

## Sistema de reproducción sexual y eficiencia reproductiva en clones de cacao (*Theobroma cacao* L.) tipo Nacional y Trinitario.

Luis Vera Pinargote<sup>1\*</sup>, Luz García Cruzatty<sup>12\*</sup>.

<sup>1</sup>Facultad de Ingeniería Agronómica, Universidad Técnica de Manabí, Campus La Teodomira, Lodana, Manabí, Ecuador.

<sup>2</sup>Universidad Técnica Estatal de Quevedo, Facultad de Ciencias Ambientales, Quevedo, Los Ríos, Ecuador.

\*luis-david@live.com, cecilia29@hotmail.com

**Abstract:** In Ecuador, *Theobroma cacao* L has great economic importance as an export subject; however, the yields are low compared to the main exporters (Ivory Coast, Ghana and Indonesia with approximate yields of 748, 490, 1103 kg ha<sup>-1</sup> year<sup>-1</sup> respectively). However, there is not enough scientific information to help determine which factors are related to low productivity in the country. The objective of this research work was to determine the system of sexual reproduction and reproductive efficiency in clones of *T. cacao* Type Nacional and Trinitario. It was carried out in a multiclonal trial established in the experimental campus "La Teodomira" in Lodana, Manabí and in the fine aroma cocoa farm "Victoria" in Cerecita, Guayas. The reproductive system was evaluated through the production of initial fruits after self-pollinations and manual cross-pollinations; and the reproductive efficiency index was determined by the proportion of fruits obtained after open pollination (*PN*) in relation to the fruits produced after manual pollination (*PM*), and the proportion of seeds by ovules formed after open and manual pollination. On average, 74% of the self-pollinated flowers were fertilized manually, and 79% of the fruits resulted when manual cross-pollinations were carried out, so that it was concluded that *T. cacao* is a self-algae species. A low reproductive efficiency index (*REI*) of  $0.08 \pm 0.11$  was calculated by comparing the production of fruits produced after natural pollination and those obtained by manual pollination. There was no statistical difference in the proportion of seeds per ovule obtained by *PN* and *PM*, from these data an elevated *REI* of  $1.02 \pm 0.03$  was obtained, calculated from the seed for ovules. On the other hand, *T. cacao* does not reproduce through agamospermy, since there was no fruit formation in the absence of male gametes in a total of 510 emasculated flowers and for the same number of flowers, the automatic pollination test was performed without results of self-fertilization. The knowledge of the reproductive system and the reproductive efficiency is fundamental to establish adequate strategies for genetic improvement and conservation in this species.

**Key Words:** fertilization, autoalógama, pollinations, seeds by ovules

## INTRODUCCIÓN

La historia económica del Ecuador ha estado estrechamente relacionada con el cultivo de cacao (*Theobroma cacao L.*), gracias a sus poblaciones nativas las cuales son conocidas a nivel mundial por su calidad organoléptica (Loor *et al.*, 2012). El cacao en la actualidad es la tercera materia prima más importante con propósito comercial en el mundo, después del azúcar y el café (Sinagap, 2017). Dentro de los principales productores de cacao se encuentran: Costa de Marfil, Ghana e Indonesia con rendimientos aproximados de 748, 490, 1103 kg ha<sup>-1</sup> año<sup>-1</sup> respectivamente, aportando así para la producción mundial con más del 70% (Anecacao, 2016).

Ecuador es el más importante productor de cacao fino de aroma en el mundo, pues este tipo de cacao que representa entre 6% y 8% de la producción mundial, en un 80% se origina en América Latina; en particular Ecuador que aporta con 54% de este total (Rodríguez, 2016). Sin embargo, la producción no supera los 300 kg ha<sup>-1</sup> año<sup>-1</sup> lo cual se atribuye a factores relacionados con la baja producción, entre los principales se encuentran: la edad avanzada de plantaciones (10 años en adelante), inadecuado manejo agronómico y el desconocimiento de la incompatibilidad genética de la especie (Quiroz & Amores, 2002).

Muchos autores han discutido la información acerca de las causas de incompatibilidad de la especie y así mismo sus implicaciones prácticas en diferentes procesos de mejoramientos genéticos (Knight & Rogers, 1955). Varios mecanismos de autoincompatibilidad, evitan la autofecundación de plantas y favorecen la heterocigosidad de especies vegetales. Estos mecanismos actúan en el nivel de inhibición del crecimiento de polen para la mayoría de las especies, o a nivel del ovario, lo que conduce a una falla en el desarrollo del embrión (Rea & Nasrallah, 2008; Takayama & Isogai, 2005)). El sitio de la reacción de incompatibilidad en el cacao no radica en el estilo sino en el saco embrionario, reacción que no está determinada hasta que los gametos masculinos llegan a estar en contacto con sus contrapartes femeninas (Lanaud *et al.*, 2017, Cope, 1962), todo esto asociado a los diferentes sistemas de reproducción sexual que depende tanto de factores genéticos (genes que controlan la autoincompatibilidad, sistema de reproducción sexual, madurez reproductiva) y ambientales (factores que influyen la fenología de la floración y el comportamiento de los polinizadores) (Banuet *et al.*, 1997).

Los productores de cacao en Ecuador desconocen la importancia de establecer genotipos autocompatibles e intercompatibles, pues la cantidad de frutos producidos están en dependencia de la compatibilidad genética de los genotipos, aunque exista una polinización exitosa, lo cual afecta directamente el potencial productivo de las variedades y por ende los rendimientos (Meza, 2016). Las vías de reproducción de sexual en *T. cacao* y la autoincompatibilidad ha sido objeto de estudio por mucho tiempo, por la importancia para determinar los diferentes procesos de mejoramiento e influencia sobre la productividad de las variedades y clones cultivados (Lanaud *et al.*, 2017). A pesar de que existe un sinnúmero de estudios sobre la reproducción sexual de *T. cacao*, la gran mayoría

se han realizado en individuos de origen Forastero y Trinitario. Es escasa la evidencia científica en esta temática en *T. cacao* Tipo Nacional, nativo de la Amazonía ecuatoriana, pues lo poco que se ha publicado al respecto constituyen tesis de grado.

