto en especies diferentes (Cf. Turrialba 36:548) y que esto estaba relacionado con otra herejía en la teoría evolucionaria, la evolución por endosimbiosis —sostenida hace años por una mujer, Lynn Margulis— dije que esta teoría estaba recibiendo confirmación en diversas investigaciones, principalmente, en la evidencia convincente de que los cloroplastos fueron, en un principio, bacterias independientes. Este es el relato ofrecido en aquella ocasión.

Durante casi 20 años, Lynn Margulis ha seguido la pista a una intuición básica suya que la ha conducido a una visión radical de los procesos evolucionarios. Esta corazonada consistía en colocar a la simbiosis en el centro de la evolución de plantas y animales. La más significativa diferencia en biología, sostiene ella, no es entre plantas y animales, sino entre organismos tales como las bacterias que no tienen un núcleo celular (los procariotas) y los organismos hechos de células en las que los cromosomas están sujetados por membranas nucleares (los eucariotas). Su tesis es que las células procariotas son las verdaderas unidades individuales de la biología. Los ladrillos de los organismos más altos, las células eucariotes —sostiene Margulis— comenzaron, en realidad, como comunidades de microbios. Las células eucariotes son comunidades hechas con vestigios de microbios.

Las primeras células eucariotas, sostiene Margulis, fueron formadas por encuentros simbióticos entre diferentes clases de bacterias. Estos encuentros formaron organismos compuestos que eran más "aptos" evolutivamente que los donadores ancestrales tomados separadamente.

Margulis comprende que su posición era herética. Conoce lo mucho que tropieza con la idea tradicional de la evolución, como resultado de la lucha entre diferentes clases de vida, cada una de las cuales puede trazar su ancestro hasta una única célula progenitora. En este libreto más convencional, una historia de la evolución por "filiazión directa", la simbiosis no juega ningún papel.

Sus estudios universitarios en Chicago la hicieron enamorarse de la genética; estando interesada en la evolución, creía que la genética era la ruta para estudiar el proceso profundamente. A la edad de 19 años, se casó con Carl Sagan, en 1957. Sagan era un estudiante graduado en astronomía, en Wisconsin. (Sagan después se hizo famoso con sus programas científicos

en la televisión). Margulis se enroló en un programa de maestría en la Universidad de Wisconsin, en Madison, teniendo como tutores a Hans Ris, Walter Plaut y James Crow. Allí encontró el fenómeno de la herencia no mendeliana, casos de transmisión genética que no podían explicarse por las reglas mendelianas, por las que cada progenitor hace una contribución igual a su prole. La importancia de estos casos que implicaban que los genes podrían también residir en el citoplasma, fuera del núcleo, a ella le parecía auto-evidente por lo que la sorprendió la relativa falta de interés de sus colegas. Recuerda que el distinguido genetista, Boris Ephrusi, le hizo un juego de palabras, diciéndole que había dos clases de genética, "nuclear and unclear" (nuclear y confusa). El mensaje era simple. Se suponía que los genes residían exclusivamente en los cromosomas, por lo que los fenómenos de herencia no mendeliana eran aberraciones inexplicables, sin razón para estudiarlos.

En 1960, con un grado de maestría y un hijo de un año, siguió a su marido a Berkeley y se enroló en el programa de doctorado en genética. Por ese tiempo, estaba segura de que la herencia no mendeliana implicaba la existencia de genes no-cromosómicos, o citoplasmáticos, genes que no eran parte de los cromosomas en el núcleo de la célula. Pero, en 1960, no se había identificado todavía ninguno de estos genes. Sus profesores trataron de guiarla a proyectos de investigación más convencionales.

La primera evidencia convincente sobre la presencia de DNA en orgánulos extracromosómicos, tales como mitocondrios y cloroplastos, provino del laboratorio de su profesor de Wisconsin, Hans Ris. En 1962, Ris y su colega Walter Plaut, publicaron unos micrográficos electrónicos que mostraban la presencia de DNA en los cloroplastos del alga *Chlamydomonas*. Estos cloroplastos eran también bastante parecidos a las algas azul verde. Ris concluyó que eso era plausible, por lo menos, para sugerir que los cloroplastos, que son elementos replicadores autónomos más generalmente conocidos como plastidios, habían comenzado con la incorporación simbiótica (endosimbiosis) de algas azules verdes, conocidas ahora como cianobacterias.

La idea era vieja, introducida ya desde 1893 en Alemania por Andreas Schimper y expandida en 1905 por K.C. Mereschkovsky en Rusia. Pero, era otra de las ideas que habían caído en descrédito con el afianzamiento de la genética moderna. La evidencia de Ris puede no haber parecido mucho, pero, ayudó a confirmar las opiniones de esos dos citólogos de vuelta del siglo, que Margulis ya había llegado a creer. El microscopio electrónico de Ris y la biología molecular de los novecientos sesenta hicieron ahora posible fijar la atención en la idea de la simbiosis.

Margulis decidió entonces dedicarse a la tarea de autenticar no sólo la interpretación de Ris sino la sugerencia, aún más audaz, de que la simbiosis intercelular con bacterias es una característica universal de las células vegetales y animales. Se propuso encontrar los orígenes bacterianos de la primera célula eucariota: sus plastidios, tales como los cloroplastos, y sus mitocondrios, las unidades citoplásmicas que proveen la energía. Margulis estaba determinada a comprender aún esa cualidad de la célula eucariota que es a la vez su más distintiva y enigmática característica: el procedimiento por el cual la célula reproduce su núcleo durante la división celular, conocida como mitosis.

Para efectuar esta ardua tarea, Margulis tuvo dificultades. Acababa de salir de la escuela de graduados, divorciada y con dos niños, sin ningún empleo universitario, y poco que perder. Tomó un trabajo en un proyecto de la Natural Science Fundation para desarrollar programas de ciencia en las escuelas elementales y dedicó todas sus horas libres a una investigación que produjo el primer artículo de esta etapa, "On the origin of the mitosing cells" (*J. Theor. Biol.*; 1967).

Su primer libro apareció en 1970 (*Origin of Eukaryotic Biology*, Yale Univ. Press). Para entonces, se había casado con N.T. Margulis y había sido nombrada profesora asistente de biología en la Universidad de Boston. Para esa época, había reunido evidencia en apoyo de la hipótesis de que tres clases de orgánulos, cloroplastos mitocondrios y centriolos (corpúsculos que se mueven a polos opuestos en la división mitótica), eran todos reliquias de lo que fueron una vez bacterias de vida independiente. Los cinetosomas, que forman la parte basal de los cilios, se consideran estructuralmente hermanos de los centriolos.

La historia que Margulis ha creado pieza por pieza, sugiere que las células eucariotas no emergieron simultáneamente sino como resultado de una serie de encuentros simbóticos. En el primer caso de encuentro, una célula hospedante, quizás parecida a la moderna bacteria *Thermoplasma*, fue atacada por una bacteria que respira (ella sugiere la bacteria *Bdellovibrio* como posible candidata). Con el tiempo, a algunas de éstas, ahora células duplex, se les unió un tercer socio, la cianobacteria fotosintetizadora. Los hospedantes sobrevivientes continuaron evolucionando en conjunción con sus nuevos asociados, produciendo células pre-eucariotas con mitocondrios y cloroplastos. Antes, tales células complejas habían formado fusiones simbóticas con bacterias de rápidos movimientos que llegaron a ser los progenitores de los centriolos. Candidatas para estos socios son las ubicuas y altamente móviles espiroquetas. Las nuevas células compuestas aprovecharon el aparato locomotor de estas veloces bacterias, primero, para sus propios mo-

vimientos en el agua y después, para movimientos dentro de las células. Eventualmente, las células reclutaron partes de las espiroquetas reproductivas para una función enteramente nueva. Las espiroquetas llegaron a jugar un papel crucial en la segregación de cromosomas (su movimiento a los polos de la célula), durante las divisiones celulares que conocemos como mitosis. Todavía más tarde, las espiroquetas estuvieron en el centro de la evolución de la meiosis, las divisiones celulares que forman las células sexuales. En su más reciente libro, *The origin of sex* (Yale, 1986), Margulis y su hijo Dorian Sagan sostienen que la adquisición de las espiroquetas está relacionada con el origen del sexo.

La historia continúa. La aceptación o confirmación de sus teorías está viniendo poco a poco. Se consideran como "probadas" el origen de los mitocondrios y cloroplastos. Todavía no hay mucho apoyo a sus ideas sobre el origen de la movilidad y la mitosis, pero, hay unos pocos descubrimientos que las han fortalecido, al estudiarse las proteínas de estos orgánulos. Pero, el progreso de aceptación de sus ideas, aunque lento, es visible con el pasar de estos años. Sus hallazgos, mucho de ellos en los pantanos cálidos de Baja California, en busca de indicios de bacterias primitivas, han dado resultados que confirman sus ideas. Estas están resumidas en tres libros recientes: *Five Kingdoms*, con la colaboración de K.V. Schwartz (W.H. Freeman, 1982), *Origin of Sex* (Yale U.P., 1986) y *Microcosmos* (Summit Books, New York, 1986), ambos escritos con Dorian Sagan, su hijo.

