

2017 International Symposium on Cocoa Research (ISCR), Lima, Perú, 13-17 November 2017.

Selección de genotipos de cacao (*Theobroma cacao* L.) de alto rendimiento y con tolerancia a las principales enfermedades que afectan al cultivo en Ecuador

Ignacio Sotomayor Cantos¹, Omar Tarqui Freire¹, Geover Peña Monserrate¹, Freddy Amores Puyutaxi², Rey Loor Solorzano¹, Teresa Casanova Mendoza¹ y Juan Carlos Motamayor³

¹ Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias. Estación Experimental Tropical Pichilingue. CP: 121250. Km 5 1/2 vía Quevedo – El Empalme, cantón Mocache, Los Ríos, Ecuador.

² Universidad Técnica Estatal de Quevedo. Facultad de Ciencias Agrarias, Carrera de Ingeniería Agronómica. Campus Ing. Manuel Haz Álvarez, km 1 1/2 vía a Santo Domingo de los Tsáchilas. CP: 120501. Cantón Quevedo, Los Ríos, Ecuador.

³ MARS Inc., 13601 Old Cutler Road, Miami, Florida 33158, United States of America.

RESUMEN

Se ejecutaron tres esquemas de cruzamientos para obtener progenies que permitan la selección de genotipos de cacao con alto rendimiento y tolerantes a las enfermedades. Los parentales se seleccionaron con base a criterios de productividad y sanidad a partir de colecciones vivas disponibles en la EET-Pichilingue y dos antiguas poblaciones híbridas en el mismo sitio (más de 50 años de edad). La primera población de progenies se obtuvo cruzando genotipos Alto amazónicos x Alto amazónicos; la segunda población se obtuvo cruzando genotipos de cacao de tipo Nacional x Alto amazónicos, mientras que la tercera provino del cruce entre genotipos de cacao tipo Nacional x Nacional. Al final se evaluó una población compuesta por 698 genotipos clonales de cacao, obtenidas de plántulas seleccionadas a partir de las poblaciones de progenies derivadas de los esquemas de cruzamientos antes mencionados. La evaluación se condujo en el periodo 2007-2013, los resultados permitieron la selección de plántulas híbridas y el desarrollo de al menos un par de clones (INIAPT 384 e INIAPT 484) dotados de precocidad, alta productividad y aceptable tolerancia a las enfermedades. Otros se han seleccionado por su valor como parentales para futuros planes de mejoramiento genético porque muestran un bajo nivel de afectación por escoba de bruja vegetativas (INIAPT 527, INIAPT 560 e INIAPT 526), otros a Moniliasis y escobas de bruja en el fruto (INIAPT-281, INIAPT-535, INIAPT-469, INIAPT-640, INIAPT-258 e INIAPT-647). El clon INIAPT 484 es auto compatible y cuenta con una capacidad rendimiento parecida a la de la variedad comercial CCN 51 en las zonas cacaoteras en que han sido comparados. Sus padres son cacaos silvestres Alto amazónicos y está dotado de un perfil sensorial muy particular. Los planes para entregarlo como una nueva variedad comercial en beneficio del sector cacaotero del Ecuador se encuentran avanzados. Este trabajo se cumplió dentro del marco del Convenio técnico-financiero INIAP-USDA/MARS que abarcó el periodo 2002-2013.

INTRODUCCIÓN

La escoba de bruja (*Moniliophthora perniciosa*) es la enfermedad que afecta a brotes jóvenes, cojinetes florales, yemas vegetativas y frutos jóvenes; esta enfermedad combinada con la *monilia* del fruto (*Moniliophthora roreri*), causan pérdidas anuales que superan en ocasiones el 50% del total de frutos producidos y en casos extremos pueden llegar hasta el 90% de pérdidas en la cosecha (Surujdeo-Maharaj, 2003). Por tal motivo, la obtención de variedades mejoradas con mayor valor económico, ayudaría a enfrentar este problema, por su efectividad, reduciría drásticamente el uso de fungicidas, haciendo un cultivo más amigable con el medio ambiente y más atractivo para los pequeños agricultores. Convirtiéndose en la mejor alternativa, desde el punto de vista económico, ambiental y de manejo agronómico para el productor (Johnson *et al.*, 2008).

Se ejecutaron tres esquemas de cruzamientos para obtener progenies híbridas que permitan la selección de genotipos de cacao con alto rendimiento y tolerantes a las enfermedades. Los parentales se seleccionaron en base a estos dos criterios, a partir de colecciones vivas y dos poblaciones híbridas antiguas disponibles en la EET-Pichilingue. La primera población de progenies se obtuvo cruzando genotipos Alto amazónico x Alto amazónico; la segunda población se obtuvo cruzando genotipos de cacao de tipo Nacional x Alto amazónico,

mientras que la tercera descendió del cruce entre genotipos de cacao tipo Nacional x Nacional. Al final se evaluó una población compuesta por 698 genotipos de cacao seleccionados a partir de las progenies derivadas de los esquemas de cruzamientos antes mencionados. La evaluación se condujo en el periodo 2007-2013, el objetivo de esta investigación fue la selección de genotipos de cacao derivados de híbridos de diverso origen dotados de precocidad, alta productividad, aceptable tolerancia a las enfermedades y calidad organoléptica, para una posterior liberación comercial y/o uso en nuevos programas de mejora genética. Esto se cumplió dentro del Proyecto Técnico-científico INIAP-USDA/MARS durante el periodo 2002-2013.