Cabe destacar que la información sobre la eficiencia reproductiva es esencial para los trabajos de biología reproductiva y mejoramiento genético en *T. cacao*, ya que permite un mayor éxito en los cruzamientos controlados (Mena & García, 2014). En este trabajo se planteó como objetivos: establecer el sistema de reproducción sexual, calcular el índice de eficiencia reproductiva en *T. cacao*, tipo Nacional y determinar si existe interacción genotipo ambiente en las variables reproductivas producción de óvulos y semillas, pues las publicaciones al respecto para estos genotipos, nativos de Ecuador, son escasos y este conocimiento es primordial en el establecimiento de nuevos planes de conservación y mejoramiento genético.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El presente estudio se realizó en el ensayo multiclonal establecido en los predios de la hacienda “La Teodomira” propiedad de la Facultad de Ingeniería Agronómica de la Universidad Técnica de Manabí, ubicada en la parroquia Lodana del cantón Santa Ana, provincia de Manabí, localizada geográficamente 01°09’51’’ de latitud Sur y 80°23’24’’ de longitud Oeste, con una altitud de 60 msnm. Las características climatológicas de esta área son: pluviosidad anual de 571,4 mm, humedad relativa 70.2%, temperatura promedio 26.58 °C y una heliofanía de 1146. Y en la hacienda “Victoria” en el recinto la Cerecita de la provincia del Guayas, ubicada a una latitud Sur 2°20’ y longitud Oeste 80°30’, con una altitud de 40 msnm, temperatura promedio anual de 25,4, humedad relativa de 75%, pluviosidad anual de 680,6 mm y 1356 de heliofanía (INAMHI, 2017).

### *Material vegetal*

Se evaluaron 19 clones de *T. cacao*, 18 materiales Tipo Nacional originarios de la colección CCAT (Centro de cacao fino y de aroma Tenguel) y un trinitario conocido como CCN-51. En la Hacienda La Teodomira los siguientes: EET-103, CCN-51, L29-H04, L21-H38, L26-H64, L11-H19, L21-H43, L46-H57, L18-H58, L46-H75, L49-H98, L46-H88 y en la Hacienda La Victoria; EET-103, CCN-51, EET-558, EET-544, EET-95, EET-96, EET-575, EET-576, EET-19. De los cuales los genotipos en la Hacienda La Teodomira codificados como L11-H19 y L49-H98 están codificados EET-544 y EET-558 en la Hda la Victoria respectivamente.

### *Sistema de reproducción*

Para determinar el sistema de reproducción se realizaron ensayos de polinización artificial (autopolinizaciones y polinizaciones cruzadas) (García *et al.*, 2017). En un total de 19 clones de *T. cacao*, se realizaron pruebas de polinización natural, polinización manual, pruebas de polinización automática y apomixis. Las polinizaciones manuales se efectuaron en el periodo de receptividad estigmática comprendido entre 11h00 y 14h00

(Mena & García, 2014). Se consideró que una flor había sido fecundada cuando después de las 48 horas permanecía prendida al árbol y se notaba un ovario inicialmente hinchado (Mena & García, 2014).

Para comprobar que en *T. cacao* no hay autopolinización y autofecundación automática se encapsularon 510 botones florales sin emasculados y luego transcurridas las 48 horas se retiraron los tubos y se realizó el respectivo registro. Para valorar geitonogamia se ejecutó la prueba de autopolinización manual, para lo cual se aislaron 30 botones florales y luego transcurridas las 24 horas se procedió a auto-polinizar manualmente los clones en estudio, después de 48 horas se registraron el número de flores fecundadas. Para determinar xenogamia se realizó la prueba de polinización cruzada, para lo cual se encapsuló 30 botones florales en preantesis; después de 24 horas se realizaron las polinizaciones utilizando polen de individuos coespecíficos y luego de 48 horas se revisó las flores para registrar si hubo o no fecundación.

Para confirmar la agamosperma en *T. cacao*, se encapsuló 510 flores en preantesis previamente emasculadas, transcurridas las 48 horas se evaluó la posible formación de fruto en ausencia del gameto masculino.

#### *Índice de autoincompatibilidad (IAC)*

El IAC se calculó a partir de la relación fruto por flor producidos por autopolinización manual y entre la relación fruto por flor producidos por fertilización cruzada manual. Índices con valores mayores de 0,2 indicarán autogamia y autocompatibilidad genética, y valores menores indicarán autoincompatibilidad (Zapata & Arroyo, 1978).

#### *Índice de eficiencia reproductiva (IER)*

La eficiencia reproductiva se determinó a través de tres índices: el cociente entre la producción natural de semillas (en flores polinizadas por insectos), la producción de semillas después de polinización cruzada manual y la proporción flor por fruto y la proporción óvulo por semilla.

Para determinar el índice de eficiencia reproductiva mediante las proporciones flor por fruto se calculó el cociente entre la producción natural de frutos iniciales (en inflorescencias que habían sido polinizadas por insectos) y la producción de frutos después de polinización cruzada (Polinización manual). Para obtener el índice de frutos fecundados a partir de la polinización natural, se marcó 30 botones florales en preantesis (sin encapsular), después 72 horas se evaluó el número de flores fecundadas (Mena & García, 2014).