Sus ideas son ahora más respetadas y han estimulado investigaciones en paleontología y biología molecular. En 1983, fue elegida como miembro de la National Academy of Sciences, y se ha incrementado el número de estudiantes de posgrado que desean trabajar con ella. En 1980, la National Academy of Sciences celebró la primera conferencia interdisciplinaria sobre "Orígenes y Evolución de Orgánulos Intracelulares Eucariotas". Apoyada por un creciente número de colegas, una nueva Sociedad de Endocitobiología fue fundada en Alemania en 1983 y comenzó a publicar una revista. Como dice una comentarista, "Pocas ideas biológicas han atravesado tan decisivamente la brecha entre el ridículo y la respetabilidad como la evolución por endosimbiosis". Esta opinión es de Evelyn Fox Keller, del MIT, en Boston, autora de una biografía de otra mujer visionaria, Bárbara McClintock (Cf. Turrialba 33:420). Ella presenta la carrera intelectual de Margulis en un artículo en *New Scientist* (3-VIII-86, p. 46), mientras que Geoffrey Kite, en el mismo número (p. 50), desde el punto de vista de la biología molecular, examina en detalle la evidencia que hace irresistible, por lo menos, uno de los hilos de su teoría, que los cloroplastos fueron una vez bacterias libres.

La visión de Margulis ha crecido con la aceptación de sus ideas, abarcando campos cada vez más amplios —algunos creen que demasiado amplios— uniendo fuerzas con otro científico de gran visión, James Lovelock, químico atmosférico británico, creador de la “Hipótesis Gaia”, quien sostiene, en cierto sentido, que no es la Tierra la que sostiene a la Vida, sino que la Vida sostiene a la Tierra. Pero, este es un tema fuera de la biología celular que nos llevaría a campos como la astronomía y la geofísica, y que podemos dejar para otra ocasión, después de la reunión sobre el tema que tendrá lugar en San Diego, California, en 1989. A.G.†

#### El pastoreo ayuda a la conservación de la naturaleza

Después de haber excluido a los caballos, ganado vacuno y al búfalo de las reservas naturales, se está apreciando ahora que el pastoreo, después de todo puede no ser tan malo. En algunas reservas, se están introduciendo herbívoros de nuevo para ayudar a preservar una rica variedad de plantas. Los conservacionistas están invitando a los agricultores a enviar nuevamente sus animales a pastorear en reservas húmedas. Como dice un comentarista, los caballos silvestres están salvando a la conservación, en el borde mismo del abismo en que estaba cayendo.

Esta posición difiere de lo que ha preconizado, hasta ahora, la mayoría de las organizaciones nacionales e internacionales que consideran, con cierta razón, que los animales domésticos son un peligro para la vegetación natural, empobrecen la tierra y ahuyentan a los angulados silvestres (animales de pezuña) que han evolucionado con el ambiente natural. La ausencia de los animales domésticos puede permitir que regresen los angulados silvestres para restablecer su antiguo equilibrio en las plantas de la región. En teoría, esto está bien. Pero, la ausencia del ganado puede arruinar una reserva si los humanos han eliminado ya animales silvestres como elefantes y búfalos, que comen las plantas más toscas y ásperas, o los venados, que mantienen en raya a las plantas más tenaces. Hay varios ejemplos, ya sea en lugares tropicales o en zonas húmedas templadas, en que la eliminación del ganado ha creado problemas. Por eso es que la Unión para la Conservación de la Naturaleza (IUCN), en su reciente libro, *Managing Protected Areas in the Tropics*, califica una de sus conclusiones con la expresión “En la mayoría de los casos, el permitir el pastoreo por el ganado doméstico...”, lo que indica que ya reconoce que este principio, en algunos casos, no es aplicable.

Iain Gordon, del Macaulay Land Use Research Institute, en Penicuik, Midlothian, Escocia, y Patrick

Duncan, director de la Station Biologique de la Tour du Valat, Camargo, Francia, con quien trabajó Gordon hasta hace poco, han expuesto algunos de los casos más salientes en los que la eliminación de los mamíferos herbívoros, tanto silvestres como domésticos, ha puesto en peligro la vida natural de la zona (*New Scientist* 117(1604):54).

El ejemplo que más detallan es el de Camargo, un distrito del delta en las Bocas del Ródano, de cerca de 800 kilómetros cuadrados, una vez famoso por sus flamencos, es una de las áreas húmedas que han sobrevivido en Europa. En ese conjunto de pasturas de agua dulce y salobre, los animales determinan la estructura y composición de las comunidades vegetales. Cuando están ausentes o son escasos, los islotes de juncos predominan, así como los pájaros que habitan en esas cañas. Al pastar más ganado o caballos, se crean camas de totoras del tipo *Scirpus*, o espacios abiertos de agua que son ricos en plantas acuáticas subterráneas, ideales para que muchas aves acuáticas, como pequeñas garzas, *Egretta garzetta*, y miles de patos y de garzetas calvas, *Fulica atra*, vengan aquí a invernar.

El ejemplo más trágico es el del Keoladeo National Park, un World Heritage Site, en Paratpur, India, donde la población de aves ha declinado repentinamente. Para ella hay varias razones, pero, la expulsión del ganado parece ser la más importante. Koladeo es la última fortaleza para invernar de la grulla siberiana (su población occidental), *Grus leucogeranus*, siendo uno de los más importantes refugios de aves silvestres en Asia. En años recientes, las grullas han visitado el parque con menos frecuencia y las garzas, garzetas, grullas, cigüeñas y pelícanos, casi han desaparecido. En 1982, cuando Keoladeo fue creado, las autoridades del parque prohibieron el pastoreo por vacunos y búfalos acuáticos. La policía hindú se hizo presente para sacar a los pastores y en la lucha murieron ocho personas. Salim Alí, el fundador y padre de la conservación en la India, documentó lo brusco de la decisión y recomendó a las autoridades del parque reintroducir al mismo rebaños de búfalos para salvar al parque. Las autoridades hicieron caso omiso de esas advertencias; Alí murió hace poco sin ver ninguna medida para evitar el mal. El resultado ha sido que, desde 1982, el parque ha sido invadido por gramíneas acuáticas preferidas por los búfalos y los vacunos. Dos pastos, *Paspalum distichum* y *Vetiveria zizanioides*, han sido las más invasoras. Estas han reducido el área de agua abierta y por consiguiente, la vegetación sumergida que necesitan las aves acuáticas. Los peces que comen muchas de las aves, también han disminuido. El ideal, en lo que se refiere a la conservación, sería introducir herbívoros silvestres. En Europa, esto es imposible, porque las especies más grandes, los va-

cunos y caballos silvestres, se han extinguido. Algunas especies, como los venados, no son aconsejables porque tienen cierta debilidad por los campos de cultivos. De allí el valor de los herbívoros domésticos. Hasta ahora, han ayudado a conservar pastos en lugares húmedos en las partes bajas de Inglaterra, en los pantanos salados de Holanda y en los juncales y torales del Sur de Francia. En algunos lugares de Europa, particularmente en Holanda, está de moda introducir crías "ancestrales", animales que están cruzándose hacia atrás, para obtener características antiguas, para reconstruir el uro (*Bos primigenius*) de Europa, del que descienden los animales domésticos actuales (*Bos taurus*). Lo mismo se puede decir de los caballos antiguos, como los tarpanes (*Equus caballus gmelini*), el principal antecesor del caballo actual, que vivía antaño en estado salvaje en el Sur de Rusia y en las estepas de Asia Occidental, siendo extinguido en 1780. Los últimos descendientes directos de la especie se hallan hoy en Polonia, en el desierto de Gobi, además de los cruzados con el caballo Przewalski (*Equus przewalskii*), el único caballo verdaderamente salvaje que todavía sobrevive. Esas crías reconstruidas, sin embargo, a menudo sufren problemas de salud, por lo que es mejor usar crías más domésticas que se han adaptado a un ambiente particular.

Por eso, se prefieren los animales que, por criarse en lugares especiales, grandes y abiertos, como el toro de lidia español y el de la Camarga francesa, han conservado en gran medida el carácter del tipo ancestral. El toro de lidia, criado en zonas amplias y aisladas, se podría utilizar para que pastoree en los parques nacionales. Quizás esto podría ahuyentar a los cazadores furtivos que han existido desde los tiempos medievales, en que buscaban sus presas en los cotos del señor feudal.

Un ejemplo del uso de estos bovinos criados casi en libertad se está aplicando en ciertos lugares de Gran Bretaña, donde hay muchos lugares apartados, modos de cría y razas muy antiguas. En la Isla de Rhum, Reserva Nacional de las Nuevas Hébridas, la cual fue comprada por un organismo de conservación, fue dedicada a reproducir especies animales en vías de extinción. En estas ricas pasturas marítimas, con su fauna especial, Martin Bell encontró que, entre 1957 —fecha de la compra— y 1970, la riqueza y diversidad de su flora habían declinado dramáticamente, debido en especial a la disminuida presión del pastoreo y a la incapacidad de los ciervos rojos (*Cervus elaphus bactrianus*) de parar la invasión de dos pastos de grandes y espesas macollas, *Molinia caerulea* y *Nardus scriptus*. En consecuencia el Consejo de Vigilancia del parque decidió introducir un rebaño de vacunos de tierras altas, una de esas razas inglesas de pelos largos en la cara, en la parte sudeste de

la isla. Un reconocimiento botánico reciente muestra que el ganado ha invertido la pérdida de variedades de plantas al eliminar esas gramíneas dominantes. El ganado procedente de las alturas permanecerá en la isla para mantener este beneficioso régimen de pastoreo.