METODOLOGÍA

Ubicación del experimento y condiciones ambientales

La investigación se condujo en la Estación Experimental Tropical Pichilingue del INIAP durante el período de agosto 2006-noviembre 2013, ubicada en el km. 5 de la vía Quevedo-El Empalme (Mocache-Los Ríos), a una altitud de 85 msnm. Las coordenadas geográficas son 79° 21' Longitud Oeste y 1° 6' latitud Sur. La temperatura media es 24,1 °C, precipitación anual 2252 mm y heliofanía 894 horas luz (INAMHI, 2016).

Material genético

El antecedente de esta prueba fue la ejecución de un programa de cruzamientos dirigidos durante el periodo 2003 - 2004. Obteniendo de esta manera las tres poblaciones híbridas. Se planificaron 157 cruces, de los cuales provienen 91, 30 y 36 de las poblaciones A, B y C respectivamente. Logrando realizar 124 cruces, de las cuales provinieron 76, 22 y 26 familias híbridas de las poblaciones A, B y C, en su orden. En el 2004 se obtuvieron las mazorcas, que en el periodo 2004-2005 condujeron a la generación de igual número de progenies híbridas de los cruces planificados.

Los genotipos utilizados como progenitores para la población A fueron: LCT 368, EBC 148, LCT 37, LCT 46 que provienen de la Colección de cacao amazónico de “Allen” y los genotipos TIP 1, UNAP 2, CUR 3, TAP 6, TAP 12, TAP 3, TAP 10, AMAZ 11 y AMAZ 14 que provienen de la Colección amazónica de “Chalmers” y el CCN 51. En la población B se utilizaron como madres los clones EET 58, EET 233, EET 387, SIL 1 y CCN 51 y como padres los genotipos provenientes de poblaciones híbridas antiguas codificados como A 645, B 60, D 147, 2367, 2416 y 2057. Mientras que para generar la población C como madres se utilizaron los genotipos: Gloria 1, Gloria 3, Gloria 17, Brisas 13, Brisas 16 y Brisas 30 que provienen de árboles que se encontraban en fincas de agricultores de la zona de Manabí y como padres EB 1013, EB 2237, CCAT 1858, CCAT 4688, que se encuentran en la **Colección de Cacao Nacional** y SNA 0707, SNA 0708 provienen de la **Colección Nacional Arriba**. Cabe indicar, que la mayoría de los genotipos parentales utilizados en el estudio están presentes en el banco de germoplasma de cacao de la EET-Pichilingue del INIAP.

Factores en estudio y tratamientos

Las plántulas híbridas obtenidas de los esquemas de cruzamientos se mantuvieron durante los tres primeros meses en vivero, e inmediatamente se tomó una muestra de 10 plántulas de cada progenie híbrida, con la finalidad de ser trasladadas a una huerta de cacao de alta infección de inóculo con escoba de bruja. Aquellas plántulas fueron colocadas debajo de la copa de los árboles susceptibles a la enfermedad. Donde se evaluó la resistencia a escoba de bruja bajo condiciones de infección a nivel de campo. La determinación del nivel de resistencia en los individuos dentro de cada progenie, se realizó constatando la presencia o ausencia de síntomas de la enfermedad en brotes jóvenes.

Un total de 5524 plántulas fueron evaluadas en la huerta de alta infección, provenientes de 124 familias híbridas obtenidas dentro de las tres poblaciones. Se realizaron tres evaluaciones durante los doce meses de observación de la enfermedad. Los criterios de evaluación de la enfermedad fueron: 1) aquellas plantas que no presentaron incidencia de la enfermedad durante las tres evaluaciones, 2) aquellas plantas que presentaron incidencia de la enfermedad durante la primera evaluación y que en el resto de las evaluaciones no presentaron y 3) aquellas plantas que presentaron incidencia de la enfermedad pero con un valor < 0,60 para la relación diámetro de la escoba de bruja y diámetro de la base del punto infectado. Al final de la evaluación se seleccionaron 1109 plantas que exhibieron ausencia de síntoma de infección o solo mostraron síntomas débiles de la enfermedad. Más tarde se procedió a la multiplicación vegetativa de las plántulas híbridas, y posteriormente se sembraron en campo abierto para su evaluación 698 clones.

