Método de Inoculación de *Ceratocystis fimbriata* Ell. & Halst. y Evaluación de la Resistencia en Cacao[1]

S. Núñez, J.J. Galindo**, W. Phillips-Mora***

ABSTRACT

The variability of 12 isolates of *Ceratocystis fimbriata* Ell. & Halst. collected in different cocoa growing areas of Costa Rica was evaluated. Wide differences in growth, sporulation and virulence of the isolates were found. Two culture media were evaluated: potato-dextrose-agar-thiamine clorhydrate and potato-dextrose-agar-cocoa pod powder. The latter produced the best growth and sporulation. Two inoculation methods and various concentrations of inocula were evaluated to define an adequate inoculation method for cocoa seedlings. The most efficient method was to make a small wound in the base of the stem with a pin, placing on this wound a piece of cotton with five drops of a suspension at 80 000 ascospores/ml. Following this methodology, seven open pollination families were evaluated. The best evaluation parameter used was the percentage of dead plants. The 'Catongo' (0%) and the 'IMC-67' (8.3%) families were resistent; the 'Pound-7' (16.7%), 'UF-677' (21.7%) and 'SPA-9' (22.2%) families were intermediate, and 'Pound-12' (33.3%) and 'SCA-6' (46.7%) families were susceptible.

RESUMEN

Se estudió la variabilidad de 12 aislamientos de *Ceratocystis fimbriata* Ell. & Halst. recolectados en diferentes zonas cacaoteras de Costa Rica y se encontraron grandes diferencias en crecimiento, esporulación y virulencia. Simultáneamente se evaluaron dos medios de cultivo: papa-dextrosa-agar-clorhidrato de tiamina y papa-dextrosa-agar-mazorca de cacao en polvo, el que produjo mayor crecimiento y esporulación del hongo. Después se realizaron dos experimentos para definir una metodología adecuada de inoculación del hongo en plántulas de cacao. Con ese fin se evaluaron dos métodos de inoculación y varias concentraciones de inóculo. Se encontró que el método más eficiente era realizar una herida con un alfiler en la base del tallo y colocar sobre ella un algodón impregnado con cinco gotas de una suspensión de 80 000 ascósporas por mililitro. Haciendo uso de esta metodología se evaluaron siete familias de polinización abierta. El porcentaje de plantas muertas resultó ser el mejor parámetro de evaluación. Se obtuvieron como resistentes las familias de los cultivares Catongo (0%) e IMC-67 (8.3%); intermedias, las del Pound-7 (16.7%), UF-677 (21.7%) y SPA-9 (22.2%) y susceptibles, las familias de Pound-12 (33.3%) y SCA-6 (46.7%).

INTRODUCCION

La enfermedad llamada "mal de machete", causada por el hongo *Ceratocystis fimbriata*, es una amenaza potencial para la producción del cacao (*Theobroma cacao* L.) en América Central. La enfermedad se presenta en forma esporádica pero en países tales como Ecuador y Venezuela ha destruido plantaciones enteras, constituidas principalmente por árboles clonales con predominancia de los tipos criollos y trinitarios (3, 13).

C. fimbriata penetra los tejidos del árbol por heridas causadas por herramientas o insectos taladradores, principalmente del género *Xyleborus* (12). El hongo destruye la zona del cámbium y el xilema y ocasiona una decoloración de los tejidos, observándose numerosas líneas violáceas, cortas, paralelas, localizadas a lo largo de los haces fibrovasculares. Se observa formación de peritecios negruzcos en las grietas de la parte afectada, en los bordes de la heridas y en el interior de las galerías hechas por los insectos. Los árboles afectados se marchitan progresivamente. Las hojas necrosadas permanecen adheridas al árbol muerto por varios meses —síntoma característico de la enfermedad (3, 8).

El combate de la enfermedad por medios químicos y culturales no ha sido satisfactorio y, en la mayoría de los casos, ha resultado antieconómico. El método más efectivo y económico es el uso de material genético resistente (2, 3, 8).

1 Recibido para publicación el 9 de noviembre de 1992.

* Trabajo de tesis para optar al grado de Ingeniero Agrónomo en la Universidad de Costa Rica. Investigación Auspiciada por la Red Regional de Generación y Transferencia de Tecnología en Cacao (PROCACAO), con fondos de la Regional Office for Central American Programs (ROCAP).

** Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE), Turrialba, C. R.

Para la selección de cultivares resistentes se han usado diversos métodos de inoculación, dentro de los cuales los más importantes son: inoculaciones de trozos de madera (2, 3); método colorimétrico (10); e inoculaciones directas en la planta (1, 4). Algunos de los métodos empleados han sido poco precisos, sin correlación entre la mortalidad en el campo y la reacción en el laboratorio. El método colorimétrico es costoso y la reacción es afectada por cambios en las condiciones ambientales (9).

En las evaluaciones de resistencia, es fundamental contar con un método confiable de inoculación que asegure una presión de inóculo uniforme y adecuada, de tal forma que los materiales puedan ser claramente separados de acuerdo con su resistencia o susceptibilidad al patógeno. Asimismo es fundamental conocer los límites de variabilidad del patógeno, para seleccionar los aislamientos más representativos de sus poblaciones en el campo.