Hay ahora muchas reservas naturales en Europa en donde los herbívoros domésticos viven en armonía con la conservación de animales. Aún la mariposa azul grande, *Maculinea arion*, cuya extraña simbiosis con una hormiga fue interrumpida cuando se eliminaron las ovejas que pastaban en una determinada zona ecológica, desapareció de Inglaterra, ahora puede hacer su regreso con la ayuda de los animales de pastoreo. Los conservacionistas han liberado unas pocas azules grandes suecas y están usando ganado, caballitos enanos (ponies) y conejos para manejar el medio ambiente. A.G.†

#### Vacuna contra una garrapata del ganado vacuno

Investigadores en Australia han desarrollado la primera vacuna que se conoce contra la garrapata del ganado vacuno, *Boophilus microplus*, este parásito causa daños valorados en millones de dólares en los hatos de Australia y de América Latina.

Varios científicos del Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization (CSIRO), en Canberra, desarrollaron la vacuna junto con un equipo de la firma Biotechnology Australia, la compañía biotecnológica más grande de Australia. Se espera que la vacuna esté a la venta dentro de unos tres años, o sea, en 1992.

El equipo de investigadores ha identificado una proteína elaborada por el mismo ácaro, la que estimula una respuesta de inmunidad en el ganado. También, han aislado el gen que codifica la proteína. Los investigadores, dirigidos por Tony Johnston, de la División de Producción Animal Tropical, comenzaron a trabajar en el proyecto en 1980. En 1983, aislaron con éxito anticuerpos producidos por el ganado, los cuales atacan los intestinos de la garrapata cuando ésta se alimenta con la sangre de los vacunos.

Del estómago de la garrapata purificaron la proteína, o antígeno, que produce la reacción inmune en el ganado vacunado. El aislamiento de la proteína específica es un proceso de varias etapas, que empieza con moler y centrifugar los ácaros para extraer las glicoproteínas pegadas a sus membranas celulares. Estas son entonces terminadas de separar con un detergente, cromatografía y otros métodos de fraccionamiento. Peter Willasden, quien encabeza el equipo, es la persona que ha escrito el informe sobre los detalles de la labor realizada.

Cada experimento involucró entre 40 y 50 mil garrapatas, recogidas con pinzas, una a una, del cuero de las reses. El antígeno producido por estas garrapatas fue suficiente para vacunar solamente tres reses. Los investigadores estuvieron entonces en capacidad de estudiar la estructura de la proteína e identificar el gen de la garrapata que la codifica. El gen fue luego reproducido vegetativamente ("clonado"), en grandes cantidades, por Biotechnology Australia y usado para producir la vacuna antigarrapaticida.

Varios equipos de técnicos en diferentes partes del mundo, han tratado de crear una garrapata que desarrolle el sistema inmune en ganado y así, capturar una parte del mercado mundial que es potencialmente enorme. Solamente en Australia, una tercera parte del ganado está infestado con garrapatas, las cuales producen pérdidas de 150 millones de dólares australianos (A\$) al año. En la América Latina, la industria ganadera pierde más de mil millones de dólares australianos al año (1 US\$ = 1.13 A\$ en febrero de 1989). Las garrapatas son también responsables de la transmisión de otras enfermedades en Australia, incluyendo la babesiosis y anaplasmosis, dos formas ligeramente diferentes de fiebre, ambas trasmítidas por garrapatas.

El equipo investigador australiano está ahora tratando de desarrollar una vacuna similar para combatir las diferentes especies de garrapatas que infestan el ganado de África. El equipo espera tener una gran demanda comercial por las vacunas, lo cual significaría una reducción significativa en el nivel de plaguicidas usados actualmente en el control de las garrapatas. Estos plaguicidas tienen el inconveniente de dejar residuos tóxicos en el campo.

Señalamos, por último, que las técnicas empleadas por los científicos australianos son las mismas que desarrollaron los presentes ganadores del Premio Nobel de Fisiología y Medicina de 1988, las cuales ya hemos comentado en Turrialba. La tendencia es, por consiguiente, no crear medicinas al azar y probarlas primero con animales sino estudiar la composición íntima del núcleo del animal enfermo, del vector de la enfermedad y de los anticuerpos formados como respuesta por el organismo enfermo. La misma industria farmacéutica se ha dado cuenta de que esta ruta es la que se debe apoyar en sus inversiones. A. Gorbitz<sup>†</sup>

#### Algo más sobre los libros en rústica

Ahora que los libros de consulta y los diccionarios están prácticamente fuera del alcance de los investigadores latinoamericanos que quieren tener siempre algo a la mano y evitar viajar continuamente a las bibliotecas, es bueno recordar que hay siempre los "li-

bros de bolsillo", sobre los que he escrito comentarios en publicaciones del IICA

Entre ellos, destacan "The Fontana Dictionary of Modern Thought", comentado en Desarrollo Rural en las Américas (DRELA) 10:71 1978, el cual pone al día las encyclopedias, en cuanto a conceptos y términos más modernos, como "doble hélice" y "cibernética". Siguió luego "The pocket Economist", comentado en DRELA 16:150 1984, el que ha sido recientemente reimpresso con dos compañeros, "The pocket accountant" y "The pocket banker" publicados en rústica y en una caja de cartón para tenerlos juntos a la mano

Después, han seguido: el compañero biográfico del diccionario Fontana del pensamiento moderno y otros que he mencionado en publicaciones del IICA. Algunos, adquiridos como libros de bolsillo, a precios cómodos, incluyen diccionarios de medicina, de pintores (Art and artists) y de santos; este último nos abrió el santoral incluyendo a algunos que tienen importancia en la Europa no española (encontré dos santos Adalberto, uno de Magdeburgo y otro de Praga). Estos se sumaron a los libros de bolsillo adquiridos hace años, sobre geografía, geología, ecología, fitopatología, lo mismo que los "Thesaurus", diccionarios ideológicos que, en español, tienen sus equivalentes en las obras de Casares y de Martín Alonso, los que desgraciadamente no existen en ediciones baratas. Los "thesaurus" son valiosos en las traducciones porque presentan alternativas al agrupar cada vocablo con sus ideas afines.

Ahora que los precios de los libros han subido en todo el mundo, es bueno dar cuenta de algunos libros en rústica que han aparecido recientemente:

1. *The history of scurvy and vitamin C* que falla algo en su título Una lástima, porque este libro de Kenneth Carpenter (Cambridge UP, 288 p), es un aparente relato del "látigo del mar", el escorbuto, que hizo tan llenos de peligros a los viajes largos que hicieron los grandes navegantes del Renacimiento y cuya resolución tuvo una gran importancia para la agricultura mundial. Las teorías sobre su causa fueron muchas, duraron mucho y eran erróneas, a pesar de que, desde los primeros viajes de descubrimiento, se observó que los limones, naranjas y frutas frescas lo curaban, al parecer, milagrosamente. Los personajes en la historia van desde Vasco de Gama hasta el Capitán Scott

La obra fue reseñada, en su edición original, mucho más cara, en Turrialba (vol. 37, p. 273), por Dennis Pules

La enfermedad no fue desconocida ni lo es, en tierra firme. Apareció en California, durante la fiebre del oro y en los años ochocientos ochenta, en niños que eran alimentados con sustitutos de la leche materna. El descubrimiento de la vitamina C es uno de esos esfuerzos que se leen como una novela policial. El autor es imparcial sobre las ideas de Linus Paulig, el científico que ganó el premio Nobel de Química de 1954, y de la Paz en 1962, de que la vitamina C, en dosis masivas, controla el resfriado común, la esquizofrenia y algunas formas de cáncer.

2. *Why big fierce animals are rare* (Pelican, 224 p) es otro título que le hace un flaco servicio al libro, aunque hace mucho más fácil el trabajo del diseñador de la portada. Paul Collinvax es un amable y entretenido conversador con el lector. Va mucho más allá de lo que se deduciría del título de su colección de ensayos; por ejemplo, hay una excelente y reconfortante narración sobre el dióxido de carbono en la atmósfera. La voz en el cerebro del lector es la de un amigo, culto y sin pretensiones didácticas, que le hace sentir a uno la complejidad de la vida en la Tierra y su preciosidad.

3. Al parecer, uno puede percibir algo del sentimiento que sintió el Duque de Gloucester cuando Edward Gibbon le envió su libro sobre la caída del imperio romano: "Otro condenado libro gordo y cuadrado", al aparecer sorpresivamente *The making of the atomic bomb* (Penguin, 886 p.), de Richard Rhodes. Se podría pensar que ya hay muchos libros sobre el nacimiento de la bomba y su uso en ciudades japonesas. Más inquietud puede seguir al quedar claro, desde la primera página, de que nada iba a quedar callado y que se iba a discutir cada detalle y personalidad de los individuos involucrados.

A pesar de esto, el libro resulta una lectura fascinante y tentadora, como una novela policial, lo que parcialmente es el producto de una laboriosidad verdaderamente espectacular. Con este libro en nuestra biblioteca, uno posee todo lo que puede desear saber sobre el tema y mucho más... por ejemplo, el tamaño del pecho de Einstein. Hay un diagrama de las principales características de la primera bomba nuclear. Su simplicidad de construcción presenta un

extraordinario contraste con la ardua investigación que se necesitó para conseguirla y a la controversia política y moral en que la humanidad ha estado desde que se le dejó caer. Rhodes revela cada paso de la ruta en que maniobramos todos, hasta el borde de la extinción.

