

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA DE LA SELVA

FACULTAD DE AGRONOMÍA

ESCUELA PROFESIONAL DE AGRONOMIA



**EVALUACION DE LA COMPATIBILIDAD E INTERCOMPATIBILIDAD DE
CUATRO CLONES PROMISORIOS DE *Theobroma cacao* L. (CACAO) PARA LA
FORMACIÓN DE CULTIVARES POLICLONALES EN LA ESTACION
TULUMAYO**

Tesis

para optar el título de:

INGENIERO AGRÓNOMO

PRESENTADO POR:

LIZ FANNY VARGAS MATUTE

Tingo María – Perú

2022



UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA DE LA SELVA
Tingo María
FACULTAD DE AGRONOMÍA



Km 1.21 carretera Tingo María. Telf. (062) 561136 E.mail: fagro@unas.edu.pe.

"Año del Fortalecimiento de la Soberanía Nacional"

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

N° 011 -2022-FA-UNAS

BACHILLER : LIZ FANNY VARGAS MATUTE

TÍTULO : "EVALUACION DE LA COMPATIBILIDAD E INTERCOMPATIBILIDAD DE CUATRO CLONES PROMISORIOS DE CACAO (*Theobroma cacao* L.) PARA LA FORMACIÓN DE CULTIVARES POLICLONALES EN LA ESTACION TULUMAYO"

JURADO CALIFICADOR

PRESIDENTE : M.Sc. JORGE LUIS ADRIAZOLA DEL AGUILA
VOCAL : Ing. OSCAR ESMAEL CABEZAS HUAYLLAS
VOCAL : M.Sc. GIANNFRANCO EGOAVIL JUMP

ASESOR : M.Sc. LUIS GARCIA CARRIÓN

FECHA DE SUSTENTACIÓN : 31/08/2022

HORA DE SUSTENTACIÓN : 11:00 am.

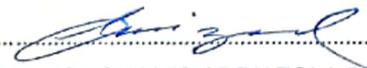
LUGAR DE SUSTENTACIÓN : Sala audiovisual- Facultad de Agronomía

CALIFICATIVO : Muy Bueno

RESULTADO : Aprobado

OBSERVACIONES A LA TESIS : En hoja adjunta

Tingo María, 31 de agosto de 2022


M.Sc. JORGE LUIS ADRIAZOLA DEL AGUILA
PRESIDENTE


Ing. OSCAR ESMAEL CABEZAS HUAYLLAS
VOCAL


M.Sc. GIANNFRANCO EGOAVIL JUMP
VOCAL


M.Sc. LUIS GARCIA CARRION
ASESOR



UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA DE LA SELVA
REPOSITORIO INSTITUCIONAL DIGITAL
(RIDUNAS)

Correo: repositorio@unas.edu.pe



“Año de la unidad, la paz y el desarrollo”

CERTIFICADO DE SIMILITUD T.I. N° 092 - 2023 - CS-RIDUNAS

El Coordinador de la Oficina de Repositorio Institucional Digital de la Universidad Nacional Agraria de la Selva, quien suscribe,

CERTIFICA QUE:

El trabajo de investigación; aprobó el proceso de revisión a través del software TURNITIN, evidenciándose en el informe de originalidad un índice de similitud no mayor del 25% (Art. 3° - Resolución N° 466-2019-CU-R-UNAS).

Facultad:

Facultad de Agronomía

Tipo de documento:

Tesis	X	Trabajo de investigación	
-------	---	--------------------------	--

TÍTULO	AUTOR	PORCENTAJE DE SIMILITUD
EVALUACION DE LA COMPATIBILIDAD E INTERCOMPATIBILIDAD DE CUATRO CLONES PROMISORIOS DE Theobroma cacao L. (CACAO) PARA LA FORMACIÓN DE CULTIVARES POLICLONALES EN LA ESTACION TULUMAYO	LIZ FANNY VARGAS MATUTE	11% Once

Tingo María, 18 de abril de 2023

Mg. Ing. García Villegas, Christian
Coordinador del Repositorio Institucional
Digital (RIDUNAS)



VICERRECTOR DE INVESTIGACION
OFICINA DE INVESTIGACION

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA DE LA SELVA
REGISTRO DE TESIS PARA LA OBTENCION DEL TITULO UNIVERSITARIO