Para la presente investigación se seleccionaron 24 clones provenientes de plantas híbridas, que presentaron menor porcentaje de incidencia a la escoba de bruja. Los genotipos derivados de cruzamiento Alto amazónico x Alto amazónico, correspondientes a la población A fueron: INIAPT 094 (AMAZ 11 x TAP 3); INIAPT 484 (AMAZ 14 x EBC 148); INIAPT 258 (AMAZ 14 x UNAP 2); INIAPT 526, INIAPT 527 (TAP 6 x TIP 1); INIAPT 560 (TAP 3 x TIP 1); INIAPT 253 (EBC 148 x LCT 368). El genotipo correspondiente a la población B, derivado de los cruzamientos entre Nacional x Alto amazónico fue: INIAPT 535 (SIL 1 x 2416). Los genotipos derivados de cruzamiento Nacional x Nacional, correspondientes a la población C son: INIAPT 469 (EET 233 x 2057); INIAPT 529 (GLORÍA 1 x EB 2237); INIAPT 585, INIAPT 626, INIAPT 640, (EET 233 x A 645); INIAPT 647 (GLORÍA 17 x SNA 0707); INIAPT 661 (GLORÍA 3 x EB 2237); INIAPT 281 (EET 387 x D 147); INIAPT 041 (EET 387 x 2057); INIAPT 055 (GLORÍA 1 x CCAT 1858); INIAPT 326 (GLORÍA 3 x SNA 0707); INIAPT 328 (GLORÍA 1 x CCAT 1858); INIAPT 621 (EET 233 x B 60); INIAPT 668 (BRISAS 13 x SNA 0707); e INIAPT 670 (BRISAS 13 x SNA 0708). Adicionalmente se seleccionó al INIAPT 384 que procede del cruce entre CCN 51 x TAP 3. Como controles se utilizaron el TIP 1, TAP 6, A 645, EET 387, EET 233, SCA 6, EET 19, EET 103, JHV 10 y CCN 51. Las variables registradas durante el período diciembre 2007 - noviembre 2013 fueron: Número de mazorcas sanas, Peso fresco (gr.), Número de mazorcas enfermas con escoba de bruja, Número de mazorcas enfermas con Moniliasis, Número de escobas vegetativas, Número de escobas de cojinetes y Número de frutos chirimoyas.

Análisis Estadístico

Para visualizar el comportamiento multivariado de todos los individuos, se condujo un Análisis de Componentes Principales. Posteriormente se realizó un análisis multivariado de agrupamientos (Método de Ward) para estructurar la variabilidad entre genotipos. Al final se generaron varios grupos en función de niveles de similitud entre ellos. A partir de estos dos análisis elaborados, se obtuvo un diagrama de dispersión con todos los individuos, que se ubicaron de acuerdo a sus mejores características. Luego se exploró cada grupo utilizando un análisis univariado, de esta manera se identificaron individuos de gran interés. Este análisis permitió detectar posibles diferencias estadísticas entre aquellos clones. Cuando el valor de F era significativo ($P < 0.05$) se procedía a la separación de medias de clones para cada variable; con este propósito se utilizó la prueba de Tukey. Al final se identificaron genotipos que reunían el mayor número de características favorables en su nivel más alto.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