4. Otro libro que ha aparecido recientemente es "Great experiments in physics", editado por Morris Shamus, (Constable, 1988, 370 p), un fascinante libro que todo científico y profesor debería tener a la mano, pues están allí todos los grandes científicos, desde Galileo y Newton hasta Einstein y Rutherford. Escrito en lenguaje sencillo y con abundantes notas marginales, su lectura es bastante iluminadora. Por su originalidad, me remito a la reseña que sobre esta edición ha hecho Michael Rowan-Robinson, del Queen Mary College, de Londres, y que estamos publicando en *Turrialba*. Lo original de esta reseña es su afán polémico de resaltar los obstáculos que tuvieron que afrontar los grandes creadores de la física, desde Galileo, quien tuvo que renegar de algunas de sus ideas o pena de excomunión (y de lo que esto significaba en esa época), hasta Einstein, sobre las hipótesis cuánticas de Planck. Rowan-Robinson ha tenido la paciencia de buscar en viejos archivos y localizar los manuscritos de revisores y de la constante oposición que se ha ejercido, hasta nuestros días, a las nuevas ideas científicas. Creemos útil dejar que sea el propio Rowan-Robinson quien presente esos interesantes entretelones sobre la publicación de trabajos científicos.

5. Stephen Jay Gould, en su libro "Time's arrow, time's cycle" (Pelican, 222p), expresa que la génesis del libro descansa en el mismo conflicto e interacción de metáforas (flechas de historia y ciclos de immanencia) que inflamaron el descubrimiento de un tiempo profundo en la geología. Así, uno debe saber que está ante un escrito que exige atención. En un nivel, está la historia del descubrimiento de que la Tierra tiene millones de años de edad y no la edad de los cándidos cálculos de la Biblia. En otro nivel, es una discusión de ideas de tiempo, lineal o cíclico. Como dice también el autor, ambos o ninguno puede ser cierto. Después de acabar el libro, uno se queda pensando y comienza de nuevo a leerlo. El estímulo para hacer esto es innegable. Adalberto Gorbitz. †

### A NUESTROS LECTORES

El día 19 de agosto de 1989 falleció en San José, Costa Rica, el ingeniero agrónomo Adalberto Gorbitz Russo, de nacionalidad peruana, quien fuera editor de la revista *Turrialba* en el período 1960 a 1980. En esas dos décadas, don Adalberto le dio prestigio internacional a nuestra revista, colocándola entre las primeras del mundo y, muy posiblemente, en el primer lugar en América Latina.

Al retirarse en 1980, los directores del IICA lo designaron como miembro del personal emérito de la institución (18 de julio de 1980) y también lo declararon Editor Emérito de la revista *Turrialba*, a la cual dedicara tantos esfuerzos en los anteriores veinte años. Desde entonces, fue asiduo colaborador de esta publicación; su principal aportación la hizo precisamente en la sección Notas y Comentarios. Las notas que se publican en este número de *Turrialba* fueron las últimas que escribiera el ingeniero Gorbitz. A pesar de que sus fuerzas físicas ya estaban muy disminuidas, su vigor mental y su constante deseo de colaborar a su querida revista estaban en la mejor forma; estas notas reflejan su erudición, capacidad de análisis y fino humor. M.G.J.

### Reseña de Libros

**FINKEL, H.J.** 1986. *Semiarid soil and water conservation*. USA. CRC Press Inc. Boca Raton. 126 p.

En las regiones semiáridas, la conservación del agua es más importante todavía que en aquellas con mayor disponibilidad de este esencial elemento. Amplias áreas semiáridas son utilizadas para labores agrícolas en diferentes partes del mundo, incluyendo a la Región de América Latina. Esta publicación, escrita por un experto, con décadas de experiencia en este campo —especialmente en el Mediterráneo— puede ser de gran utilidad para estas regiones.

Después del primer capítulo de tipo introductorio un segundo capítulo, el más amplio del volumen que analiza la hidrología de estas regiones con una amplia discusión de sus características meteorológicas. Se aprovecha la amplia información sobre una cuenca hidrográfica localizada en Israel para usarla como ejemplo ilustrativo de los métodos que se recomiendan cuando existen estas condiciones.

En el tercer capítulo se analizan los procesos de erosión de suelos en condiciones semiáridas. El capítulo es de enfoque práctico, sugiriendo fórmulas para hacer cálculos.

Las medidas agronómicas adecuadas para la conservación de suelo y el agua se discuten en el cuarto capítulo. Se consideran aquí diferentes métodos de cultivo, la aplicación de coberturas vegetales y otras formas de conservación del suelo.

En el quinto capítulo se analizan las prácticas de manejo de pastos y bosques, en las tierras altas del Mediterráneo. Se discuten las particularidades ecológicas de este medio y se sugieren técnicas de uso acordes con el mismo. Este capítulo tiene la bibliografía más completa del texto, con 50 referencias.

El capítulo sexto discute las obras de ingeniería que son necesarias, después que se han tomado las medidas agronómicas más sencillas y menos costosas. El autor, acertadamente, insiste en que para que sean eficientes, las instalaciones de ingeniería deben seguir adecuadas medidas agronómicas. Se discuten técnicas para establecer diferentes formas de canales y zanjas de diversión.

En el capítulo séptimo, se estudia la construcción de terrazas y de bancas en estas condiciones ecológicas, prefiriendo las terrazas de tipo de absorción, para aprovechar mejor el agua escasa.

El capítulo octavo se refiere a la recuperación de agua y las medidas de ingeniería que son necesarias para este propósito. Se discuten los principios de diseño, las técnicas para recuperar agua y el aprovechamiento de las corrientes temporales que existen.

En el noveno capítulo se examina en forma breve el control de cárcavas.

El último capítulo se dedica a la erosión aeólica, la cual es considerada como una de las amenazas mayores de la agricultura en la región mediterránea. Este proceso, se estudia con algún detalle, así como los factores de suelo que lo afectan y algunas prácticas que lo reducen.

El volumen concluye con un índice de materias.

Este libro es una introducción rápida a estos problemas. Para su pleno aprovechamiento, se requiere tener algunos conocimientos básicos de ingeniería agrícola. Es una obra práctica, que refleja muchos años de experiencia del autor, particularmente en condiciones similares al área del Mediterráneo, que ocurren en zonas bastante expandidas de América

Latina. El volumen se recomienda para aquellas personas que estudian o manejan suelos en regiones semiáridas del mundo.

ELEMER BORNEMISZA  
UNIVERSIDAD DE COSTA RICA

**COMPENDIO DE Agronomía Tropical.** Ed. por el Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura; Ministerio de Asuntos Extranjeros de Francia. San José, C.R., IICA. Tomo 2, 693 p. (Colección Investigación y Desarrollo no. 13).

Hace cuatro años se publicó el Tomo I de esta interesante obra, que el IICA y el Ministerio de Asuntos Exteriores de Francia han hecho posible en un esfuerzo conjunto.

Se trata de una traducción y adaptación del "Mémento de l'agronome", publicado por el Ministerio de Cooperación del gobierno francés y que constituye un vademécum para el agricultor o el estudioso de agricultura tropical.

La intención original era la de publicarlos en tres volúmenes, pero finalmente la obra se ha completado con este volumen o Tomo II.

El primer tomo cubrió una gran variedad de temas: economía agrícola, estadística, informática, contabilidad, teledetección, agrometeorología, topografía, suelos, riego, maquinaria y construcciones rurales.

En este segundo tomo se incluyen casi todos los cultivos alimenticios tropicales, varios cultivos industriales, y especias. También se incluyen algunos temas generales como son la fertilización y la producción vegetal, y algo sobre cálculos y unidades para la producción agrícola.

Una obra de esta naturaleza no puede ser el trabajo de una sola persona. Han trabajado en ella muchos técnicos, y en la traducción y adaptación también colaboraron muchos otros. Pero lo interesante es precisamente que, a pesar de eso, el libro tiene unidad y uniformidad, es homogéneo. Usa un lenguaje fácil y comprensible. Desde luego, a veces se utilizan términos que suenan raros para el entendido. Por ejemplo, se usa el término "producción vegetal" cuando en realidad se hace referencia a la "reproducción vegetal". Se le llama "organismos especializados" a las semillas, estacas y otras partes reproductivas de las plantas. Por cierto, se usa la palabra "sierpe" que, aunque se refiere correctamente a los vástagos que brotan de las raíces, no es una palabra muy usada con ese sentido en América Tropical. Hay otras pequeñas cosas que no son de mucha importancia; por ejemplo, se dice que

la "caballería" en Guatemala equivale a 64 hectáreas, cuando en realidad son 64 manzanas. A la "vara" se le asignan 0.836 cm cuando en realidad son 0.836 metros. Se usa la expresión "pesos y medidas" cuando corrientemente en el campo se habla de "pesas y medidas".

Pero estos detalles no le restan ningún valor a la obra, pues el corazón de este volumen lo constituye la descripción de una larga lista de cultivos tropicales.

Para cada cultivo, en forma sintetizada, se da el nombre científico o botánico, los nombres comunes más conocidos, los propósitos del cultivo, las variedades que se conocen, las condiciones ecológicas que requiere, la manera de manejarlo, la forma de cosecharlo, las plagas y enfermedades conocidas. Desde luego, la extensión o tratamiento que se da a esa información varía con el cultivo. Por ejemplo, la piña se describe en 13 páginas, mientras que todo lo que se puede decir sobre nance ocupa una página.

Para cada cultivo se ofrece una ilustración o dibujo y aquí debe decirse que en la gran mayoría los dibujos que se utilizan han sido facilitados por el Dr. Jorge León, de su obra *Botánica de Cultivos Tropicales* (1987, IICA). Estas ilustraciones enriquecen notablemente el libro.

Los cultivos se agruparon en cultivos alimenticios (alimentos básicos, hortalizas y vegetales), cultivo de frutales, cultivos industriales y cultivo de especias. Son cerca de 135 cultivos que se han incluido apretadamente en un libro de casi 700 páginas. Esto incluye un índice de materias y un listado de cuadros y figuras, todos muy útiles.