Las evaluaciones de la resistencia de materiales de cacao a *C. fimbriata* son de gran importancia, sobre todo en este momento, pues se están incrementado, en algunas regiones del mundo, los sistemas intensivos de producción, que incluyen la siembra de cacao clonal, para los cuales este hongo constituye una de las principales amenazas.

Los objetivos de esta investigación fueron: caracterizar el crecimiento *in vitro* de aislamientos de *C. fimbriata* recolectados en diferentes zonas cacaoteras de Costa Rica; diseñar un método de inoculación de *C. fimbriata* en plantas de cacao y evaluar con este método la resistencia de plantas provenientes de polinización abierta.

MATERIALES Y METODOS

Caracterización de doce aislamientos de *C. fimbriata*.

Se estudió el crecimiento y esporulación *in vitro* de 12 aislamientos de *C. fimbriata* procedentes de diferentes áreas cacaoteras de Costa Rica (Cuadro 1). Cada uno fue evaluado en dos medios de cultivo: PDA-tiamina (papa-dextrosa-agar-clorhidrato de tiamina,) y PDA-cacao (papa-dextrosa-agar-polvo de mazorca de cacao). El polvo de cacao se obtuvo a partir de la corteza de frutos de cinco meses de edad del cv. UF-676, que se secó al horno durante tres días entre 65 °C y 70 °C, y luego se molió.

Se realizaron cuatro repeticiones por cada aislamiento y por cada medio de cultivo; cada una de ellas constituida por un plato Petri, donde el hongo creció durante 16 días en luz continua y a 25 grados centígrados. El diseño utilizado fue un irrestricto al azar. A partir del segundo día y hasta el decimosexto día se midió el crecimiento lineal de la colonia. A los 10 d se evaluó la forma, color y presencia de anillos; a los 10 d y 15 d el número de peritecios con ascósporas. Esta

Cuadro 1. Procedencia de los aislamientos de *fimbriata*, crecimiento lineal y peritecios maduros en dos medios de cultivo (Turrialba, 1989).

Aislamiento	Procedencia	Crecimiento lineal (cm) (16 d)		Peritecios maduros (cm^2) (15 días)	
		PDA-cacao	PDA-tiamina	PDA-cacao	PDA-tiamina
910	CATIE-Turrialba	5.31 bc[2]	3.6 bcd	400 a	268 a
R3		5.6 bc	4.0 bc	175 bc	0 c
959	Bananito, Limón	8.7 a	7.4 a	28 b	43 bc
3.388	Siquirres, Limón	3.9 d	2.9 d	170 bc	46 bc
4.188	Siquirres, Limón	4.8 cd	3.3 cd	138 bc	0 c
958	CATIE, Turrialba	5.3 bc	3.7 bcd	155 bc	0 c
966	Río Frío, Heredia	5.9 b	4.6 b	125 bc	10 c
957	Bananito, Limón	4.7 cd	3.2 cd	95 cde	0 c
909	CATIE, Turrialba	4.7 cd	3.2 cd	150 bc	0 c
0189	CATIE, Turrialba	5.0 bc	3.4 cd	190 bc	0 c
946	La Lola, Limón	5.3 bc	3.5 cd	72 cde	0 c
965	Cahuita, Limón	8.6 a	7.2 a	45 cde	103 b
961	Bananito, Limón	5.6 bc	3.8 bcd	36 cde	23 bc

1 Registro de diagnóstico, Laboratorio de Fitopatología, CATIE.
2 Valores con igual letra en una misma fila no tienen diferencias significativas, según Prueba de Duncan (P=0.05).

variable se determinó mediante la observación al estereoscopio de dos discos de agar obtenidos de cada plato Petri, uno de la parte central de la colonia y otro de la periferia de la misma. Los peritecios con ascósporas fueron aquellos que presentaban en la parte superior del cuello del peritecio una masa de ascósporas pegadas a las fimbrias. Se obtuvo un promedio de ambos discos.

Estas evaluaciones permitieron seleccionar los aislamientos de *C. fimbriata* representativos de la variabilidad morfológica y de producción de inóculo, para ser usados en los experimentos de inoculación artificial que se describen a continuación.

Evaluación de dos métodos de inoculación y cinco concentraciones de inóculo

Se inocularon plantas de cuatro meses de edad provenientes de semillas de polinización abierta de los cultivares IMC-67 y SCA-6, catalogados como resistente y susceptible a *C. fimbriata* (3). Se usaron dos métodos de inoculación:

— Herida causada por alfiler: se introdujo la punta de un alfiler estéril en el primer tercio de la altura del tallo, a una profundidad uniforme de 0.45 mm que nunca llegó a traspasar el tallo.