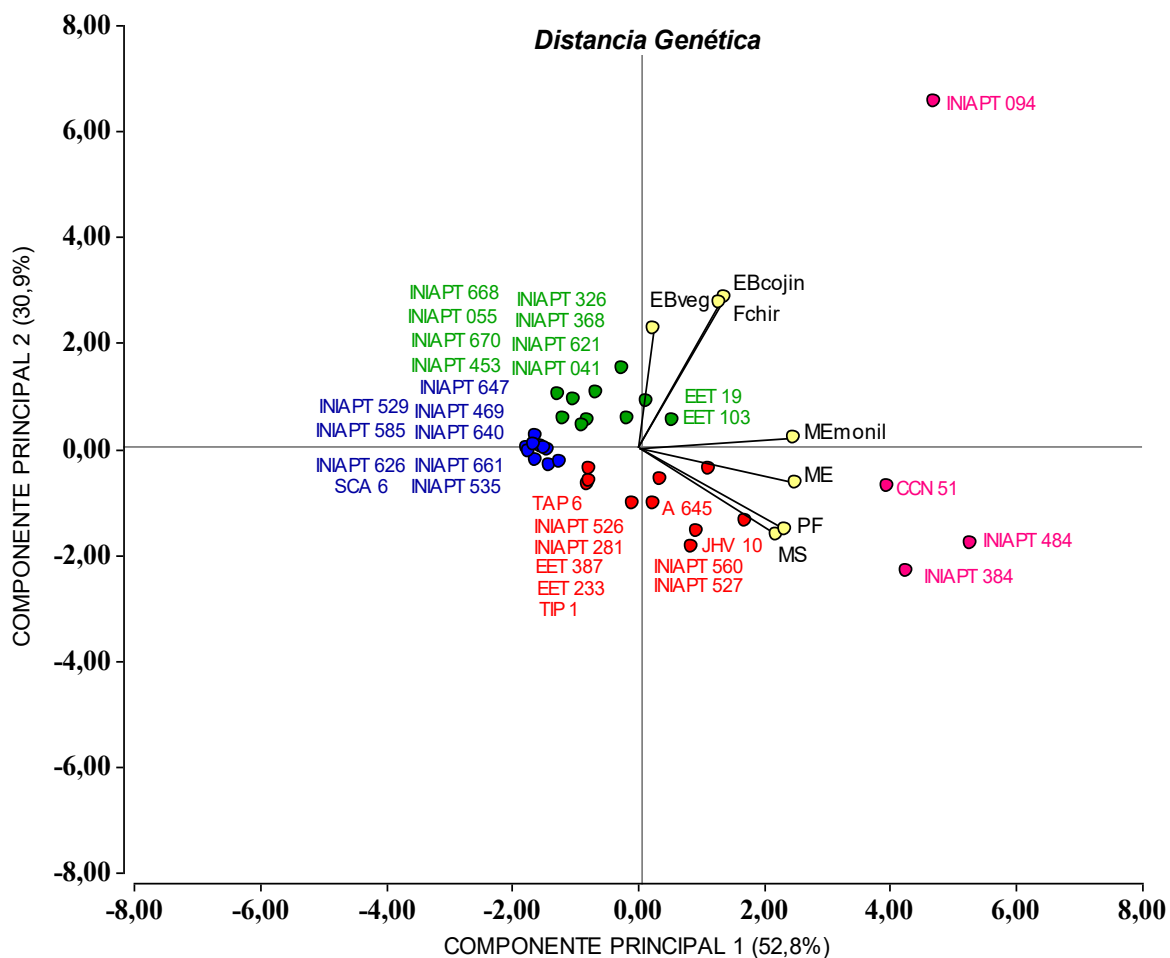
Análisis de Componentes Principales.

La figura 1 muestra el plano definido por los dos primeros componentes principales, el primero explica el 52.8% de la varianza total donde se agrupan las características que aportan la mayor información. El segundo componente explica el 30.9% de la variación total. Además de los vectores correspondientes a las variables utilizadas, la figura 1 también muestra la distribución de los puntos que corresponden a los 34 genotipos (incluidos los controles). La amplia distribución de los distintos genotipos en el plano definido por los ejes asignados a los Componentes Principales 1 y 2, con un particular comportamiento de unos cuantos (INIAPT 094, INIAPT 384, INIAPT 484 y CCN 51) que terminan ubicándose en posiciones bastante distantes respecto a la mayoría, posiblemente influidos por algún carácter particular que segrega notoriamente, demostrando una importante variabilidad fenotípica que en gran medida puede explicarse por un fundamento genético.

A la izquierda del plano definido con una ligera orientación hacia el cuadrante inferior, se observa un grupo de clones que, aunque se encuentran bastantes dispersos entre sí, dejan entrever lo que parece ser propiedades comunes en lo que respecta a una baja incidencia de escoba de bruja vegetativas, escobas cojinetes y frutos chirimoya. También estos clones comparten alguna característica importante de bajo porcentaje de mazorcas enfermas. A la derecha con una orientación hacia el cuadrante inferior del plano, se vislumbra otro grupo de clones que en general comparten una buena capacidad productiva, aunque también presentan en común una incidencia importante de mazorcas enfermas. La relativa regularidad de la distribución de puntos en el plano sugiere que los genotipos en cuestión son parte de una muestra representativa de la diversidad genética de las poblaciones híbridas de donde provienen los clones estudiados. Los cruces realizados entre tres poblaciones parentales con distinta base genética, recombinaron características deseables y no deseables para dar lugar a la variabilidad observada. A la luz de la teoría disponible acerca de las diferencias en el fundamento genético de las poblaciones de cacao Nacional, Alto Amazónico y Trinitario, tal variabilidad adquiere sentido (Peña, 2008).

Estudio reciente (Loor, 2010) muestra que el cacao Alto Amazónico se compone de distintos grupos genéticos, aumentando las oportunidades de recombinación y creación de variabilidad.

Figura 1. Análisis de Componentes Principales de los 24 clones seleccionados provenientes de distintos de orígenes genéticos y los controles.