Para calcular el IER semilla por fruto se realizó el conteo de semillas por fruto (mazorca) por cada clon en estudio, para lo cual se colectó 10 frutos por cada clon (10 repeticiones). El IER óvulo por semilla se calculó a partir de la proporción semillas por fruto y la proporción óvulos por ovario obtenidos después de la polinización manual y después de la polinización natural.

### Análisis estadístico

Las variables evaluadas fueron: proporción flores polinizadas/ flores fecundadas; semillas viables producidas por fruto y número de óvulos por ovario. Los parámetros estadísticos que se calcularon son: la media, la error estándar, y la varianza. Se realizó una comparación entre la proporción fruto por flor y óvulo por ovario formados después de autopolinización y polinización cruzada, utilizando la prueba Kolmogórov-Smirnov ( $p < 0,05$ ). Los promedios del número de óvulos para los clones en estudio (un rameto por clon) fueron contrastados mediante una comparación múltiple, utilizando la prueba de Kruskal Wallis ( $p < 0,05$ ). Se realizó una comparación múltiple, mediante la prueba de Kruskal Wallis ( $p < 0,05$ ), del número de semillas obtenidas a partir de polinización manual y polinización natural por clon; además se comparó los dos sistemas de polinización mediante la prueba Kolmogórov-Smirnov ( $p < 0,05$ ).

### RESULTADOS

**Cuadro 1.** Índice de autocompatibilidad (IAC) en clones de *Theobroma cacao L.*, en la hacienda experimental La Teodomira, provincia de Manabí y la hacienda La Victoria\* provincia de Guayas.

Clones	Autopolinización			Polinización cruzada			IAC
	F.P	F.I	Fruto/Flor	F.P	F.I	Fruto/Flor	
L11-H19	53	44	0,83	299	261	0,87	0,95
L49-H98	66	32	0,48	46	31	0,67	0,72
EET-103	71	53	0,75	184	159	0,86	0,86
CCN-51	100	78	0,78	227	212	0,93	0,84
L29-H04	70	52	0,74	182	156	0,86	0,87
L21-H38	121	81	0,67	172	136	0,79	0,85
L26-H64	118	99	0,84	25	23	0,92	0,91
L21-H43	95	79	0,83	32	29	0,91	0,92
L46-H57	85	70	0,82	41	37	0,90	0,91
L18-H58	73	53	0,73	22	16	0,73	1,00
L46-H75	72	57	0,79	37	34	0,92	0,86
L49-H98	75	52	0,69	28	20	0,71	0,97
L11-H19 *	30	12	0,50	80	34	0,43	0,94
L49-H98*	30	8	0,60	80	33	0,41	0,89
EET-103*	30	11	0,50	80	35	0,43	0,61
CCN-51*	30	15	0,70	80	41	0,51	0,98
$\bar{X}$	85,75	49,75	0,70 ( $\pm 0,12$ ) a	87,73	66,40	0,74 ( $\pm 0,19$ ) a	0,95 ( $\pm 0,06$ )

F.P= Flor Polinizada, F.I= Fruto Inicial, Flor/Fruto= Proporción Fruto por Flor.  
Prueba Kolmogórov-Smirnov,  $p = < 0,00$

Según los resultados *T. cacao* es una especie autoalógama, pues presentó altos índices tanto de autocompatibilidad como compatibilidad interclonal. El índice de autocompatibilidad se calculó en un promedio de 0,95. Después de las pruebas de

polinización cruzada se obtuvo un 74% de frutos por flor, similar a la proporción de frutos por flor obtenidos luego de autopolinizaciones 70% (Cuadro 1).

**Cuadro 2.** Polinización automática (Autogamia) y reproducción asexual (Agamospermia) en clones de *Theobroma cacao* L., en la hacienda experimental La Teodomira (\*) provincia de Manabí y la hacienda La Victoria (\*\*) provincia de Guayas.

CLONES	Autopolinización Automática			Agamospermia	
	F.P	F.F	F.E	F.F.	
**EET-544	40	0	40	0	
**EET-558	40	0	40	0	
**EET-95	30	0	30	0	
**EET-96	30	0	30	0	
**EET-575	30	0	30	0	
**EET-576	30	0	30	0	
**EET-19	30	0	30	0	
*EET-103	40	0	40	0	
*CCN-51	40	0	40	0	
*L29-H04	30	0	30	0	
*L21-H38	30	0	30	0	
*L26-H64	30	0	30	0	
*L11-H19	30	0	30	0	
*L21-H43	30	0	30	0	
*L46-H57	30	0	30	0	
*L18-H58	30	0	30	0	
*L46-H75	30	0	30	0	
*L49-H98	30	0	30	0	
*L46-H88	30	0	30	0	
$\bar{X}$	510	0	510	0	

(F.E= Flor Emasculada, F.P= Flor Polinizada, F.F= Formación de Frutos).

La especie *T. cacao* no se reproduce a través de agamospermia, pues no hubo formación de frutos en ausencia de gametos masculinos en un total de 510 flores emasculadas para todos los individuos estudiados (Cuadro 2). Para el mismo número de flores, se realizó la prueba de autopolinización automática sin resultados de autofecundación (Cuadro 2).

**Cuadro 3.** Índice de eficiencia reproductiva (IER) en clones de *Theobroma cacao* L., tipo Nacional y Trinitario, hacienda experimental La Teodomira (T1=Polinización natural, T2=polinización manual).