Al sacar esta publicación, el IICA está haciendo una contribución muy valiosa para el hombre de campo, el estudiante y el agrónomo, que ahora cuenta con una obra de consulta rápida en donde encontrará lo más elemental sobre las dudas que puedan surgirle. La impresión es nítida, bien hecha y cuidadosa. El papel usado pudo haber sido más grueso y evitar así cierta transparencia que se nota en algunos momentos.

Aparentemente con este tomo se termina la obra. El tercer tomo iba a tratar el desarrollo pecuario y los aspectos económicos de las explotaciones de animales, pero una traducción al español ya no verá la luz pública, al menos por el momento.

CARLOS E. FERNANDEZ  
IICA - SEDE CENTRAL

**BURGER, A.** 1985. *Food economics*. Akadémiai Kiado, Budapest, Hungría.

Me permito hacer un breve análisis de los diecinueve capítulos del libro escrito por la Profesora Burger, de nacionalidad húngara. Cada capítulo es brevemente analizado por separado.

#### Capítulo I

Apreciaciones sobre la situación mundial óptica realista y algunos tonos ideológicos. Pareciera haber convergencia en los problemas y lo más curioso, en las soluciones. Apoyo implícito a los conceptos de economía de escala y eficiencia productiva y administrativa.

#### Capítulo II

Conceptos muy conocidos, algunos un tanto obsoletos, pero interesantes de recordar. Debido a su sistema de economía centralmente planificada, recogen y mantienen un buen número de datos agregados por el sistema, que son a veces de utilidad.

#### Capítulo III

Mantiene importancia en el desarrollo industrial y en conceptos de modelos, algunos de los cuales ya han sido objetados en las economías occidentales. Dentro del esquema político del autor, sus observaciones sobre desarrollo económico son interesantes, pero muy poco novedosas. Las reflexiones sobre la mano de obra nos agradaron. A la luz de lo que ocurre en el bloque occidental los problemas de organización y manejo de la producción son tan importantes y se soslayan.

#### Capítulo IV

Revisión breve de los modelos de Desarrollo de Max Keynes, Harrod y Domar, Kalecki, Kaldor y Leontief muy breve para ser útil, también Cobb-Douglas. Podría haberse eliminado totalmente.

#### Capítulo V

Me recuerda los viejos trabajos de Johnson y Meillar sobre el papel de la agricultura en el desarrollo. Nada original, con algunas interpretaciones, dentro de la doctrina de la autora; no merece ser un capítulo.

#### Capítulos VI, VII, VIII y IX

Estos capítulos son el corazón del libro, el tratamiento de la inversión, capital, mano de obra y tierra es claro, conciso uno puede discrepar del enfoque, pe-

ro es un tratamiento profesional y nos gusta mucho. Hay una gran cantidad de riqueza metodológica en ellos que, desde el punto de vista didáctico, pueden ser útiles a cualquier profesor de economía agrícola.

#### Capítulo X

Muy buen resumen pero muy corto; podría haber explicado más los aspectos de sustitución y combinación entre factores. En este caso, los ingredientes son mejores que el producto final.

#### Capítulo XI

Buen capítulo, pero muy corto, sobre los criterios básicos de la planeación. La sección última sobre planes agropecuarios es totalmente insuficiente en detalle y profundidad. Debería ampliarse.

#### Capítulo XII

Sobre política de precios es sorprendente hace tiempo que no habíamos leído un tratamiento tan sensato y equilibrado de los problemas de los precios planificados. Este deberá ser un capítulo requerido a todo economista que no crea en la validez del mercado y de la oferta y demanda.

#### Capítulos XIII a XVI

Sobre política fiscal, crédito, oferta y demanda, nos parecieron débiles; algunos los de política fiscal y crédito, excesivamente cortos e irrelevantes. Los de oferta y demanda son una síntesis, quizás no muy exitosa de capítulos semejantes en cualquier libro de texto de microeconomía.

#### Capítulos XVII, XVIII y XIX

Se refieren a condiciones netamente húngaras y sus adaptaciones de algunas ideas occidentales. Desafortunadamente, el tratamiento es demasiado corto para ser útil.

En resumen, se podría decir que el libro es un buen documento que condensa la experiencia de la Profesora Burger, o sea, que hace honor al objetivo del libro en el prefacio. Tiene capítulos brillantes y otros que requieren mucho trabajo de pulimento.

En general, lo más agradable del libro es constatar que el mercado, aún en Hungría, es un excelente mecanismo regulador y racionalizador; sin duda alguna, que lo diga ella, tiene más mérito que si lo decimos los que creemos en él.

JUAN ANTONIO AGUIRRE  
IICA-OFCINA EN HONDURAS

**PANDEY, R.K.** A farmer's primer on growing soybean on rice land. International Rice Research Institute and International Institute of Tropical Agriculture.

Este libro tiene un título muy apto porque, más que un libro técnico, es una guía para agricultores. Cada página tiene un dibujo en blanco y negro para ilustrar un concepto. El texto es mínimo y no entra en un ningún tema con profundidad. Se trata de un libro para extensionistas o agricultores semianalfabetos.

Desafortunadamente, las prácticas ilustradas relacionan el cultivo de soya en forma muy general y no se enfocan los problemas específicos de sembrar soya después de arroz, lo cual es un aspecto de manejo de gran importancia y dificultad. No se hace mención a ciertos problemas, como producir soya en terrenos mal drenados, en suelos pesados, donde habrá problemas de toxicidad de hierro y de manganeso. En verdad, es simplemente una guía para cultivar la soya. Por lo tanto, este libro debe ser de poco interés para científicos, agricultores y extensionistas en América Latina, en donde el cultivo de soya es más mecanizado que en Asia. Los problemas de interés científico, relacionados con la adaptación de soya a terrenos mal drenados, casi no son mencionados.

DONALD KASS  
CATIE, TURRIALBA

**PROCEEDINGS OF THE INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON RED SOILS. 1986.** Editado por el Instituto de la Ciencia del Suelo de la Academia Sinica, Beijing, China. 785 p.

Este volumen presenta 33 trabajos sobre suelos rojos de los trópicos y subtrópicos, preparados por científicos chinos, quienes, hace más de treinta años, examinaron los suelos del sur del país y de unos veinte investigadores invitados.

Los trabajos se presentan en tres partes que se dedican a la génesis y clasificación de estos suelos, a sus propiedades y a su manejo.

La primera parte incluye 10 trabajos entre los cuales se resalta uno de Buol y Sánchez sobre los suelos rojos de las Américas, otro de Cochrane sobre los suelos rojos inorgánicos en las Américas, seguido por uno sobre Oxisoles de Eswaran *et al* y otro de Van Wambeke sobre el uso de los datos de clima del suelo, en taxonomía de los suelos de los trópicos.

La segunda parte también incluye 10 trabajos de los cuales siete se realizaron con los suelos de China.

Los trabajos de enfoque general se refieren a la retención de cationes de los suelos rojos de los trópicos, con las cargas superficiales de estos suelos y al efecto de la materia orgánica en ellos.

Todos los trabajos presentan bibliografías que incluyen mucha información únicamente presentada en idioma chino y por lo tanto, poco accesible a los investigadores de otros países.

La tercera parte está dedicada al manejo de suelos y es la más extensiva; tiene 13 trabajos, de los cuales cinco fueron preparados por expertos internacionales. Los dos primeros tratan sobre los abonos nitrogenados y fosfóricos para los suelos tropicales y son de gran interés para los lectores de América Latina, así como el trabajo de Lal sobre el manejo de la superficie del suelo para la conservación de agua y el control de erosión. También es de considerable interés el trabajo de Miyake sobre caracterización y manejo de suelos rojos, con ejemplos de Brasil y de Tailandia.

El volumen finaliza con la descripción detallada de 17 sitios y sus suelos; esos sitios fueron visitados en una excursión posterior a la celebración del Simposio

Este volumen es una buena contribución a la bibliografía sobre suelos tropicales presentando aspectos generales útiles así como una introducción a los suelos del sur de China, los cuales son muy poco conocidos fuera de este país. Se recomienda la obra a los interesados en el estudio de Oxisoles y de Ultisoles.

ELLMER BORNEMISZA  
UNIVERSIDAD DE COSTA RICA

**PUIG, H.; BRACHO, R.** 1987. Instituto de Ecología, México, D.F. 1986 p.

El estudio del bosque mesófilo de montaña, en el Estado de Tamaulipas, México, es una contribución al conocimiento de un ecosistema seriamente amenazado por la tala indiscriminada de sus árboles. Afortunadamente, en la región de Gómez Farias, aún quedan algunos relictos de vegetación que no ha sido muy intervenida, debido, principalmente, a la inaccesibilidad de las áreas boscosas y a la poca presión demográfica. La región estudiada comprende una extensión aproximada de 144 000 hectáreas. Los estudios realizados incluyen temas relacionados con la estructura y composición florística, productividad, fenología, estrategias de regeneración y formación de claros en la vegetación primaria. En particular, se ha obtenido información sobre la influencia de la temperatura y la

luz en las primeras etapas de crecimiento de un arbusto que crece en el sotobosque, *Hoffmannia strigillosa* Hemsl, de la familia de las rubiáceas

Los tres primeros capítulos se refieren a las generalidades de la región de Gómez Farias, localización, edafología y clima. El capítulo cuarto está dedicado al bosque mesófilo de montaña, tema principal del estudio, el cual se ubica entre los 800 y 1 400 metros sobre el nivel del mar. Se trata de un bosque mixto, con cuatro estratos y que se caracteriza por la presencia de especies como *Liquidambar styraciflua*, *Quercus sartorii* y *G. germana*, *Clethra pringlei*, *Magnolia schiedeana*, *Podocarpus reichei*, *Cercis canadensis* y *Acer skutchii*.