— Herida causada por bisturí: en el primer tercio de la altura del tallo se realizó una herida rectangular de aproximadamente 0.9 mm x 0.4 mm con un bisturí núm. 4. En ambos métodos, la herida se cubrió con un algodón sujetado con cinta adhesiva, en el cual se colocaron cinco gotas (aproximadamente 0.2 ml) de una suspensión recién preparada de ascósporas del aislamiento 0189 de *C. fimbriata*.

La suspensión se preparó a partir de colonias con 21 d de edad, a las que se les extrajo las ascósporas removiendo de las cabezas de los peritecios. Aunque se trató de hacer suspensiones sólo de ascósporas, siempre se observó un pequeño porcentaje de esporas asexuales. Las esporas fueron homogenizadas en agua destilada más Tween 80 al 0.01%; la suspensión se licuó tres veces a intervalos de 5 min e inmediatamente se calibró con un hematocímetro.

Para cada método de inoculación se midieron cinco concentraciones de inóculo: 0 x 103, 15 x 103, 30 x 103, 45 x 103 y 60 x 103 ascósporas por mililitro. Se inocularon ocho plantas por cultivar por método por concentración, y se usó un diseño de bloques completos al azar, con un arreglo factorial de los tratamientos y cuatro repeticiones. Se incluyó un testigo que consistió en inocular los cvs. IMC-67 y SCA-6 con 60 000 esporas por mililitro sin hacer una herida en la planta.

A los 45 días de la inoculación, se evaluaron los siguientes parámetros: incidencia (determinada con base en el número de plantas muertas y en el número de plantas con lesión) y severidad (tamaño de lesión en el tallo). Después de la última evaluación se hicieron reaislamientos del agente causal en PDA-cacao para confirmar su identidad.

Evaluación de tres concentraciones de inóculo y dos aislamientos de *C. fimbriata*.

Con el método del alfiler, seleccionado en el experimento anterior, se contaminaron con el hongo siete plantas por tratamiento de los cvs. SCA-6, UF-677 e IMC-67, reportados como susceptibles los dos primeros y resistente, el último (3). Se realizaron tres repeticiones. Se utilizaron los aislamientos 0189 y 957 que representaban los rangos de variabilidad patogénica del hongo y se estimaron las siguientes concentraciones: 80×10^3, 100×10^3 y 120×10^3 ascósporas por mililitro. Se efectuaron reaislamientos del hongo en el medio PDA-cacao. De las observaciones hechas en esta prueba, se escogieron el aislamiento y la concentración de inóculo para la siguiente.

Evaluación de la reacción a *C. fimbriata* de descendientes de cacao de polinización abierta

Con el método de herida de alfiler y el aislamiento 957 a una concentración de 80 000 ascósporas por mililitro, seleccionados en los experimentos anteriores, fueron inoculadas 15 plantas provenientes de semilla de polinización abierta de cada uno de los siguientes cvs. SCA-6, IMC-67, UF-677, SPA-9, Pound-12 y Catongo.

RESULTADOS

Caracterización de 12 aislamientos de *C. fimbriata*.

Los aislamientos mostraron importantes diferencias en el crecimiento lineal de la colonia y en la cantidad de peritecios, pero tuvieron un comportamien-

to más uniforme en la forma, apariencia, color y presencia de anillos.

Se presentaron variaciones debido al medio de cultivo utilizado. En PDA-cacao hubo mayor crecimiento lineal que en PDA-tiamina. En el medio PDA-cacao el crecimiento lineal varió entre 8.7 cm para el aislamiento 959 (A-959) y 3.9 cm para el A-3.388. En PDA-tiamina estas variaciones fueron de 7.4 cm para A-959 y 2.9 cm para A-3.388. En ambos medios, tanto A-959 como A-965 mostraron los máximos crecimientos y presentaron diferencias significativas (P = 0.05) respecto de los otros aislamientos. Asimismo, A-3.388 tuvo el mínimo crecimiento en los dos medios de cultivo evaluados. Los restantes aislamientos mostraron crecimientos intermedios entre estos valores, pero guardaron la misma secuencia en ambos medios (Cuadro 1).

En la mayoría de los aislamientos el crecimiento de las colonias fue circular, excepto en A-3.388 y A-4.188, en los que se dio un crecimiento irregular en el medio PDA-cacao. Estos aislamientos se caracterizaron por tener un micelio poco denso en PDA-cacao y uno más denso en PDA-tiamina. Excepto los aislamientos en 959, 909 y 965, el micelio creció más denso en PDA-tiamina. En PDA-cacao, el micelio creció poco denso, con excepción de los aislamientos R3, 961, 957 y 946. Los aislamientos 946, 957, 0189 y R3 presentaron un crecimiento ligeramente irregular en el medio PDA-tiamina. El color de la colonia no varió con el medio de cultivo. De los 12 aislamientos evaluados, el 58% presentó color gris claro y el 42%, gris oscuro. Solamente el aislamiento 910 presentó anillos concéntricos, que fueron observados en ambos medios de cultivo.