		EET-103	CCN-51	L29-H04	L21-H38	L26-H64	L11-H19	%
T1	Flores <sup>a</sup>	22	21	26	10	24	17	
	Frutos <sup>b</sup>	0	1	6	0	3	0	
	a/b	0	0,05	0,23	0	0,13	0	6,8(±0,09) b
T2	Flores <sup>a</sup>	81	100	70	121	118	53	
	Frutos <sup>b</sup>	65	79	60	88	91	40	
	a/b	0,8	0,79	0,86	0,73	0,77	0,75	78,3(±0,04) a
IER		0	0	0,06	0,27	0	0,16	0,08

Medias con letras en común son iguales (Kruskal Wallis,  $p < 0.05$ )

Los resultados muestran una producción de frutos muy baja después de la polinización natural, se calculó en 6,8% en un rango de 0 a 23%. No obstante, luego de las polinizaciones manuales se obtuvo un promedio de 78 % en un rango de 73 a 86 %, muy superior al promedio obtenido después de la polinización natural. Se calculó el índice de eficiencia reproductiva en un promedio de  $0,08 \pm 0,1$  en un rango de 0 a 0,27. En el clon L29-H04 se obtuvo el mayor IER (0,27), mientras que en los clones EET-103, L21-H38 y L11-H19 no tuvieron fecundación natural, lo que deja al descubierto la baja eficiencia de la especie para formar frutos en condiciones naturales (Cuadro 3).

**Cuadro 4.** Número de óvulos por ovario y semillas por fruto en clones de *Theobroma cacao* L. en La Hacienda la Victoria y Hacienda La Teodomira.

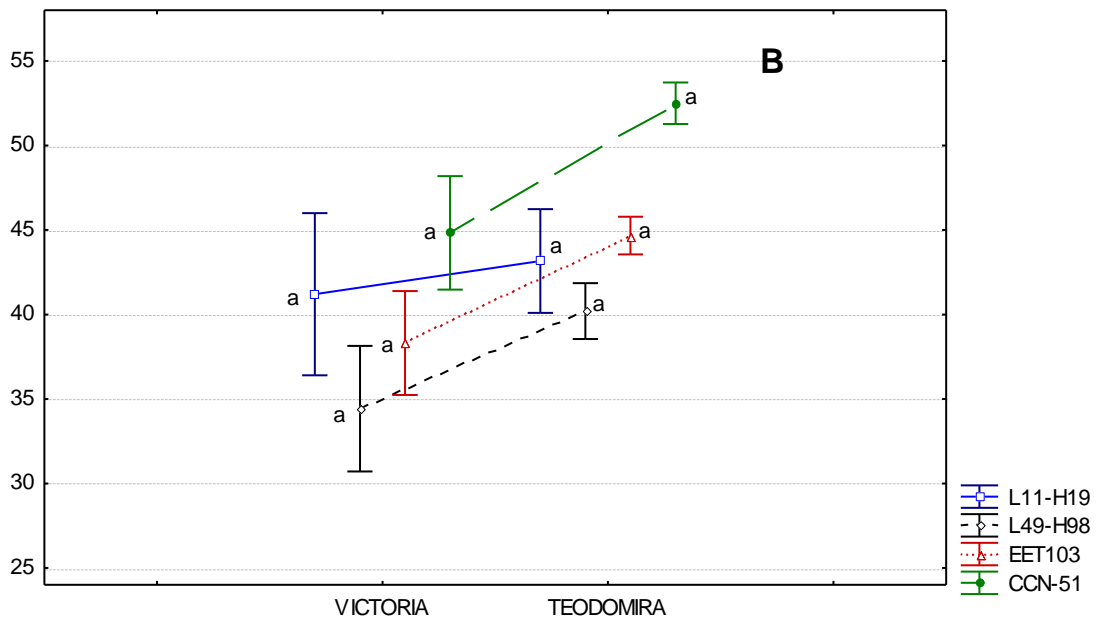
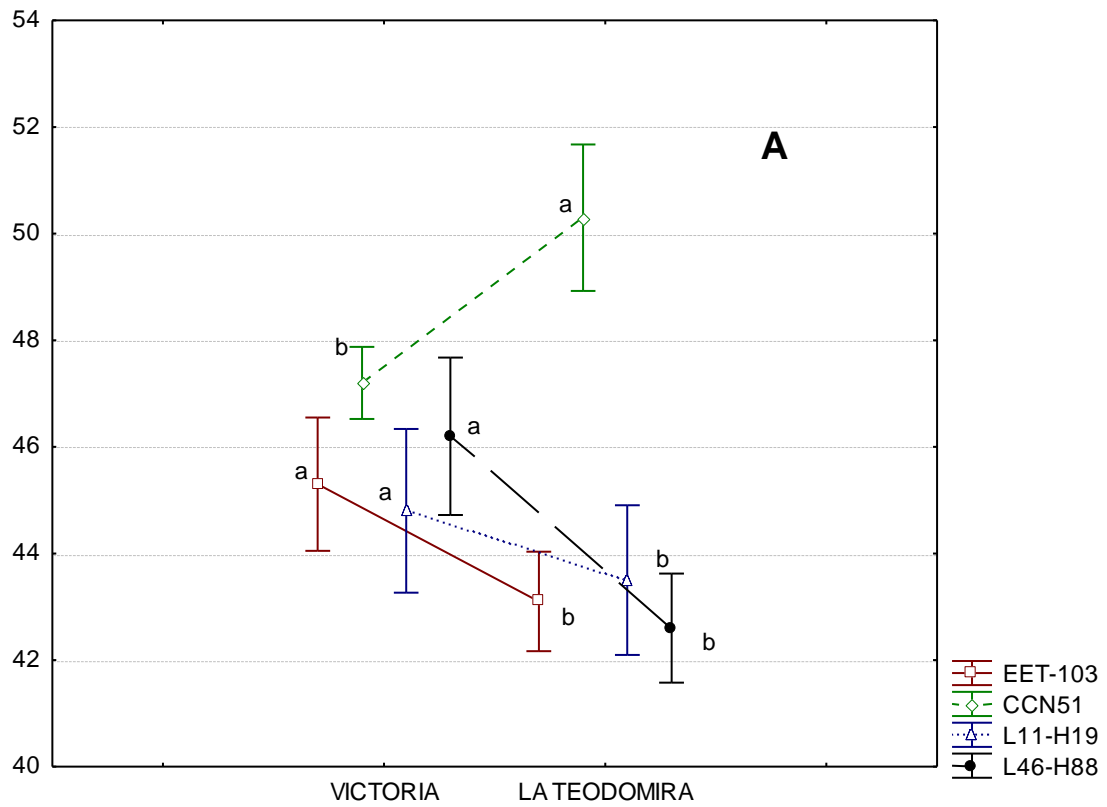
Clones	Número de óvulos por ovario		Número de semillas por fruto	
	La Teodomira	La Victoria	La Teodomira	La Victoria
EET-103	43,1 (±3,1) b	45,3 (±4,2) a	44,7 (±2,8) b	37,5 (±12,9) a
CCN-51	50,3 (±4,6) a	47,2 (±2,2) a	52,5 (±4,3) a	44,8 (±8,7) a
L11-H19	43,5 (±4,7) b	44,8 (±5,1) a	43,16 (±7,9) b	41,2 (±16) a
L49-H98	45,1 (±5,7) b	46,2 (±4,9) a	40,2 (±4,3) b	34,4 (±14) a
$\bar{x}$	45,5	45,3	45,34	39,7