I. DATOS GENERALES DE PREGRADO

Universidad	: Universidad Nacional Agraria de la Selva
Facultad	: Facultad de Agronomía
Título de Tesis	: “Evaluación de la compatibilidad e intercompatibilidad de cuatro clones promisorios de <i>Theobroma cacao</i> L. (Cacao) para la formación de cultivares policlonales en la Estación Tulumayo”
Autor	: Bach. Liz Fanny Vargas Matute
DNI	: 74164754
Correo electrónico	: liz.vargas@unas.edu.pe
Asesor de tesis	: Ing. Mg. Sc. Luis Fernando García Carrión
Escuela profesional	: Agronomía
Programa de investigación	: Especies agrícolas, Ornamentales, Floristas, Medicinales, Nutraceúticos y Afines
Línea(s) de investigación	: Caracterización morfo-fitoquímica de los recursos fitogenéticos, propagación, manejo y conservación <i>ex-situ</i>
Eje temático de investigación	: Caracterización morfológica-agronómica de germoplasma de cacao
Lugar de Ejecución	: Estación de Tulumayo
Duración del trabajo	: 4 meses
Fecha de inicio	: 01/03/2018
Termino	: 10/07/2018
Financiamiento	: S/. 2 300 soles
Propio	: Si

Tingo María – Perú

Agosto, 2022

DEDICATORIA

A DIOS, el que guía mi vida, que es siempre fiel y por su gracia hizo posible este logro, a él todo se lo debo.

A mis padres MODESTO VARGAS AUCCALLA y GREGORIA MATUTE URRUTIA, por su gran apoyo y confianza en mí. Toda mi admiración para ellos.

A mis hermanos Judith, Eduardo, Isaías, Josué y Elena, que son mi motivación para seguir esforzándome en todas las áreas de mi vida, los amo a todos ellos.

AGRADECIMIENTO

- A Mi casa superior de estudios, la Universidad Nacional Agraria de la Selva por la exigente formación académica en mi carrera profesional.

- A Los docentes de la Facultad de Agronomía quienes con dedicación supina compartieron sus conocimientos, experiencias y habilidades para desempeñarnos como buenos profesionales.

- Al Ing. Mg. Sc. Luis F. García Carrión, asesor de tesis, por su colaboración y confianza depositada en mi persona, y por brindarme sus conocimientos y apoyo incondicional durante la ejecución de la tesis.

- A Mi jurado de tesis: Ing. Mg. Sc. Jorge Adiazola Del Águila (Presidente), Ing. Mg. Sc. Gianfranco Egoávil Jump, e Ing. Oscar Cabezas Huayllas por sus valiosas contribuciones para que la excelencia de esta tesis.

- A Todos mis amigos que me apoyaron durante la ejecución de la tesis y que por siempre estarán presentes en mi corazón y en mis oraciones.

ÍNDICE

	Página
I. INTRODUCCION	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
2.1. Generalidades del cacao	3
2.1.1. Origen, domesticación y clasificación	3
2.2. Biología reproductiva del cacao	3
2.2.1. Estructura floral.....	3
2.2.2. Polinización del cacao.....	4
2.2.3. La fecundación	5
2.3. Sistemas de incompatibilidad	6
2.3.1. Sistema de incompatibilidad homomórfico	6
2.3.2. La incompatibilidad en cacao.....	7
2.3.3. Estudios recientes sobre la incompatibilidad en cacao	10
2.4. Diseños de parcelas policlonales	11
III. MATERIALES Y METODOS	12
3.1. Lugar de ejecución.....	12
3.1.1. Características	12
3.2. Materiales	12
3.2.1. Material genético.....	12
3.2.2. Materiales, instrumentos y equipos.....	13
3.3. Componentes en estudio	13
3.4. Tratamientos en estudio	14
3.5. Diseño experimental.	14
3.5.1. Modelo aditivo lineal	15

3.6. Características (variables) evaluados.....	16
3.7. Ejecución del experimento	16
3.7.1. Identificación y señalización de clones	16
3.7.2. Aislamiento del botón floral.....	17
3.7.3. El método de la autopolinización	17
3.7.4. La polinización cruzada	18
3.7.5. Evaluación de la compatibilidad/ incompatibilidad.....	18
IV. RESULTADOS Y DISCUSION	19
4.1. De las autopolinizaciones	19
4.2. De las polinizaciones cruzadas	29
4.3. De los diseños policlonales.....	38
V. CONCLUSIONES	42
VI. PROPUESTAS A FUTURO.....	43
VII. REFERENCIAS.....	44
VIII. ANEXO.....	48