En el capítulo quinto se muestran los resultados de dos años de estudio sobre la fenología y dinámica de la producción de hojarasca de las ocho especies arbóreas seleccionadas y su contribución relativa a la comunidad vegetal.

Los capítulos sexto y séptimo se relacionan con el estudio de la regeneración natural del bosque y las perturbaciones naturales por la caída de los árboles. La información que suministran estos dos capítulos es importante y básica para un manejo adecuado del bosque mesófilo de montaña.

El último capítulo, en forma detallada, hace referencia a la influencia de la temperatura y la intensidad lumínosa en la germinación de la especie *Hoffmannia strigillosa*, un arbusto de la familia de las rubiáceas que crece en el sotobosque de la región estudiada.

ELMO MONTENERO  
SAN JOSE, COSTA RICA

FASSBENDER, H.W.; BORNEMISZA, E. 1987. Química de suelos con énfasis en suelos de América Latina. 2 ed. rev. IICA, C.R. Colección Libros y Materiales Educativos no. 81. 420 p.

El Servicio Editorial del IICA, en su rol de promotor del desarrollo agrícola de las Américas; recientemente ha publicado la obra titulada Química de Suelos de los autores Fassbender y Bornemisza, dos profesores con profundo dominio en la materia y que son ampliamente conocidos en el mundo científico latinoamericano.

Este libro es una versión completa de la primera edición. Sus 420 páginas se dividen en 12 capítulos muy bien estructurados; al final de cada uno de ellos se presenta un breve resumen y las respectivas referencias bibliográficas actualizadas que sustentan el

contenido; en esta forma el libro es fácil de leer e invita al lector a profundizar su conocimiento en cualquier tema de su interés particular. El libro no es sólo sobre Química de Suelos; es la aplicación de la química a la fertilidad y al manejo de los suelos.

En el Capítulo 1 se discuten los componentes inorgánicos, partiendo de la composición química de la roca; se establece relación con la composición química del suelo y desde la edafización de los materiales primarios va hacia la transformación en minerales secundarios, tanto cristalinos como amorfos. El lector no podrá profundizar ni en la química de las arcillas ni en su identificación. Tampoco, en la química de los Andisols por haber sido este nuevo orden recientemente establecido (1986).

En el Capítulo 2 se discuten los componentes orgánicos y organominerales de la fase sólida del suelo y se relacionan los procesos de mineralización y humificación. La presentación de los diseños de los núcleos y compuestos orgánicos hacen que tales fenómenos sean comprensibles. Se demuestra la gran variabilidad del contenido de materia orgánica en los diversos ecosistemas; por consiguiente, la interpretación cuantitativa también es local. Una contribución muy positiva es la relación C/N con el pH; esto abre la posibilidad de establecer conclusiones entre el contenido de materia orgánica con los grandes grupos de suelos y señala pautas para el manejo de la materia orgánica en los diversos sistemas de producción.

El Capítulo 3 aporta información sobre las fases líquida y gaseosa del suelo y se discute la dinámica del equilibrio. Se ilustra el potencial redox Eh, teóricamente y como innovación, su desplazamiento por la electronegatividad pe y establece relación con el pH. Lleva a una aplicación el Eh en suelos agrícolas húmedos, concepción de interés para determinar la utilización de las tierras húmedas en relación a los cultivos.

El Capítulo 4 presenta con claridad uno de los temas más difíciles de explicar: los procesos del intercambio iónico a pesar de la complejidad de los fenómenos y de las complejas reacciones, particularmente en suelos con cargas variables. Se analizan las isotermas y fenómenos de adsorción y sus expresiones matemáticas. Se discute el intercambio iónico en Andosols y se encuentra que hay dependencia del pH. Un valioso aporte es la relación de la capacidad de Carga Zero con la lixiviación de nutrientes, demostrando el manejo de esta propiedad para mantener la fertilidad y cuán importante es el proceso de cambio y de adsorción específica de aniones en la fertilidad.

El Capítulo 5 discute conceptos actualizados sobre la reacción del suelo. Demuestra el efecto acidificante

de ciertos fertilizantes en regiones tropicales. Fundamenta el por qué del pH en agua, en KCl N y en Ca Cl<sub>2</sub> 0.01 M y los factores que afectan la medición. Al discutir el encalado de los suelos en ambientes tropicales recomienda hacerlo con base en el Al-intercambiable.

En el Capítulo 6 se discute la gran extensión que ocupan los suelos salinos y sódicos, y se muestra el proceso activo de desertificación. Se ilustra la caracterización de los suelos afectados por sales y los procedimientos de recuperación.

Se podría considerar una segunda parte del libro del Capítulo 7 al 12; se establecen en cada uno de ellos relaciones entre química y fertilidad de los macro y micronutrientos. Se analiza el ciclo geoquímico del nitrógeno, fósforo y potasio: los contenidos y formas como se encuentran en los suelos; el ciclo de cada uno de ellos en el suelo; el ciclo de ellos en ecosistemas tropicales de América Latina; la relación del nitrógeno y potasio en sistemas de producción; las transformaciones de fertilizantes nitrogenados y potásicos y sus reacciones en el suelo. Sobre el calcio y magnesio se analiza el ciclo geoquímico; su contenido en los suelos así como el del azufre, contenido y formas existentes en suelos tropicales y procesos dinámicos de transformación.

Se ratifica que el contenido de nitrógeno en suelos derivados de materiales volcánicos es generalmente más alto que en otros, debido a la formación de organominerales que impiden la mineralización. Es ilustrativa la relación simbiótica del nitrógeno y el ciclo de nitrógeno en ecosistemas pluviales y de sabanas; el efecto del fuego sobre el nitrógeno de los restos vegetales; en el sistema de producción agrícola, en los sistemas de producción forestal y se discute las interacciones NPK.

Se da a conocer la potencialidad de fosfatos que tiene América Latina; se interpreta las relaciones del fósforo entre el suelo y la planta. Se discute el ciclo del fósforo en ecosistemas forestales y en diversos sistemas de producción; se analiza la eficiencia y el manejo de fertilizantes fosfatados y algunos resultados experimentales obtenidos con estos materiales.

Se demuestra que el contenido de potasio en los suelos está relacionado con su fuente de origen (feldespatos y micas). Se indica que las formas disponibles del potasio pueden estudiarse con parámetros físicoquímicos de intensidad y de capacidad, estableciéndose relaciones suelo-planta. Se explica la fijación y pérdidas y se pone énfasis en el ciclo del potasio en ecosistemas tropicales y en sistemas de producción, el

efecto de la tala y la quema sobre las bases del suelo y las transformaciones de los fertilizantes potásicos y sus reacciones en el suelo.

Se relaciona el contenido de azufre con el origen y evolución de los suelos, la correlación del S-total y el S orgánico. Para la caracterización del S orgánico se emplea la relación C/N/S-orgánico y que el valor para C/S es similar del C/P; generalmente, éste es de 100 a 200. Se demuestra que la dinámica de transformación y mineralización del azufre es similar a la del nitrógeno y se explica la oxidación y la reducción y el movimiento y la absorción.

Se demuestra que el contenido del calcio y magnesio depende del material originario y del grado de meteorización. Se explican las pérdidas de ambos elementos en los trópicos y su similaridad con el ciclo del potasio, pero sin que haya fijación. Se ilustra el equilibrio entre las formas de calcio y magnesio y su importancia como correctores de acidez del suelo.

Se discuten, en forma conjunta, los elementos menores u oligoelementos B, Cl, Cu, Fe, Mn, Mo y Zn; se demuestra que su contenido en el suelo es independiente de los materiales originarios y que cuanto más evolucionado sea un suelo acusa más deficiencias. El B, Mo y Cl se presentan como aniones y el Cu, Zn, Mn y Fe como cationes. Un diagrama ilustra los procesos reguladores de las transformaciones de los oligoelementos catiónicos en el suelo y se demuestra el oligoelemento cambiante en relación al pH del suelo.

No se ha demostrado la esencialidad de Co, I, Se, pero se señala cuán importantes son estos elementos en la nutrición animal.

En forma gráfica se ilustran los principales factores que afectan la contaminación de los suelos y de plantas y los fenómenos que influyen sobre una sustancia contaminante.

AMARO ZAVALET  
PRMC-CATIE, COSTA RICA

VANE-WRIGHT, R.I.; ACKERY, P.R. 1985. *The biology of butterflies*. London, Academic Press, 429 p. (Symposium of the Royal Entomological Society, no. 11).

Para alguien no especializado en entomología, esta serie de publicaciones de la Royal Entomological Society, iniciada en 1961, es impresionante por presentar un cúmulo de investigaciones, en todas partes del mundo, y en diversos aspectos de la ciencia, a lo que se suma el gran volumen de trabajos que aparecen

en las revistas científicas, generales o especializadas. Cabe anotar, además, que en los últimos años ha crecido el énfasis hacia el comportamiento de los insectos, a diferencia de las diez reuniones anteriores, en las que predominaban temas como polimorfismo de los insectos (1961), reproducción (1964), abundancia (1968), ultraestructura (1970), relaciones insecto-planta (1973), vuelo (1976), desarrollo (1976), diversidad (1978), y citogenética (1980).