La producción de peritecios maduros en ambos medios de cultivo fue mayor a los 15 d que a los 10 días. Para todos los aislamientos la mayor producción ocurrió en el medio PDA-cacao. A los 10 d la cantidad de peritecios por centímetro cuadrado varió entre 350 para A-910 y 28 para A-961, lo que significa una diferencia del 1.250 por ciento. La producción de peritecios varió entre 400 para A-910 y 35.5 para A-961 a los 15 días. En PDA-tiamina, a los 10 d, un 75% de los aislamientos no llegó a producir peritecios; aun a los 15 d, un 54% no habían producido peritecios. A-910 presentó la mayor cantidad de peritecios en este medio (268 por centímetro cuadrado). No se encontró relación entre la producción de peritecios y la procedencia de los aislamientos. Al observar colonias de más de 30 d se observó que las cabezas de los peritecios tomaban una coloración más oscura y se notaban más secas en el medio PDA-cacao (Cuadro 1).

Evaluación de dos métodos de inoculación y cinco concentraciones de inóculo

En el cv. SCA-6, la mortalidad de plantas, al realizar la herida con alfiler, fue superior que entre las heridas con bisturí. Para el cv. IMC-67 esta mortalidad fue igual para ambos tipos de herida. Con ambos métodos de inoculación, al incrementarse la concentración de inóculo, también subió la mortalidad. Esto fue muy evidente para el cv. SCA-6 y la herida con alfiler, en el cual se obtuvo la máxima mortalidad. En el cv. IMC-67 se alcanzó una menor mortalidad para ambos métodos de herida, con todas las concentraciones de inóculo utilizadas (Cuadro 2).

Cuadro 2. Efecto de dos métodos de inoculación y cinco concentraciones de inóculo de *C. fimbriata* en el porcentaje de plantas muertas, con lesión y tamaño de la lesión, en dos cultivares de cacao (Turrialba 1989).

Concentración de inóculo (ml)	Plantas muertas (%)		Plantas con lesión (%)		Tamaño de lesión (cm)	
	Alfiler	Bisturí	Alfiler	Bisturí	Alfiler	Bisturí
			"IMC-67"			
0	0.0 a	0.0 a	0.0 a	0.0 a	0.0 a	0.0
15 x 103	0.0[1] a	6.3 ab	6.3 a	15.6 ab	3.5 a	2.6 a
30 x 103	18.8 b	9.4 ab	37.5 b	18.8 ab	3.7 a	2.2 a
45 x 103	12.5 ab	21.9 b	37.5 b	25.0 ab	2.8 a	3.8 a
60 x 103	21.8 b	15.6 ab	34.4 b	34.4 b	4.3 a	3.9 a
			'SCA-6'			
0	0.0 a	0.0	0.0 a	0.0 a	0.0	0.0
15 x 103	18.8 ab	21.9 b	37.5 b	37.5 ab	3.3 a	3.0 a
30 x 103	34.4 bc	15.6 ab	28.1 b	28.1 b	2.8 a	2.5 a
45 x 103	53.1 c	21.9 b	43.8 b	43.8 b	3.8 a	3.2 a
60 x 103	59.4 c	31.2 b	46.9 b	46.9 b	4.1 a	3.7 a

1 Valores en la misma columna seguidos por la misma letra no tienen diferencias significativas, según prueba de Duncan (P=0.05)

La incidencia de plantas con lesión fue más alta con el método de herida por alfiler, entre 0% y 34.4% para el cv. IMC-67, y entre 0% y 78.1% en el cv. SCA-6. En ambos cultivares y tipos de herida, el aumento de la concentración del inóculo también incrementó la incidencia de plantas con lesión; sin embargo, en estos casos, el promedio siempre fue mayor en el cv. SCA-6. Asimismo, en el cv. IMC-67 la incidencia de plantas con lesión fue siempre menor que en el cv. SCA-6 (Cuadro 2).

En ambos cultivares, la herida con alfiler presentó una lesión ligeramente mayor. En ellos, al aumentarse las concentraciones de inóculo, la lesión tendió a crecer. Sin embargo no se encontraron diferencias significativas (P = 0.05) para este factor. Los tamaños de lesión fueron muy similares para ambos cultivares (Cuadro 2).

Evaluación de tres concentraciones de inóculo y dos aislamientos de *C. fimbriata*

El mayor porcentaje de mortalidad en los tres cultivares estudiados se obtuvo en el aislamiento 957, el cual produjo valores considerablemente mayores que los logrados con el 0189 (Cuadro 3). Para ambos, los cultivares mostraron un porcentaje de mortalidad en el siguiente orden ascendente: IMC-67, SCA-6 y UF-677. Al incrementarse la concentración de inóculo, el porcentaje de mortalidad subió ligeramente pero, en términos generales, no se encontraron diferencias significativas debidas a este factor (Cuadro 3).

Para los tres cultivares, el porcentaje de plantas con lesión fue más alto en el aislamiento 957; no obstante sus valores no difirieron mucho de los obtenidos en el 0189. No hubo diferencias significativas para las concentraciones de inóculo, salvo en el caso del cv. IMC-67 en el que se incrementó el porcentaje de plantas con lesión con el aumento de la concentración de inóculo (Cuadro 3).