Medias con letras en común no son significativamente diferentes (Kruskal Wallis,  $p < 0.05$ ).

Los clones de *T. cacao* evaluados tienen un promedio de 45 óvulos por ovario, el mayor número de óvulos se registró en el clon CCN-51, tanto en la hacienda Teodomira como en Victoria (50,3 y 47,2 respectivamente), mientras que el clon EET-103 se registró el menor número (43,1±3,1), mostrando diferencia estadística (Kruskal Wallis,  $< 0,05$ ). En la variable número de semillas por fruto en clon CCN-51 también tuvo el mayor número de semillas 44,7 y 44,8 en la Teodomira y la Victoria respectivamente, aunque solo en la Teodomira se encontró diferencia estadística al contrastar las medias de los clones (Cuadro 4). Al contrastar las medias de cada clon por localidad no se presentaron diferencias estadísticas (Gráfico 1).

**Gráfico 1.** Interacción genotipo ambiente en la producción de óvulos por ovario\* (A) y semillas por fruto (B) en clones de *T. cacao*, “Hacienda la Teodomira” (provincia de

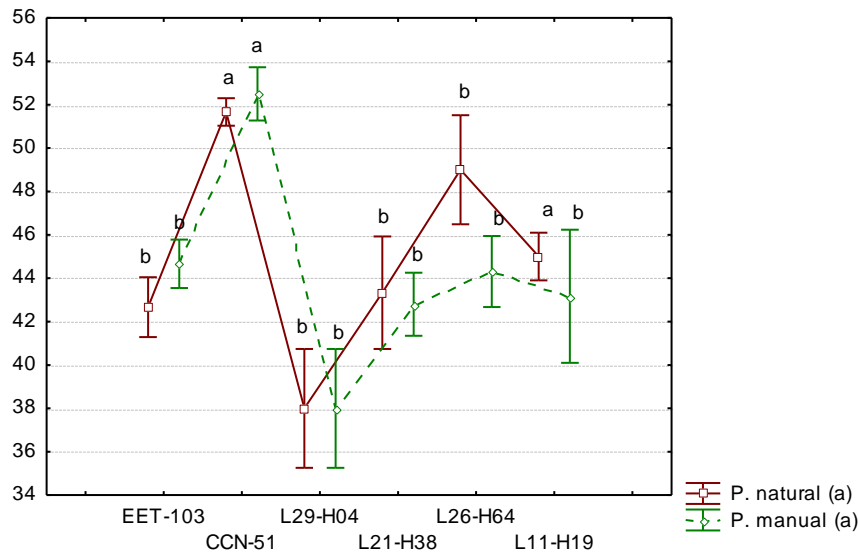
Manabí) y “Hacienda la Victoria” (provincia del Guayas). Las barras representan el error estándar.



\* Letras diferentes significan diferencia estadística entre localidades, Kruskal Wallis  $p < 0,000$



**Gráfico 2.** Número de semillas por fruto en clones de *Theobroma cacao* después de polinización manual y polinización abierta. Las barras representan el error estándar.



Medias con letras en común no son significativamente diferentes (Kruskal Wallis,  $p < 0.05$ ).

No se encontró diferencia estadística para el número de semillas por fruto bajo las pruebas de polinización natural, obteniendo un promedio de  $44,39 \pm 4,46$  en un rango de 38 (L29-H04) a 51,67 (CCN-51). No obstante, tras las pruebas de polinización manual si se encontró diferencia estadística significativa en el clon CCN-51, quien presentó un mayor número de semillas por fruto ( $53 \pm 3,66$ ), resultados relacionados al número promedio de óvulos obtenidos en pruebas realizadas en el presente estudio, donde en clon CCN-51 mostró un promedio de óvulos de  $51 \pm 4,13$ . Por otra parte, no se encontró diferencias significativas entre el número de semillas obtenidas a partir de polinización manual y polinización natural (Gráfico 2).