En 1984, las dos reuniones fueron, una sobre la biología de las mariposas (la primera dedicada a un solo orden de insectos), contenida en este volumen, y otra sobre comunicación en los insectos, la que apareció en otro volumen. Teniendo en cuenta que el volumen que comentamos contiene muchos trabajos sobre comportamiento, esto refleja el crecimiento de las investigaciones sobre costumbres y peculiaridades de la vida animal, las que para la Royal Entomological Society tuvieron un antecedente en la tercera reunión (1966), que trató precisamente sobre el comportamiento de los insectos.

La "etología", término creado por los ecólogos para el estudio comparativo del comportamiento (*behaviour*), como aparece desde hace tiempo en los diccionarios de ecología y en los diccionarios de idioma de Oxford, fue considerada como un inocente y divertido entretenimiento de algunos científicos, sin ser considerado como importante por el grueso de la comunidad científica. Recordemos que von Frisch, uno de los fundadores de la etología, tuvo que abandonar su trabajo en la Universidad de Munich por una violenta discusión con el Director de la Clínica de la Vista, sobre la capacidad de los animales invertebrados y los peces de percibir el color. A Konrad Lorenz se le ridiculizó por sostener que la sicología animal era fijada genéticamente, ya fuese adquirida o innata. Con los años, esa oposición cambió conforme se publicaban los resultados de las investigaciones, lo que culminó con el espaldarazo que recibió la etología al concederse el premio Nobel de Medicina y Fisiología de 1973, a Karl von Frisch, a Konrad Lorenz y a Jan Tinbergen.

El crecimiento de la etología en los últimos años ha sido enorme, lo que se ha reflejado en la literatura científica y en la dispersión de especialistas por todo el mundo, observando las costumbres y modos de vida de toda clase de animales. En los trópicos han invadido los bosques y sabanas, y auspiciados por organismos tales como la National Geographic Society, han fotografiado y filmado (a escondidas de los propios animales) cómo son sus costumbres. Esto se puede apreciar en la televisión, en documentales que nos muestran cómo se cortejan y copulan leones, tigres, avestruces, ranas, etc., en lo que podría considerarse

como una interesante pornografía científica animal. Estos grupos son también los que más presión ejercen para la conservación de la naturaleza, llegando hasta interferir el desarrollo del país que los hospeda. Un caso reciente fue el desalojo de un grupo de gente que lavaba oro en uno o dos torrentes del Cerro de Corcovado al Sur de Costa Rica, lo que acabó con una posible fuente de producción minera, de la que carece este país. En el presente libro hay informes de varios estudios que se realizan sobre mariposas en ese lugar. Aquí puede señalarse que esas personas expulsadas no talaban árbol ninguno y sólo lavaban la arena de un torrente para lograr algunas pepitas de oro. Hay otros casos parecidos en nuestros países, que nos hacen reflexionar si vale la pena exagerar tanto la conservación, a expensas de una naciente minería o de la ganadería, pero ese es asunto que sale del ámbito de esta reseña.

El libro está dedicado al Profesor E.B. Ford, autor de los clásicos "Butterflies" (1945) y "Moths" (1955), quien cumplía 80 años, y asistió e intervino en las discusiones del Symposium. La obra consta de 33 contribuciones, distribuidas en 8 secciones que van desde sistemática, poblaciones y comunidades, alimentación, sexo y comunicación, migración, y conservación. Las secciones con más contribuciones son la de sexo y comunicación y la de predación, parasitismo y defensa (seis trabajos cada una), seguido de una sobre migración y variación estacional (cinco trabajos).

Algunos de los trabajos informan de actividades en progreso en Costa Rica, que es el único país que figura como tal en el índice de materias. Además, con otra paginación, se citan trabajos hechos en el Parque de Corcovado, en la Península de Osa, en el Sur de Costa Rica, donde L.E. Gilbert realizó sus estudios sobre biología de las comunidades de mariposas. Allí estuvo con otros como J.L.B. Mallet, quien había trabajado sobre el comportamiento social de la mariposa *Heliconius xanthodes* en Colombia, especie del mismo género, *Heliconius*, con el cual Gilbert y sus alumnos han trabajado en ocho especies distintas en Sirena, Parque de Corcovado.

Otros trabajos realizados en Costa Rica son sobre alimento de las mariposas (Sección 7), y son citados por M.C. Singer, de la Universidad de Texas. Se trata de la ecología de la planta hospedante, *Passiflora*, de las mariposas del Noroeste de Costa Rica (*Heliconius* otra vez) de J.T. Smitty.

El libro contiene varios dibujos, cuadros y gráficos que ilustran los resultados de los estudios, así como algunas fotografías. En el centro, se han agregado

unas láminas en color, cuatro de ellas correspondientes a las especies de *Heliconius* de Corcovado

El libro está muy bien hecho y es un placer tenerlo en las manos. Hay una bibliografía cumulativa, que abarca todos los trabajos, lo que constituye una novedosa y útil iniciativa. Se añaden al final de cada referencia, entre corchetes, el número del capítulo en el que se hace la cita, lo que hace posible apreciar que algunos trabajos son citados en cuatro o más capítulos. Tiene además un índice sistemático, no sólo de los lepidópteros sino también de predadores y comensales de otros órdenes, y de plantas hospedantes. En el texto principal se han omitido los nombres de los autores y de los nombres científicos, los cuales aparecen en este índice sistemático. También se señalan en el índice, y para cada especie, el nombre de la familia y se señalan las subfamilias con números exponentiales entre paréntesis que corresponden a una lista que antecede al índice sistemático. Por último, hay un índice de materias común y corriente. Todo esto facilita enormemente el uso de este libro como obra de consulta.

Me he detenido a comentar estos índices porque he estado preocupado en los últimos años por muchos libros universitarios que han aparecido en Costa Rica, que no tienen índice de materias, lo que les resta grandemente su valor como obras de estudio y de consulta. Así, a una introducción a la flora de Costa Rica, que tenía los nombres locales de las especies que presentaba como tipos en cada división botánica, tuve que dedicarle largas horas en hacer un índice sistemático, con esos nombres vulgares, para poder utilizarlo como obra de consulta. Y así hay varios casos más, y de más de una editorial universitaria. También, una obra de historia, tal como una biografía de Don José Figueres, aparecida en 1987, no tiene un índice onomástico ni de materias, falla que ha sido señalada por más de un comentarista en los diarios de San José.

Libros como este deberían quizás ser examinados por las personas que ocupan cargos de editores en las universidades. Quizás así comprendan cómo se elabora algo distinto a una novela o panfleto político, es decir, una obra de estudio y consulta.

ADALBERTO GORBITZ<sup>†</sup>  
EDITOR EMERITO IICA

PROBERT, M.E.; FERGUS, I.F.; BRIDGE, B.J.; McGARRY, D.; THOMPSON, C.M.; RUSSELL, J.S. 1987. The properties and management of vertisols. CAB International, Wallingford, Oxon, OX 108DE, United Kingdom. 36 p.

Este pequeño volumen, preparado por el prestigioso equipo de suelos de CSIRO en Australia, no queda atrás de su título y en la realidad, presenta un buen resumen sobre las propiedades de estos suelos. Los vertisoles, aunque no son suelos muy corrientes, ocupando un poco menos del 2% de las tierras, se caracterizan por su uso agrícola intensivo, pues en ellas hay suficiente agua. En la América Tropical se estima que hay unos  $20 \cdot 10^6$  hectáreas de vertisoles, de los cuales un porcentaje alto se usa intensivamente.

El volumen se dividió en cinco capítulos, de tamaños diferentes, de los cuales el primero es una breve introducción.

El segundo capítulo se dedicó a la pedología, a la distribución de estos suelos y a las condiciones muy específicas bajo las cuales se forman.

Las propiedades físicas y químicas son el tópico del tercer capítulo, el segundo más largo del volumen; se analizan aquí las relaciones suelo-agua, especiales de los vertisoles y la estructura de su superficie. Además se examina la mineralogía, el contenido de materia orgánica y el estado del nitrógeno, del fósforo y brevemente, de los otros nutrientes como del S y los oligoelementos.

El cuarto capítulo analiza la difícil tarea del manejo de los vertisoles. Se analizan diferentes sistemas de manejo de fincas, el efecto de la erosión, de las prácticas de cultivo y de la salinidad.

El texto concluye con un breve capítulo donde se resume la información, se indican faltantes de conocimientos sobre diversos tópicos y se enfatiza la apreciable variación que existe entre diferentes vertisoles.

Se termina el volumen con una amplia bibliografía, especialmente frente en la información de Australia y Asia, con referencias de África pero con poco material de Suramérica. La bibliografía, en especial, parece no haber sido considerada aunque existen trabajos de importancia.

La bibliografía incluye más de 250 trabajos y es así, posiblemente, la bibliografía más amplia sobre este tópico.

Se estima que este volumen, coeditado por CAB e IBSRAM, es una contribución muy útil a la bibliografía y deberá formar parte de las colecciones de referencia de las bibliotecas agrícolas de Latino América.

ELEMER BORNEMISZA  
UNIVERSIDAD DE COSTA RICA

**VAN DIEST, A. (ed.).** 1987. *Plant and soil interfaces and interactions*. Martinus Nijhoff Publ. Dordrecht, Netherlands. 270 p.