El tamaño de la lesión fue mayor en el aislamiento 957 en los tres cultivares. En ninguno de ellos se alcanzaron diferencias significativas por la concentración del inóculo, excepto en el cv. UF-677 y en el aislamiento 957, en los cuales, con el crecimiento de la concentración de inóculo, se redujo el tamaño de la lesión. Ello señaló diferencias significativas entre 8 x 10^4 esporas por mililitro y las otras concentraciones de inóculo. Los promedios de lesión fueron menores en el cv. IMC-67 en ambos aislamientos, seguido por el cv. SCA-6 y por el cv. UF-677 en el que se encontraron los máximos valores (Cuadro 3).

Evaluación de la reacción a *C. fimbriata* de descendientes de cacao de polinización abierta

La mortalidad de plantas varió entre 46.7% ('SCA-6') y 0% ('Catongo'). Los cvs. Pound-12, SPA-9, UF-677 y Pound-7 presentaron porcentajes intermedios de mortalidad entre 33.3% y 8.3 por ciento. El cv. IMC-67 presentó un bajo porcentaje de mortalidad del 8.3% (Cuadro 4).

Cuadro 3. Efecto de tres concentraciones de inóculo y dos aislamientos de *C. fimbriata* en el porcentaje de plantas muertas, plantas con lesión y tamaño de la lesión en tres cultivares de cacao (Turrialba 1989).

	Plantas muertas (%)		Plantas con lesión (%)		Tamaño de lesión (cm)	
	0189	957	0189	957	0189	957
			'IMC-67'			
8 x 104	9.5 a1	9.5 a	66.7 a	38.1 a	2.1 a	3.0 a
10 x 104	4.8 a28.6 a	38.1 a	61.9 ab	2.8 a	2.3 a	
12 x 104	14 3 a	57.1 b	61.9 a	76.2 b	3.1 a	3.8 a
			'SCA-6'			
8 x 104	19.1 a	52.4 a	52.4 a	85.7 a	2.8 a	3.5 a
10 x 104	33.3 a	71.4 a	66.7 a	81.0 a	2.6 a	3.5 a
12 x 104	38.1 a	52.4 a	85.7 a	81.0 a	2.7 a	3.3 a
			'UF-677'			
8 x 104	38.1 a	52.4 a	71.4 a	76.2 a	3.2 a	6.0 a
10 x 104	42.9 a	61.9 a	80.9 a	76.2 a	3.7 a	3.9 b
12 x 104	47.6 a	66.7 a	76.2 a	90.5 a	3.3 a	3.4 b

1 Valores en la misma columna seguidos por la misma letra no tienen diferencias significativas, según prueba de Duncan (P=0.05).

Cuadro 4. Efecto de la inoculación de *C. fimbriata* en las descendencias de cacao de polinización abierta, sobre el porcentaje de mortalidad, porcentaje de plantas con lesión y promedio de lesión.

Cultivar	Plantas muertas %	Plantas con lesión %	Tamaño de lesión (cm)
'SCA'6'	46.7 a2/	80.0 a	4.0 a
'Pound-12'	33.3 ab	81.7 a	4.8 a
'SPA-9'	22.2 bc	80.0 a	4.8 a
'UF'677'	21.7 bc	65.0 ab	3.6 a
'Pound-7'	16.7 c	58.3 b	3.9 ab
'IMC-67'	8.3 d	53.3 b	3.5 bc
'Catongo'	0.0 c	3.3 c	2.5 c

1 Los siete cultivares fueron inoculados con el aislamiento 957, a una concentración de 80 mil esporas por mililitro.

2 Valores en la misma columna seguidos por la misma letra no tienen diferencias significativas según prueba de Duncan (P=0.05).

Los máximos porcentajes de plantas con lesión se produjeron en los cvs. SCA-6, Pound-12, SPA-9 y UF-677, cuyos valores fueron superiores al 65% y para los cuales no se observaron diferencias significativas (P = 0.05). El cv. Catongo mostró el mínimo porcentaje que fue de 33.3% en tanto que 'Pound-7' e 'IMC-67' tuvieron un 58.3% y 53.3%, respectivamente (Cuadro 4).

Se dieron diferencias significativas entre los cultivares para el tamaño promedio de lesión. Los cvs. SCA-6, Pound-12, SPA-9 y Pound-7 presentaron los promedios de lesión más altos, variando entre 3.9 cm y 4.8 centímetros. Los promedios de lesión más bajos correspondieron a 'Catongo' con 2.5 cm y a 'IMC-67' con 3.5 cm (Cuadro 4).

DISCUSION

Se determinó gran variabilidad entre los aislamientos de *C. fimbriata* en cuanto a su crecimiento lineal y esporulación. En relación con otras características, la población evaluada fue más uniforme; sin embargo, algunas variables cualitativas, tales como la forma de la colonia y la presencia de anillos, permitieron caracterizar mejor algunos de los aislamientos.