**Cuadro 5.** Número de óvulos por ovario y formación de semillas por óvulo en clones de *T. cacao*. Se calculó el índice de eficiencia reproductiva (IER) ( $\text{Óv} = \text{Óvulos}$ ,  $\text{T1} = \text{Semillas por Polinización natural}$ ,  $\text{T2} = \text{Semillas por polinización manual}$ ),  
Hacienda Teodomira

	EET-103	CCN-51	L29-H04	L21-H38	L26-H64	L11-H19	$\bar{x}$
Óv	43,10	50,30	44,50	44,30	48,70	43,50	45,73 ( $\pm 3,01$ )
T1	42,67	51,67	38,00	43,33	45,67	45,00	44,39 ( $\pm 4,47$ )
T2	44,67	52,50	38,00	42,80	44,31	43,16	44,24 ( $\pm 4,70$ )
T1/Óv	0,99	1,03	0,85	0,98	0,94	1,03	0,97 ( $\pm 0,06$ )
T2/Óv	1,04	1,04	0,85	0,97	0,91	0,99	0,97 ( $\pm 0,07$ )
IER	0,96	0,98	1,00	1,01	1,03	1,04	1,00 ( $\pm 0,03$ )

No hubo diferencia entre el número de semillas por óvulos obtenidas después de las pruebas de polinización natural y de polinización manual, se obtuvo un promedio de  $0,97 (\pm 0,08)$  semillas por óvulo. El IER calculado a partir de estos datos fue alto, en un

promedio de 1,0 ( $\pm 0,03$ ) semillas por óvulo en los clones evaluados, en un rango de 0,96 a 1,04 (Cuadro 5).

## DISCUSIÓN

Los ensayos realizados sugieren que *Theobroma cacao* L. es una especie autoalógama, pues los clones evaluados presentaron un alto porcentaje de autofecundación y también de fecundación cruzada; equivalente a los resultados obtenidos en estudios de compatibilidad realizados en 10 clones de *T. cacao* (3 originarios de Trinidad y 7 de Costa de Marfil), en los que se obtuvo tanto fecundación cruzada (10 a 22 %) como autofecundación (3 a 37 %) (N'Zi *et al.*, 2017). Un estudio de cinco clones de *T. cacao* tipo Nacional y dos tipos Trinitarios, en el Litoral ecuatoriano, permitió determinar un 60 % fecundación cruzada y 76 % de autofecundación después de polinización manual (Meza, 2016), resultados similares a los obtenidos en el presente estudio donde se calculó un índice promedio de  $0,92 \pm 0,04$  en un rango de 0,8 a 1,0, lo que permite reafirmar el alto grado de autocompatibilidad que posee *T. cacao* para los genotipos de tipo Nacional.

Lanaud *et al.*, (2017) evidenciaron que *T. cacao* presenta un sistema de autoincompatibilidad controlado por un sistema gametosporofítico tardío expresado solo a nivel del saco embrionario que resulta en la no fusión de gametos e involucra varios loci, lo cual podría estar relacionado con el material genético estudiado, pues el mismo autor estudió genotipos de Tipo Criollo y Forastero Amelonado. Por otra parte, Lachenaud *et al* (2007) realizaron pruebas de autocompatibilidad en 67 clones de *T. cacao* originarios de Paracou-Combi (Sinnamary, French Guiana), demostrando que la mayoría de individuos eran autoincompatibles (58%) o levemente autocompatibles (34%), pues, entre el 15 y 25% de las autopolinizaciones resultaron en fruto (Lachenaud *et al.*, 2007).

No se evidenció la formación de fruto en los clones evaluados de *T. cacao* en ausencia de gametos masculinos. Además, se confirmó que no ocurre autopolinización automática, lo que significa que en estos clones se puede realizar polinización cruzada manual sin necesidad de realizar emasculación previa. Esto se explica por la estructura de la flor que impide la autopolinización por presentar hercogamia de aproximación. Otro aspecto de la morfología floral que también impide la autofecundación es que las anteras están recurvadas hacia afuera, rodeadas por los pétalos y separadas del estigma por los estaminodios (Chanatásig & Aguilar, 2004).

En el presente estudio la fecundación natural fue baja (6,8%), pues la formación de frutos iniciales después de polinización manual fue notablemente mayor con relación a los frutos formados en condiciones naturales. La baja producción de frutos en condiciones de polinización abierta parece estar relacionada con la insuficiente llegada de polen a los estigmas receptivos (Mena & García, 2014), se la relaciona con una ineficiente carga de polen que transportan los polinizadores, limitando la formación de frutos (Bawa *et al.*, 2001).

El promedio de óvulos por ovario *T. cacao* se calculó en  $43 \pm 4,29$ . Similarmente, en el Centro Nacional de Investigación Agronómica, estación Abengourou en Côte d'Ivoire,

se calculó  $52,6 \pm 1,76$  óvulos por ovario, en individuos de tres progenies (Forastero Amazónico como padre (Catongo) y como madres: IMC78 de tipo Forastero Amazónico y los clones DR1 y S52 tipo Trinitario) (Clement *et al.*, 2003). En cambio, en 114 clones de *T. cacao*, originarios de Brasil y otros países de América y El Caribe se registró un promedio de 38 a 65 óvulos por ovario (Cilas *et al.*, 2010). De acuerdo a Bahia & Corrêa, (2013), esta característica es estable para diferentes individuos en cultivares o poblaciones; sin embargo, es variable entre los diferentes grupos genéticos, por lo que podría utilizarse para la caracterización del material genético, estudiar la variabilidad de las poblaciones y como un descriptor clonal en los planes de mejoramiento genético de la especie (Cilas *et al.*, 2010).