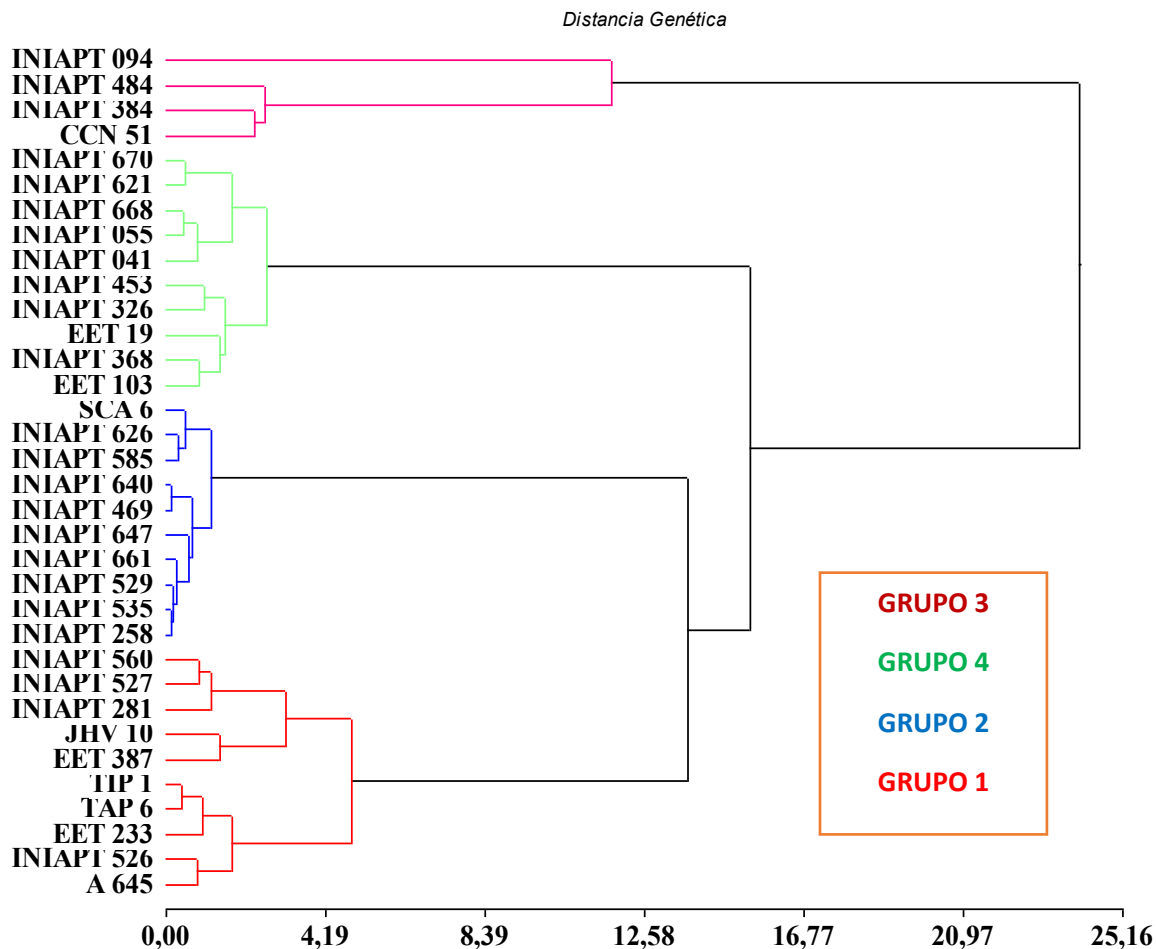
Análisis de Cluster

Los miembros de cada grupo comparten características comunes que los diferencian de los clones en otros grupos (Fig. 2). El grupo 1 contiene diez genotipos: tres provenientes de cruces entre genotipos Alto Amazónicos el INIAPT 526, INIAPT 527, e INIAPT 560; un genotipo proviene del cruce entre Nacional x Nacional, el INIAPT 281; y los clones controles el A 645, EET 387, EET 233, TAP 6, TIP 1 y JHV 10; los genotipos de este grupo comparten en gran medida características de tolerancia a escoba de bruja vegetativas. El grupo 2 está conformado por diez genotipos: uno proveniente de cruces entre Alto amazónicos, el INIAPT 258; un genotipo proveniente del cruce entre Alto amazónico x Nacional, el INIAPT 535; siete provenientes de cruces entre Nacional x Nacional, el INIAPT 469, INIAPT 529, INIAPT 585, INIAPT 626, INIAPT 640, INIAPT 647 e INIAPT 661, y el control SCA 6; estos clones comparten una baja incidencia de mazorcas enfermas con escoba y moniliasis, y al mismo tiempo, se benefician básicamente por tolerancia a escoba de bruja cojinetes y frutos chirimoya.

El grupo 3 contiene solo cuatro genotipos: dos procedentes de cruces entre Alto Amazónicos: INIAPT 094 e INIAPT 484; un genotipo proveniente del cruce entre CCN 51 x TAP 6 el INIAPT 384; y el control CCN 51; estos comparten los valores más altos de peso fresco y mazorcas sanas. Finalmente, el grupo 4 abarca diez

genotipos: uno proviene del cruce entre Alto Amazónicos, el INIAPT 453; siete provienen del cruce de Nacional x Nacional, el INIAPT 041, INIAPT 055, INIAPT 326, INIAPT 368, INIAPT 621, INIAPT 668 e INIAPT 670; y dos controles el EET 19 y EET 103; en aquel grupo se encuentran clones con la mayor incidencia de escobas de bruja vegetativas.