Este volumen representa un esfuerzo particular de los editores de la revista *Plant and Soil*, quienes se reunieron para celebrar el volumen No. 100 de esta importante publicación; con esa ocasión, presentaron trabajos en cinco divisiones, dedicadas a temas de considerable interés para la revista. Se presentaron 24 trabajos en los campos de la nutrición de plantas, fertilidad de suelos, fijación biológica de nitrógeno, biología de suelo y actividad de raíces e hidrobiología. Estos trabajos incluyen puntos de vista muy originales y resúmenes actualizados en diferentes campos. Más de la mitad de ellos (13 trabajos) se ocupan de los campos de la nutrición mineral y fertilidad de suelos, mientras que biología de suelos y actividad de raíces, incluyen seis trabajos (una cuarta parte del volumen). Los capítulos tienen buenas bibliografías aunque éstas no sean exhaustivas y representen especialmente trabajos estrechamente relacionados con cada capítulo.

Este libro presenta los avances recientes, en diferentes campos, en los que investigan los editores de *Plant and Soil* y así, constituye un resumen muy actualizado sobre estas líneas de investigación.

Se recomienda este volumen a los profesores de escuelas de posgrado y especialmente, a investigadores en fertilidad de suelos.

ELEMER BORNEMISZA  
UNIVERSIDAD DE COSTA RICA

**SZEGEDI, J. (ed.).** 1987. *Proceedings of the 9th International Symposium on Soil Biology and Conservation of the Biosphere*. Academiai Kiado, Budapest, Hungria, 2 v. 945 p.

Este importante encuentro de especialistas de renombre mundial se realizó en agosto de 1985, con la

participación de unos 160 investigadores de unos 30 países, tanto de clima templado como tropical. En este simposio se discutió la situación actual en lo referente a la influencia de la agricultura moderna sobre las propiedades biológicas y bioquímicas de los suelos, con énfasis en su fertilidad. Las actas del evento científico constituyen dos volúmenes y probablemente son el documento más completo sobre la influencia de los diferentes agroquímicos sobre los procesos biológicos en el suelo. Las presentaciones individuales son particularmente interesantes ya que muchos de los trabajos de la Europa Oriental se publican en revistas que son poco accesibles en América Latina. Se presentó también una buena revisión de los trabajos hechos en Cuba en este campo.

Los dos volúmenes se dividen en ocho subdivisiones de las cuales la primera se dedica al efecto de los fertilizantes sobre los procesos biológicos en suelos.

La segunda subdivisión, considerablemente más corta que la primera, examina la interacción entre plaguicidas y organismos en el suelo. Desafortunadamente, con excepción de un trabajo realizado en Egipto, los demás trabajos se refieren a experiencias efectuadas en la región templada.

La tercera subdivisión, una de las más largas ya que ocupa aproximadamente una quinta parte de la obra, se dedica a la importancia de la fijación biológica del nitrógeno. Este tópico, aunque solamente relacionado marginalmente con el tema central, fue tratado en 23 trabajos tanto del trópico como de las regiones templadas. Son muy interesantes los informes poco frecuentes que se incluyen acerca del efecto de diferentes contaminantes del suelo sobre la fijación biológica de N. La mayoría de los trabajos mantiene un alto nivel científico, unido a un enfoque práctico, lo cual constituye una característica muy deseable pero no muy común en la literatura especializada.

Los trabajos en la cuarta subdivisión examinaron el papel de los organismos en el suelo, referido a la dinámica de la materia orgánica. En esta parte se presenta información, tanto de índole agrícola como de suelos forestales procedentes de la zona templada y de los trópicos, especialmente de Cuba. Esta sección concluye el primer volumen, el cual es un poco más extenso que el segundo.

La quinta subdivisión, con la cual se inicia el segundo volumen, examina el papel de los organismos presentes en los suelos sobre los procesos pedogénicos. Aquí se ha dado énfasis especial a la rehabilitación de suelos regiones mineras y a suelos con contaminación petrolera.

La sexta subdivisión, aunque breve –de apenas ocho trabajos– es dedicada al campo novedoso del papel de los organismos en el suelo como parte de la ecología global del mismo. Se incluyen varios trabajos sobre suelos forestales, los cuales, en todo este volumen, reciben mayor atención que en la generalidad de las publicaciones sobre suelos.

Las interrelaciones entre la actividad biológica en el suelo y sus propiedades son el tópico de la séptima subdivisión.

El volumen concluye con la octava subdivisión, dedicada a las relaciones entre plantas superiores y los organismos en el suelo, una sección muy breve ya que este campo es aún muy novedoso.

El editor de las actas de este simposio merece un reconocimiento especial por haber presentado todos los trabajos en buen idioma inglés y por haber impartido a la obra un carácter uniforme bien organizado.

Un índice de materias que ocupa 16 páginas y un índice de autores, ambos muy útiles para localizar los diferentes tópicos del libro, constituyen el complemento del texto de esta magnífica obra de referencia.

Esta publicación ofrece muchas ideas a todos los que estamos involucrados en la ciencia del suelo y no solamente a los microbiólogos. Este revisor cree que la adaptación de muchas de las técnicas expuestas en esta obra a las condiciones tropicales, podrá contribuir a que se logre una mejor comprensión de los suelos existentes en los países latinoamericanos y a su manejo más eficiente, en una forma menos destructiva, para así asegurar una agricultura continua y eficiente, en un ambiente sano.

El libro debería estar disponible en las bibliotecas que apoyan la investigación y la docencia de posgrado, en las áreas de biología y fertilidad de suelos.

ELEMLR BORNEMISZA  
UNIVERSIDAD DE COSTA RICA

#### INTERNATIONAL POTASH INSTITUTE. 1986.

Nutrient balances and the need for potassium.  
Proceedings of the 13th IPI Congress. Bern, Switzerland. 299 p.

Los resúmenes del Congreso No. 13 del Instituto Nacional de la Potasa, realizado en 1986 fueron titulados "El balance del potasio y sus necesidades". En la primera sesión de este Congreso, tres autores resumen los balances de NPK en diferentes regiones climáticas y sistemas de producción, tal cual fueron discutidos en los coloquios de 1983 (regiones áridas y semiá-

ridas), 1984 (zonas templadas) y 1985 (regiones tropicales húmedas). Lo más sobresaliente de estos trabajos puede resumirse de la siguiente manera:

- En zonas áridas el movimiento de potasio está en función directa de la mineralización del nitrógeno.
- En zonas templadas los procesos que más relevancia tienen son la pérdida de nitrógeno por denitrificación y volatilización, las de potasio por lavado y fijación irreversible y la de fertilizante fosfatado por envejecimiento.
- El consumo de fertilizantes en zonas tropicales se ve más afectado por factores socioeconómicos (falta de crédito, falta de infraestructura, etc.) que por factores técnico edáficos.

La segunda sesión del Congreso enfatiza los factores de importancia que afectan el balance del potasio. En forma positiva la disponibilidad de este elemento se ve incrementada por la adición de fertilizantes químicos u orgánicos y la liberación de potasio de los minerales primarios; los factores que disminuyen la disponibilidad del elemento son la exportación de K como producto vendido (cultivo), y el lavado, la fijación y la erosión del suelo con potasio. Varios autores coinciden en que el mayor sistema radicular de las gramíneas en relación a las dicotiledoneas, les permite a las primeras absorber potasio no intercambiable del suelo, en particular cuando su concentración oscila entre 20-50 mg·K int kg<sup>-1</sup> de suelo. También se considera que sistemas de cultivo con varios estratos radiculares extraen y utilizan el potasio más eficientemente que los monocultivos. Este hecho permite explicar el porqué de la mayor respuesta a la fertilización potásica con leguminosas de grano en vez de arroz, maíz y pasturas.

En la sesión tres, se discute el efecto de los cambios en los sistemas de producción sobre el balance del potasio en el suelo. La elevada concentración del potasio en el estiércol acumulado en sistemas de estabulación de animales en Holanda afecta la redistribución de este elemento en el campo. Así mismo, el sistema de cultivo en fajas (cítricos, uvas, etc.) con pasturas intercaladas, permite cortar el pasto e incorporar los residuos en las fajas, aprovechando la habilidad de las gramíneas para absorber K, el cual sirve como fertilizante.

La cuarta sesión se concentró en la fertilización con potasio para mantener el nivel del elemento en el suelo bajo diferentes sistemas de finca. Se discute los resultados encontrados en la Estación Experimental de Rothamsted desde 1843, considerándose que la liberación de K es relativamente constante en el tiem-

po, aunque menor en suelos arenosos que franco-arcillosos. Un factor importante que afecta la distribución del potasio en el sistema es su concentración en subproductos (estiércol, desechos de la extracción de azúcar, almidones, o proteína de remolacha, papa y lucerna, respectivamente), cuyo uso debe satisfacer las demandas del sistema agrícola, así como evitar la contaminación con afluentes ricos en nitrógeno.

En la última sesión se discuten la exportación de nutrientes como parte del producto vendible entre países desarrollados y en desarrollo, así como la contribución relativa de los diferentes productos que se comercializan en cuanto a su contenido de potasio. La situación varía entre regiones del globo encontrándose que hay una exportación neta de nutrientes de los países en desarrollo hacia los más desarrollados

Curiosamente, los productos que menos pérdida de nutrientes causan a los países exportadores son los frutales perennes, cultivos altamente recomendables de acuerdo al uso potencial de los trópicos húmedos. No obstante que en estos trabajos no se consideran especies maderables, es de importancia mencionar que árboles de alto valor económico exportan menos nutrientes que otras especies maderables de poco valor económico.

El texto es una excelente contribución a la literatura del potasio y debería de formar parte de las bibliotecas de suelos de los centros de investigación en nutrición de cultivos y de técnicos especializados en el tema.

ALFREDO ALVARADO  
CASILLA 1983  
COCHABAMBA, BOLIVIA