En el presente trabajo no se encontró diferencia estadística significativa para el número de semillas por fruto bajo las pruebas de polinización natural, obteniendo un promedio de  $44,39 \pm 4,46$ . Resultados similares se obtuvieron en la estación de investigación IDEFOR-DCC en Divo, Costa de Marfil, donde evaluaron en dos clones de *T. cacao*, IFC5 (Forastero Bajo-Amazónico), y SCA6 (Forastero Alto-Amazónico), (Falque, Lesdalons, & Eskes, 1996), donde se obtuvo un promedio de 45 semillas por fruto en el clon IFC5 y de 3 hasta 58 en el clon SCA6 en condiciones de polinización abierta (Falque *et al.*, 1996). No obstante, en clon IFC5 mostró una distribución normal del número de semillas por fruto, la polinización abierta no fue significativamente diferente de lo observado después de una polinización manual (Falque *et al.*, 1996), resultados que coinciden con lo expuestos en este estudio donde tampoco se observó diferencia estadística significativa en los métodos de polinización.

En cambio, en Ghana en un jardín multiclonal de 116 clones de *T. cacao* se calculó un promedio de 33,7 semillas por fruto después de polinización natural (Ofori, Padi, Ansah, Akperterey, & Anim-Kwapong, 2016). Cilas *et al.*, (2010) mencionan que la cantidad de semillas por fruto depende fuertemente de factores genéticos que afectan la fertilización de los óvulos, como la limitada fertilidad propia del óvulo, la autocompatibilidad reproductiva o autoincompatibilidad de genotipos, y las condiciones climáticas desfavorables para los genotipos y polinizadores (Cilas *et al.*, 2010).

No se mostró diferencia estadística significativa entre el número de semillas por óvulos obtenidas después de las pruebas de polinización natural y de polinización manual, la formación de semillas viables producidas por óvulos después de polinización natural y polinización manual fue del 100%. Datos que reflejan lo mencionado por Cilas *et al.*, (2010) quienes detallan que en condiciones de polinización estándar debería existir una relación lineal perfecta entre el número de óvulos por ovario y el número de semillas por fruto (Cilas *et al.*, 2010).

## AGRADECIMIENTOS

Al Ing. César Larco, gerente de la hacienda “La Victoria” por la colaboración en el establecimiento y monitoreo de los ensayos de polinización, al personal técnico y administrativo de esta misma hacienda y al Grupo de Investigaciones en Cacao de la Facultad de Ingeniería Agronómica por su valiosa ayuda y soporte logístico en las actividades de campo y de laboratorio.

## RESUMEN

En Ecuador *Teobroma cacao* posee una gran importancia económica como materia de exportación; sin embargo, los rendimientos son bajos comparados con los principales exportadores (Costa de Marfil, Ghana e Indonesia con rendimientos aproximados de 748, 490, 1103 kg ha<sup>-1</sup> año<sup>-1</sup> respectivamente). No obstante, la información científica sobre su biología reproductiva es escasa, aunque el conocimiento del sistema de reproducción y la eficiencia reproductiva son fundamentales para establecer estrategias adecuadas para el mejoramiento genético y conservación en esta especie. El presente trabajo de investigación tuvo como objetivo determinar el sistema de reproducción sexual y la eficiencia reproductiva en clones de *T. cacao* tipo Nacional y Trinitario. Se realizó un ensayo multiclonal establecido en el Campus experimental “La Teodomira” en Lodana, Manabí y en la hacienda de cacao fino de aroma “La Victoria” en Cerecita, Guayas. El sistema de reproducción se evaluó mediante la producción de frutos iniciales después de autopolinizaciones y polinizaciones cruzadas manuales; y el índice de eficiencia reproductiva se determinó mediante la proporción de frutos obtenidos tras la polinización abierta (*PN*) en relación con los frutos producidos tras polinización manual (*PM*), y la proporción de semillas por óvulos formadas después de polinización abierta y manual. En promedio, hubo fecundación en un 70% de las flores autopolinizadas manualmente, y resultó un 74% de frutos cuando se realizaron polinizaciones cruzadas manuales, por lo que se llegó a la conclusión de que *T. cacao* es una especie autoalógama. Se calculó un índice de eficiencia reproductiva (*IER*) bajo de  $0,08 \pm 0,11$  al comparar la producción de frutos producidos después de polinización natural y los obtenidos por polinización manual. No hubo diferencia estadística en la proporción de semillas por óvulo obtenidas por *PN* y *PM* con un *IER* de  $1,00 \pm 0,03$  calculado a partir de la proporción semillas por óvulos. *T. cacao* no se reproduce a través de agamospermia, pues no hubo formación de frutos en ausencia de gametos masculinos en un total de 510 flores emasculadas y para el mismo número de flores, se realizó la prueba de polinización automática sin resultados de autofecundación. Se evidenció interacción genotipo ambiente en la variable producción de óvulos por ovario, lo que puede explicarse por las diferentes condiciones, estarían relacionados con las diferentes condiciones climáticas y de manejo.