Figura 2. Dendograma de la similitud entre los 24 genotipos de cacao de distinto origen genético y los controles.



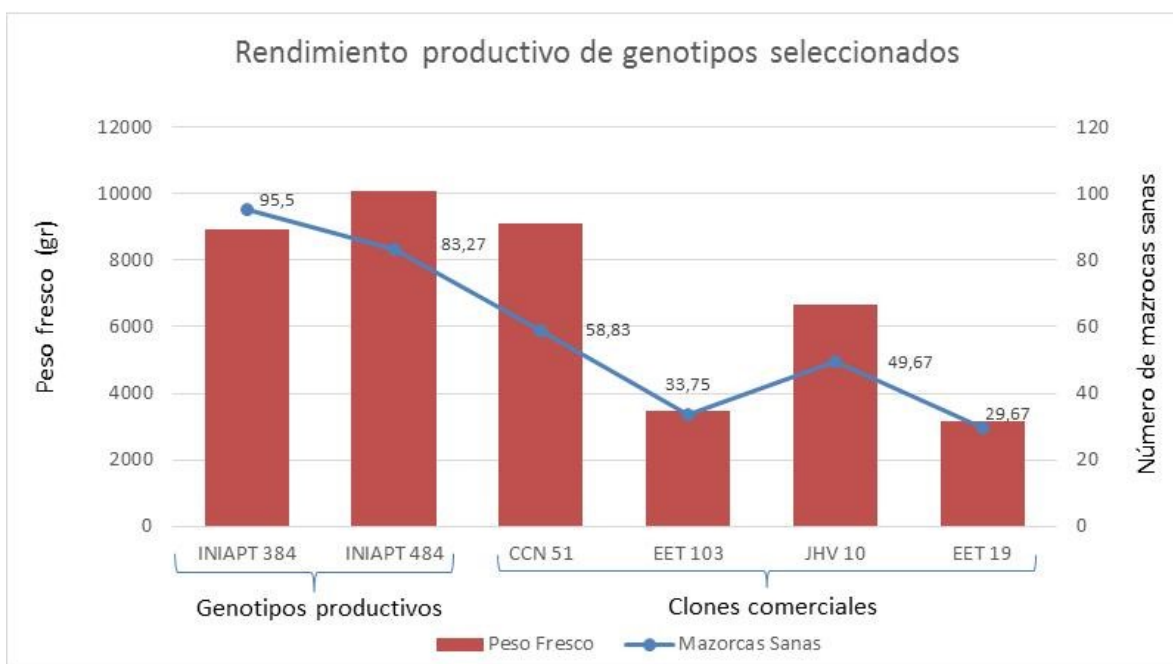
Características de clones productivos

La figura 3 contiene los resultados de las variables de rendimiento para los genotipos dentro del grupo que cuentan con los clones más productivos y que combinan en un nivel alto la mayoría de variables asociadas al rendimiento, comparados con clones comerciales. Para esta variable el clon que presentó el menor valor para número de mazorcas sanas, fue el EET 103 con 33.77 gramos. El genotipo que presentó el valor más elevado fue el INIAPT 484, con 83.27 mazorcas (Foto 1), notándose que es el clon que mayor cantidad de mazorcas sanas produjo. Los rangos más altos de rendimiento presentaron los clones INIAPT 484, CCN 51 e INIAPT 384, con valores de 10.084,09; 9.116,67 y 8.937,50 gramos respectivamente.



Foto 1.- Clon INIAPT-484 autocompatible, dotado de: precocidad, alto rendimiento productivo y tolerante a las principales enfermedades.

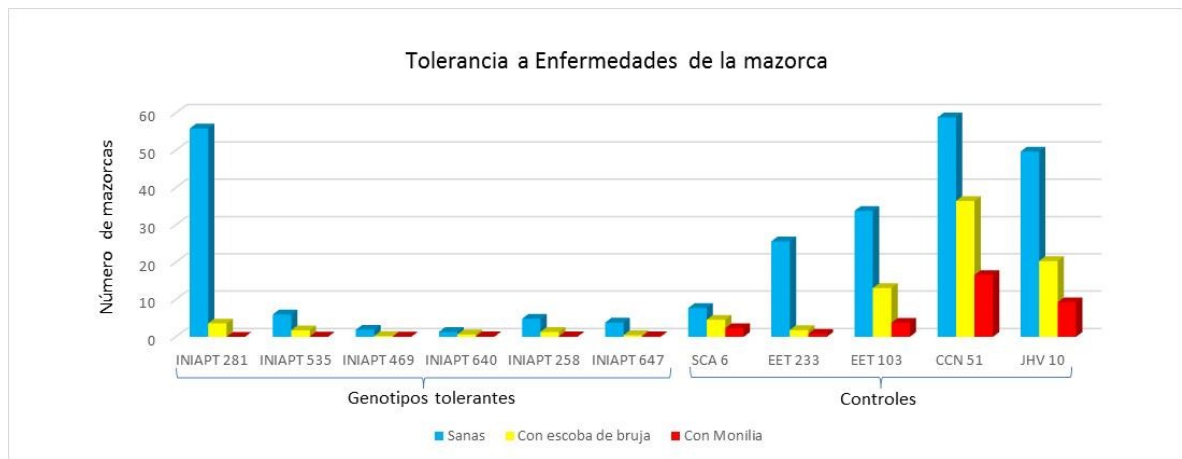
Figura 3. Rendimiento y N° de mazorcas sanas/árbol de los genotipos más productivos comparados con clones comerciales. EET-Pichilingue 2013.