Esa caracterización posibilitó la selección de los aislamientos representativos de la variabilidad genética del patógeno, para utilizarlos en las evaluaciones de resistencia, en las cuales se observó que los aislamientos mostraban importantes diferencias en su virulencia, la cual no estaba relacionada con sus características morfológicas y fisiológicas. Las variaciones dentro de una misma especie de hongos han sido mencionadas por Greene y Barnett (7).

Para todos los aislamientos, el crecimiento y la esporulación fueron mayores en el medio PDA-cacao, que concuerda con lo encontrado por Montes de Oca (9) y Gardella (6) al evaluar varios medios de cultivo: ellos señalaron un crecimiento mayor de *C. fimbriata* en este medio. El inconveniente de usar polvo de mazorca de cacao, es que no se puede estandarizar totalmente el medio, pues pueden darse variaciones por el tipo de material de cacao usado, la edad de la mazorca y el proceso mismo para obtener el polvo de la mazorca.

En el PDA-tiamina, el crecimiento y la esporulación fueron menores, a pesar de que esta vitamina es indispensable para el crecimiento del hongo. En la investigación se usó la cantidad recomendada por Ryniers (11) y Espinoza y Delgado (5). Los resultados de este estudio concuerdan con los de Ryniers (11), quien encontró a los 10 d de edad que el crecimiento de las colonias varió entre 5 cm y 9 centímetros. El menor crecimiento y esporulación en PDA-tiamina podría indicar una concentración alta de esta vitamina, la cual sobrepasó los niveles propuestos por Greene y Barnet (7) de 100 mg de tiamina por litro de medio. Espinoza y Delgado (5) mencionan que la esporulación en este medio era adecuada, pero no la comparan con el medio PDA-cacao ni presentan datos sobre la misma.

Las variables cualitativas fueron muy útiles para la caracterización de algunos aislamientos, pues fueron

muy evidentes. Eso sucedió con la presencia de anillos, característica observada únicamente en el aislamiento 910.

El color de la colonia varió entre diferentes tonalidades de gris. Al inicio presentaron un color blanquecino, pero posteriormente se oscurecieron por la formación de peritecios y macroconidios, lo cual ocurre aproximadamente a los tres o cuatro días (1). El cambio de color podría ser un indicativo del momento ideal para extraer el inóculo de las colonias.

La edad de las colonias usadas en los tres experimentos para la obtención del inóculo fue de 21 d, la misma usada por Chong (1) y Soria y Salazar (13). Esta edad fue adecuada, ya que permitió lograr fácilmente las concentraciones requeridas y una alta efectividad en las inoculaciones. La utilización de colonias más jóvenes podría dar aparentemente buenos resultados, como lo demuestran los datos obtenidos por Domínguez (4), quien al usar platos de 12 d de edad consiguió mortalidades del 50% al 98 por ciento. Estos resultados se deben, probablemente, a que *C. fimbriata* requiere poco tiempo para producir conidios (48 h) y para la maduración de sus peritecios (una semana); así se puede tener inóculo viable en un corto período de tiempo (1). Por el contrario, el uso de colonias muy viejas induce a la pérdida de viabilidad del inóculo. Al respecto, Espinoza y Delgado (5) al probar el inóculo conseguido en platos de 30 d a 75 d encontraron que el desarrollo de las lesiones de *C. fimbriata* en trozos de ramas inoculadas, disminuyó con la edad de la colonia, de tal manera que las colonias muy viejas tuvieron un crecimiento muy pobre.

En los programas de mejoramiento es importante considerar la variabilidad genética del patógeno; de ese modo, cuando se hagan evaluaciones de materiales, se utilizan los aislamientos más representativos de la población del organismo en el campo. De los aislamientos usados en la inoculación, el 957 fue más virulento que el 0189. Estos dos aislamientos se seleccionaron durante la caracterización *in vitro*, por representar los límites de variabilidad patogénica y por su diferente procedencia: 0189 fue aislado en Turrialba y 957 en Limón.

C. fimbriata requiere heridas para su penetración (12). Esto fue confirmado en esta investigación al realizar inoculaciones en plantas sin herida de los cvs. IMC-67 y SCA-6, en los cuales no se determinaron plantas con síntomas.

Aunque el método con bisturí produjo una herida más grande y, consecuentemente, una mayor posibilidad de infección, en la presente investigación se encontró que el método con alfiler fue más eficiente. Esto puede ser porque la herida con alfiler es más profunda y afecta los tejidos internos de la planta. Además, este tipo de herida presenta similitudes con las producidas por los insectos del género *Xyleborus*, a los que se relaciona insistentemente con la enfermedad. Como ventaja comparativa se puede mencionar, además, que el alfiler produce una herida más uniforme, con lo que las variaciones debidas al procedimiento experimental se reducen. Cuando se realiza una herida con bisturí se rasgan más los tejidos superficiales y se pueden inducir reacciones fisiológicas *in situ* como la oxidación de fenoles, que afectan el desarrollo del hongo.