**Palabras Claves:** fecundación, autoalógama, polinizaciones, semillas por óvulos.

## REFERENCIAS

- Anecacao. (2016). Exportación Ecuatoriana De Cacao - 2015 Exportación Ecuatoriana De Cacao - 2015. *Asociación Nacional de Exportadores de Cacao*, 6p.
- Bahia, R. de C., & Corrêa, R. (2013). Inheritance of the Number of Ovules per Ovary and Selection of Cacao Genotypes. *American Journal of Plant Sciences*, 2013(July), 1387–1392. Retrieved from [http://file.scirp.org/Html/8-2600803\\_33991.htm](http://file.scirp.org/Html/8-2600803_33991.htm)
- Banuet, V., Rojas, A., Martinez, M., & Dávila, P. (1997). Pollination biology of two columnar cacti (neobuxbaumia mezcalensis and neobuxbaumia macrocephala) in the tehuacan valley. *American Journal of Botany*, 84(4), 452–455.
- Bawa, K. S., Ashton, P. S., Primack, R. B., Terborgh, J., Mohd., Ç., Nor, F. S. P. N., & Hadley, M. (2001). Reproductive Ecology Of Tropical Forest Plants.
- Chanatásig, C., & Aguilar, M. (2004). Inducción de la embriogénesis somática en clones superiores de cacao (*Theobroma cacao* L.), con resistencia a enfermedades fungosas. *Escuela de Posgrado, Programa de Educación Para El Desarrollo Y La Conservación Del Centro Agronómico Tropical de Investigación Y Enseñanza, MSc.*, 97.
- Cilas, C., Machado, R., & Motamayor, J. C. (2010). Relations between several traits linked to sexual plant reproduction in *Theobroma cacao* L.: Number of ovules per ovary, number of seeds per pod, and seed weight. *Tree Genetics and Genomes*, 6(2), 219–226. <https://doi.org/10.1007/s11295-009-0242-9>
- Clement, D., Risterucci, A. M., Motamayor, J. C., N’Goran, J., & Lanaud, C. (2003). Mapping quantitative trait loci for bean traits and ovule number in *Theobroma cacao* L. *Genome*, 46(1), 103–111. <https://doi.org/10.1139/g02-118>
- Cope, F. W. (1962). The mechanism of pollen incompatibility in *Theobroma cacao* L. *Heredity*, 17(2), 157–182. <https://doi.org/10.1038/hdy.1962.14>
- Falque, M., Lesdalons, C., & Eskes, A. B. (1996). Comparison of two cacao (*Theobroma cacao* L.) clones for the effect of pollination intensity on fruit set and seed content. *Sexual Plant Reproduction*, 9(4), 221–227. <https://doi.org/10.1007/s004970050035>
- García Cruzatty, L. C., Riegel, R., Rivero, M., Carrasco, J., & Droppelmann, F. (2017). Mating system and gene flow of *Nothofagus alpina* (Poepp. & Endl.) Oerst. in a clonal seed orchard. *New Zealand Journal of Forestry Science*, 47(1). <https://doi.org/10.1186/s40490-017-0094-2>
- INAMHI. (2017). Instituto Nacional de Meteorología e Hidrología. Ecuador.
- Knight, R., & Rogers, H. H. (1955). Incompatibility in *Theobroma cacao*. *Heredity*, 9(1), 69–77. <https://doi.org/10.1038/hdy.1955.3>
- Lachenaud, P., Paulin, D., Ducamp, M., & Thevenin, J. M. (2007). Twenty years of agronomic evaluation of wild cocoa trees (*Theobroma cacao* L.) from French Guiana. *Scientia Horticulturae*, 113(4), 313–321. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2007.05.016>
- Lanaud, C., Fouet, O., Legavre, T., Lopes, U., Sounigo, O., Eyango, M. C., ... Clément, D. (2017). Deciphering the *Theobroma cacao* self-incompatibility system: From genomics to diagnostic markers for self-compatibility. *Journal of Experimental Botany*, 68(17), 4775–4790. <https://doi.org/10.1093/jxb/erx293>
- Loor, R. G., Fouet, O., Lemainque, A., Pavék, S., Boccara, M., Argout, X., ... Lanaud, C. (2012). Insight into the Wild Origin, Migration and Domestication History of

- the Fine Flavour Nacional . Variety *Theobroma cacao* L. from Ecuador. *PLoS ONE*, 7(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048438>
- Mena, M. &, & García, L. (2014). Eficiencia reproductiva y receptividad estigmática en clones de cacao ( *Theobroma cacao* L .) en la zona central del Litoral Reproductive efficiency and stigmatic receptivity in cocoa clones ( *Theobroma cacao* L .) in the central area of the Ecuadorian coas. *MAGAP*, 1, 1–10.
- Meza, G. (2016). Sistema de reproducción sexual y morfología floral de cinco clones de cacao (*Theobroma cacao* L.) tipo nacional y dos trinitarios en la finca experimental La Represa. *Universida Técnica Estatal de Quevedo*, 1–96.
- N’Zi, J.-C., Kahia, J., Diby, L., & Kouamé, C. (2017). Compatibility of Ten Elite Cocoa (*Theobroma cacao* L.) Clones. *Horticulturae*, 3(3), 45. <https://doi.org/10.3390/horticulturae3030045>
- Ofori, A., Padi, F. K., Ansah, F. O., Akperthey, A., & Anim-Kwapong, G. J. (2016). Genetic variation for vigour and yield of cocoa (*Theobroma cacao* L.) clones in Ghana. *Scientia Horticulturae*, 213, 287–293. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2016.11.003>
- Quiroz, J., & Amores, F. (2002). *Rehabilitación de plantaciones tradicionales de cacao en Ecuador* (No. 63). *Manejo Integrado de Plagas* (Vol. 63). Costa Rica.
- Rea, A. C., & Nasrallah, J. B. (2008). Self-incompatibility systems: Barriers to self-fertilization in flowering plants. *International Journal of Developmental Biology*, 52(5–6), 627–636. <https://doi.org/10.1387/ijdb.072537ar>
- Rodriguez, J. A. (2016). Industria de Cacao. *Escuela Superior Politécnica Del Litoral (ESPAE)*, 1, 1–42.
- Seguí, J. (2010). *Biología y Biotecnología reproductiva de las plantas*. (Universida). Valencia-España.
- Takayama, S., & Isogai, A. (2005). Self-Incompatibility in Plants. *Annual Review of Plant Biology*, 56(1), 467–489. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.56.032604.144249>
- Zapata, T. R., & Arroyo, M. T. K. (1978). Plant Reproductive Ecology of a Secondary Deciduous Tropical Forest in Venezuela. *Biotropica*, 10(3), 221–230. <https://doi.org/10.2307/2387907>