Tolerancia a enfermedades de la mazorca

La alta variabilidad encontrada en los clones del grupo 2, en cuanto a incidencia de mazorcas con moniliasis, permitió encontrar genotipos que presentaron poca o casi nula infección de la enfermedad como es el caso del INIAPT 535, INIAPT 469, INIAPT 640, INIAPT 258 y el INIAPT 647, con valores cercanos a cero. En lo referente a mazorcas enfermas con escoba, los clones que presentaron baja incidencia fueron: el INIAPT 469, INIAPT 647, INIAPT 640 e INIAPT-258 con valores promedio de 0.22, 0.45, 0.45 y 0.67, respectivamente, como se observa en la figura 4. En lo referente a estas enfermedades, revela que es factible encontrar fuentes de resistencia, dando a conocer el grado de severidad que tienen; corroborando los estudios realizados por Rivera (1995). Estos paralelismos encontrados en estos genotipos serían de vital importancia en la generación de nuevas variedades de cacao con resistencia específicamente a mazorcas con escoba de bruja y moniliasis.

Figura 4. Producción de mazorcas de los genotipos identificados en el estudio como tolerantes a *M. pernicioso* y *M. royeri* frente a controles resistentes y clones comerciales. EET-Pichilingue 2013.

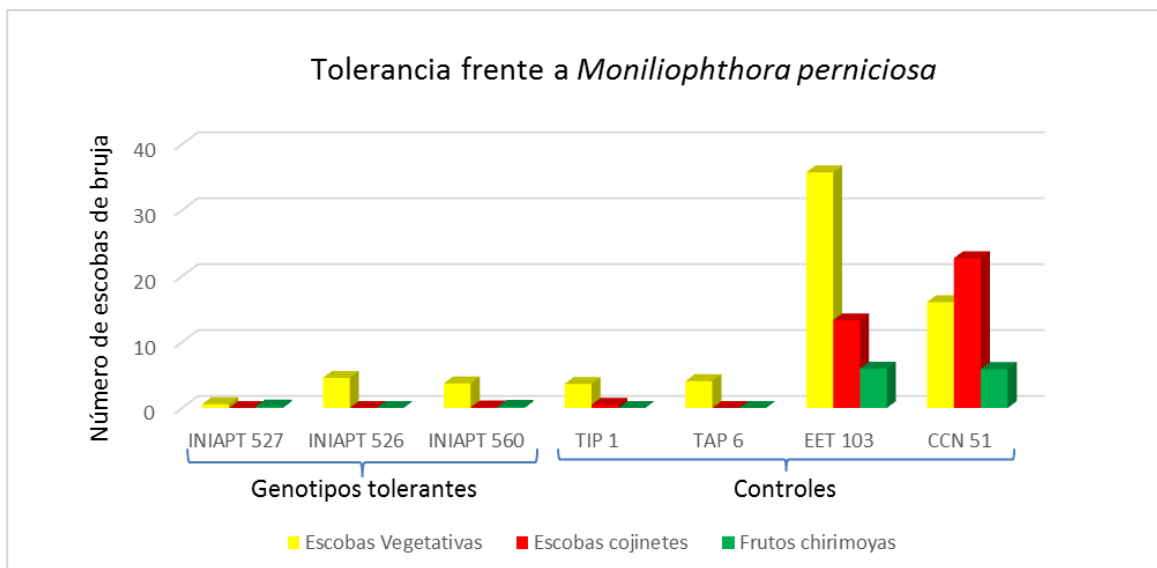


Tolerancia a escobas de bruja vegetativas

Para la variable número de escobas vegetativas los clones que presentaron los valores más bajos fueron los del grupo 1: el INIAPT 527, INIAPT 560, INIAPT 526 y los controles TIP 1 y TAP 6, con valores promedio de 0.58, 3.73, 4.58, 3.67 y 4.08 en su orden, lo cual indica que estos clones tienden a infectarse muy poco con esta enfermedad, a diferencia de los clones comerciales, dando a conocer el grado de tolerancia que tienen, como se puede apreciar en la figura 5. Aquellos genotipos que presentan características promisorias frente a la enfermedad, provienen de poblaciones híbridas que se cruzaron entre parentales Alto Amazónicos. La baja incidencia de Escoba de Bruja presentada por los clones de origen Amazónico podría deberse su alto grado de tolerancia a la enfermedad, lo que concuerda con lo manifestado por Evans *et al.*, (1977).