Para el cv. SCA-6, la herida causada por alfiler tuvo mayor efecto en los porcentajes de mortalidad y de plantas con lesión, que en el cv. IMC-67 donde fueron menores. Con bisturí la mortalidad fue ligeramente mayor en el cv. SCA-6.

Es importante tener en cuenta que la selección de concentraciones de inóculo apropiadas es fundamental, puesto que las muy bajas podrían proporcionar escapes a la enfermedad y las muy altas podrían sobrepasar los límites de la resistencia intrínseca de los cultivares.

Al evaluar cinco concentraciones de inóculo (de 0 a 60 000 esporas por mililitro), se observó un aumento en el porcentaje de mortalidad y de plantas con lesión al incrementarse la concentración. Estos resultados sugieren que 60 000 esporas por milímetro es todavía una concentración baja de inóculo, pues es posible producir elevaciones en las variables de la enfermedad con el aumento de la concentración.

En el cv. SCA-6, el aumento de las concentraciones de inóculo tuvo mayor efecto sobre el porcentaje de mortalidad y de plantas con lesión, que en el cv. IMC-67, donde fue menos significativo.

La lesión promedio fue muy similar para los dos cultivares. Se encontró un desarrollo de la lesión similar al descrito por Chong (1), quien indica que el hongo una vez que ha penetrado produce la enfermedad a través de los vasos conductores. En esta investigación se observó el progreso de la necrosis hacia abajo y hacia los lados de los vasos del xilema, pero mayormente hacia arriba de la zona inoculada, notándose partes necrosadas aisladas sin conexión aparente con el resto de la necrosis.

Dado el comportamiento de la concentración de inóculo obtenido en el experimento anterior, en un segundo ensayo se trató de determinar el efecto de concentraciones superiores a 60 000 esporas por mililitro. Se determinó que al aumentar la concentración se dio un ligero incremento en el porcentaje de mortalidad y de plantas con lesión; sin embargo no fueron significativos seguramente porque aún la cantidad de 80 000 esporas por mililitro se encuentra dentro de los límites de concentración que permite diferenciar la susceptibilidad de los cultivares.

Los porcentajes de mortalidad y plantas con lesión fueron siempre mayores para los cvs. SCA-6 y UF-677 y menores para el cv. IMC-67. Esto concuerda con lo reportado por Soria y Salazar (13) acerca de la reacción de los cultivares. El comportamiento de los cvs. SCA-6 y UF-677 fue similar, comportándose ambos como susceptibles. El cv. IMC-67 mostró mayor resistencia. La selección inicial de estos tres cultivares se realizó con base en su reacción a *C. fimbriata* (13).

Con el método de la inoculación, la concentración de inóculo y el aislamiento, seleccionados anteriormente, se evaluó la descendencia de polinización abierta de siete cultivares de cacao. Los cultivares se seleccionaron por la disponibilidad de semilla, la posible variación en su reacción a *C. fimbriata*, su utilización como padres en la producción de semilla híbrida y su recomendación como patrones para plantaciones intensivas con material clonal. El método usado en esta investigación, además de obtener resultados reproducibles, es fácil de llevar a cabo y es económico. Aunque se advirtió una alta incidencia de la enfermedad en los cultivares probados, se pudieron separar por su grado de resistencia o susceptibilidad a *C. fimbriata*.

Los cvs. Catongo e IMC-67 mostraron la más alta resistencia. El que mejor se comportó fue el cv. Catongo con 0% de mortalidad, lo que indica su grado de resistencia. Ryniers (11), al inocular plantas de 2.5 meses del cruce 'Catongo' x 'Pound-7', lo encontró también resistente.

La reacción de algunos cultivares no concuerda con los informes de autores como Chong (1), que, al estimar plantas clonales de seis meses de edad del cv. SCA-6, lo menciona como resistente a este material; sin embargo, en la presente investigación se comportó como susceptible. Se debe considerar que el material usado en este estudio es de polinización abierta, en la cual no se conoce el nivel de resistencia del padre. Otro elemento por considerar fue que Chong (1) usó plantas de diferente edad y otra metodología de inoculación (discos de micelio-agar) que pudo influir en los resultados.

En el experimento 26 de la estación "La Lola" del CATIE (6) se encontró una mortalidad para 'Pound-12' del 80 % en 12 años de registro, lo cual pareciera confirmar los resultados de la presente investigación; sin embargo, hay que considerar que la mortalidad de árboles en ese experimento fue atribuida a *C. fimbriata*, pero no fue corroborada mediante reaislamientos del hongo en laboratorio, por lo que no se pueden descartar otras causas en la muerte de árboles.

El cv. SPA-9 en esta investigación presentó alta mortalidad, que coincide con Ryniers (11), quien encontró que el cv. SPA-9, en cruces recíprocos con el cv. UF-613, era susceptible. No obstante, en las investigaciones de Delgado (2) y Delgado y Echandi (3) con trocitos de ramas maduras desprendidas del árbol, el cv. SPA-9 mostró una reacción altamente resistente. Estas diferencias pueden explicarse por el uso de tejidos no activos de la planta y las características de los aislamientos utilizados.