Además es importante mencionar que algunos de estos clones, están dotados con la característica de tolerancia a moniliasis, como es el caso del INIAPT 281 e INIAPT 527 de manera muy similar a los controles resistentes como TIP 1, TAP 6 y EET 233, con valores de 0.00, 0.50, 0.75, 0.75 y 0.80 respectivamente. Estos genotipos serían de valiosa importancia en la generación de nuevas variedades de cacao con tolerancia a estas dos enfermedades, para disminuir el uso de productos químicos, como los fungicidas por su impacto negativo en la salud humana y ambiental (López *et al.*, 2009; Krauss *et al.*, 2010; Medeiros *et al.*, 2010).

Figura 5. Presencia de *M. perniciosa* (escobas vegetativas) en genotipos identificados en el estudio como tolerantes, comparados con los controles resistentes y clones comerciales. Pichilingue 2013.



CONCLUSIONES

- Se identificó al genotipo INIAPT 484, obtenido del cruzamiento entre genotipos Alto Amazónicos, como el clon con mayor capacidad de rendimiento, considerándose el genotipo con el mayor número de atributos que contribuyen a su valoración económica, ya que cuenta con una capacidad de rendimiento superior al clon comercial CCN 51 y un perfil sensorial muy particular. Por tal motivo, los planes para entregarlo como nueva variedad comercial en beneficio del sector cacaotero del Ecuador se encuentran avanzados.
- La alta variabilidad encontrada permitió identificar genotipos que presentaron poca o casi nula infección de mazorcas con escoba de bruja y moniliasis como es el caso del INIAPT 281, INIAPT 535, INIAPT 469, INIAPT 640, INIAPT 258 y el INIAPT 647; encontrando posibles fuentes de resistencia frente a estas dos importantes enfermedades que afectan al cultivo.
- Se identificaron tres clones, derivados del cruzamiento entre genotipos Alto amazónicos: INIAPT 527, INIAPT 526 y el INIAPT-560, proveniente del cruce entre Nacional x Nacional, con menor incidencia de *Moniliophthora perniciosa* (escobas vegetativas), y podrían usarse como fuentes de resistencia genética frente a la enfermedad, en futuros programas de mejoramiento genético.

BIBLIOGRAFÍA

- Evans, H. C., Edwards, D., & Rodriguez, M. (1977). Research on cocoa diseases in Ecuador: past and present. *PANS*, 23(1), 68-80.
- INAMHI, 2016. Instituto Nacional de Meteorología. Anuarios Meteorológicos 2000-2016. [Abril, 2016].
- Krauss, U., Hidalgo, E., Bateman, R., Adonijah, V., Arroyo, C., Garcia, J., Crozier, J., Brown, N., Ten Hoop, G., Holmes K. 2010. Improving the formulation and timing of application of endophytic biocontrol and chemical agents against frosty pod rot (*Moniliophthora roreri*) in cocoa (*Theobroma cacao*). *Biological Control*. 54 (3):230-240.
- Loor, G. 2010. Prospección, caracterización y conservación de cacaos silvestres emparentados con la variedad Aromática conocida como Nacional en dos microrregiones del Sur de la Amazonía ecuatoriana. Informe de Comisión de servicios EET-Pichilingue.
- López, L., Carvalho, A., Teodoro, J., Rocha, G., Villela, A. 2009. Selection of *Trichoderma stromaticum* isolates for efficient biological control of witches' broom disease in cacao. *Biological Control*. 51(1): 130-139.
- Medeiros, F., Pomella, A., De Souza, J., Niella, G., Valler, R., Bateman, R., Fravel, D., Vinyard, B., Hebbar, P. 2010. A novel, integrated method for management of witches' broom disease in Cacao in Bahia, Brazil. *Crop Prot.* 29(7):704-711.
- Peña, G. 2008. Estudio de la capacidad hereditaria de genes de resistencia de escoba de bruja (*Moniliophthora perniciosa*) en genotipos de cacao Nacional y Amazónicos usados como parentales. Artículo *In Press*. 12 p. E. E. Pichilingue. INIAP.
- Rivera, J. 1995. Evaluación de la reacción del material promisorio de cacao de origen Nacional a Escoba de bruja *Crinipellis perniciosa* (Stahel) Siger. Tesis Ing. Agr. Guayaquil, Ec, Universidad Agraria del Ecuador. 66 p.
- Surujdeo-Maharaj, S., Umaharan, P., Butler, D., Sreenivasan, T. 2003. An optimized screening method for identifying levels of resistance to *Crinipellis perniciosa* in cocoa (*Theobroma cacao*). *Plant Pathology* 52, 464–75.