De las variables medidas, el porcentaje de plantas muertas fue el que tuvo mayor relevancia. Este parámetro experimentó mayor incremento en los primeros 25 d, aunque se mantuvo durante los 45 d de evaluación, por lo que sería conveniente hacer un estudio para un período mayor de tiempo.

Los resultados de esta investigación demuestran la amplia variabilidad de *C. fimbriata* en Costa Rica, que implica un alto riesgo en el establecimiento de plantaciones clonales, en las cuales se utilicen uno o pocos cultivares de cacao. Además indica los amplios límites de virulencia detectados, aspecto muy importante para tener en cuenta en el programa de mejoramiento. También se demuestra la susceptibilidad a *C. fimbriata* de varios cultivares usados por los agricultores. Asimismo se establece un método confiable para detectar niveles de resistencia y susceptibilidad a *C. fimbriata* en el germoplasma de cacao.

LITERATURA CITADA

1. CHONG, F.L. 1961. Desarrollo de la infección natural de la resistencia clonal a *Ceratocystis fimbriata*. Tesis Ing. Agr. Ec., Universidad de Guayaquil, Facultad de Agronomía y Veterinaria. 120 p.

2. DELGADO, C.J. 1964. Estudio de la resistencia del cacao al mal del machete producido por *Ceratocystis fimbriata* Ellis & Halsted. Tesis Mag. Sc., Turrialba, C.R., IICA. 42 p.

3. DELGADO, C.J.; ECHANDI, E. 1965. Evaluación de la resistencia de especies y clones de cacao al mal del machete provocado por *Ceratocystis fimbriata*. Turrialba 15:286-289.

4. DOMINGUEZ, P.F. 1971. Avance del trabajo sobre selección de plantas de cacao (*Theobroma cacao* L.) por resistencia a *Ceratocystis fimbriata*. Revista de la Facultad de Agronomía 6(2):5-29.

5. ESPINOZA, A.; DELGADO, J. 1970. Factores intrínsecos que influyen en la eficacia de la prueba de laboratorio usada para evaluar la resistencia a *Ceratocystis fimbriata*. Turrialba 21:13-17.

6. GARDELLA, S.D. 1980. Reaction of cocoa clones and hybrids to *Ceratocystis fimbriata* and inheritance of resistance. Tesis Mag. Sc., Turrialba, C.R., CATIE. 55 p.

7. GREENE, N.L.; BARNETT, H.L. 1951. Physiology of the fungi. New York, McGraw-Hill. 464 p.

8. MALAGUTTI, G. 1956. La necrosis del tronco del cacao en Venezuela. Agronomía Tropical 5(4):207-226.

9. MONTES DE OCA, H.A. 1975. Estudio de la resistencia a *Ceratocystis fimbriata* Ellis & Halsted en híbridos y clones de cacao (*Theobroma cacao* L.) utilizando dos métodos de evaluación. Tesis Mag. Sc., Turrialba, C.R., CATIE. 62 p.

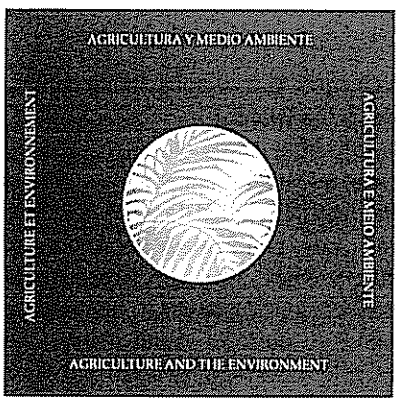
10. RUIZ, M.; JIMENEZ, S.W.; SORIA, J. 1969. Método colorimétrico para evaluar la resistencia del cacao (*Theobroma cacao* L.) a *Ceratocystis fimbriata*. Turrialba 19:518-521.

11. RYNIERS, K. 1987. Estudio de la resistencia de seis híbridos de cacao a *Ceratocystis fimbriata*. Turrialba, C.R., CATIE, Laboratorio de Fitopatología. 23 p. (Mimeografiado).

12. SAUNDERS, J.L. 1965. El complejo *Xyleborus-Ceratocystis* del cacao. Cacao 10(2):8-14.

13. SORIA, J.; SALAZAR, L.G. 1965. Pruebas preliminares de resistencia de *Ceratocystis fimbriata* en clones de cacao. Turrialba 15:290-295.

LIBRO RECOMENDADO



US$20.00

Agricultura y Medio Ambiente. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. Cuatrilingüe en español, inglés, francés y portugués. 76 p. ISBN 92-9039-193-6.

El testimonio gráfico de fotógrafos de diversos lugares del continente americano plasma el dramático dilema de cómo el desbordante crecimiento tecnológico está llevando a la humanidad al borde de la destrucción de su ambiente natural. La gran calidad artística de esta publicación fue posible, también, gracias al generoso apoyo de la Agencia Canadiense para el Desarrollo Internacional (ACDI).

Ver lista de publicaciones disponibles para la venta y boleta de solicitud en la última sección de la revista Turrialba.