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Página
1. Codificación, genealogía y características de cuatro clones promisorios de cacao.	13
2. Cuatros clones promisorios de cacao para evaluación de la autocompatibilidad....	14
3. Seis cruas bicolnales de cacao para evaluación de la intercompatibilidad.....	14
4. Esquema parcial del análisis de varianza en el diseño completo al azar (DCA) para autopolinizaciones y polinizaciones cruzadas.	15
5. Cuadrados medios en DCA para el porcentaje de flores fecundadas a los 2, 4, 8 y 15 días después de la autopolinización de cuatro clones de cacao.....	20
6. Prueba de Duncan ($\alpha \leq 0,05$) para porcentaje de flores prendidas de cuatro clones de cacao a los 2, 4, 8 y 15 días después de la autopolinización.	22
7. Monitoreo de evaluación de la autocompatibilidad/autoincompatibilidad de cuatro clones de cacao.....	25
8. Cuadrados medios y significación estadística para el porcentaje de flores prendidas de cuatro clones de cacao a los 2, 4, 8 y 15 días después de la polinización cruzada.....	30
9. Prueba de Duncan ($\alpha \leq 0,05$) para porcentaje de flores prendidas a los 2, 4, 8 y 15 días después de la polinización cruzada de cuatro clones de cacao.	32
10. Evaluación de cruzamientos compatibles/incompatibles y calificación de la compatibilidad de cuatro clones de cacao a los 2, 4, 8 y 15 días después de la polinización.	36
11. Porcentaje de flores prendidas de cuatro clones de cacao en autopolinizaciones y polinizaciones cruzadas.	39
12. Determinación de la compatibilidad/intercompatibilidad de cuatro clones a los 2 días después de la polinización.	51
13. Determinación de la compatibilidad/intercompatibilidad de cuatro clones de cacao a los 4 días después de la polinización.	
14. Determinación de la compatibilidad/intercompatibilidad de cuatro clones de cacao a los 8 días después de la polinización.	53

15. Determinación de la compatibilidad/intercompatibilidad de cuatro clones de cacao a los 15 días después de la polinización.	54
--	----

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Porcentaje de flores prendidas, (A) 2 días, (B) 4 días, (C) 8 días y (D) 15 días, después de la autopolinización de cuatro clones de cacao.	23
2. Porcentaje de flores prendidas y no prendidas de cuatro clones de cacao a los 15 días después de la autopolinización.....	26
3. Porcentaje de flores prendidas a los 2 (A) y 4 días (B) después de la polinización cruzada de cuatro clones de cacao.....	33
4. Diseños de arreglos policlonales de cacao. (A) Diseño 1. (B) Diseño 2.....	40
5. Flores prendidas y no prendidas de cuatro clones de cacao a los 2, 4, 8 y 15 días después de las autopolinizaciones.	49
6. Flores prendidas y no prendidas de cruzamientos de cuatro clones de cacao a los 2, 4, 8 y 15 días después de las polinizaciones cruzadas.....	50
7. Rotulado de las plantas y cruza a efectuar.....	55
8. Estado óptimo de la flor femenina para ser polinizada	55
9. Flores extraídas donantes de polen listas para polinizar.	56
10. Protector aislante de la flor femenina en la rama de cacao.	56
11. Procedimiento de la polinización manual.....	57
12. Inicio de crecimiento del fruto a los 4 días de la polinización	57
13. Observación del mini-fruto a los 8 días de la polinización.	58
14. Estado del crecimiento del fruto a los 15 días de la polinización.	58
15. Evaluación de flores prendidas y desprendidas.....	59

RESUMEN

Con el objetivo de evaluar la compatibilidad e incompatibilidad de genotipos promisorios de cacao para su uso en diseños policlonales, se realizó este ensayo en la Estación Tulumayo. Como material genético se evaluaron cuatro genotipos de cacao S-8 (ICS-95 x UF-296) y S-12 (ICS-1 x SCA-6), S-28 (ICS-39 x U-45) y C-24 (selección del agricultor) con diferente potencial productivo, calidad organoléptica y tolerancia a las enfermedades. En cada genotipo se realizaron 60 autopolinizaciones y 60 alopolinizaciones entre genotipos, con 3 repeticiones de 20 flores y bajo un diseño completo al azar. Para determinar el grado de compatibilidad/incompatibilidad de los genotipos tanto en autopolinizaciones y alopolinizaciones, se usó la prueba del Chi-cuadrado (X^2). Las variables evaluadas fueron; número de flores prendidas y flores no prendidas según el método de Knight y Rogers, a los 2, 4, 8 y 15 días después de la polinización. Los porcentajes de flores prendidas en las autopolinizaciones de los genotipos S-28, S-8 y C-24 fueron de 80, 70 y 55 %, respectivamente clasificándose como clones autocompatibles, mientras que el clon S-12 con 6.7 % de flores prendidas se clasificó como clon autoincompatible. En las polinizaciones cruzadas, el cruzamiento S-28 x S-8 con 83,3 %; S-28 x C-24 con 83,3 %; S-28 x S-12 con 71,7 %; S-12 x S-8 con 70 %; C-24 x S-8 con 55 % y C-24 x S-12 con 31,7 % de flores prendidas, fueron clasificados como clones intercompatibles. Tomando en consideración los altos niveles de intercompatibilidad se propusieron dos diseños policlonales: Diseño 1, conformado por tres clones intercalados (S-28 con cuatro hileras, C-24 con dos hileras y S-8 con tres hileras) y el Diseño 2, conformado por dos clones intercalados (S-8 y S-28), ambos con cuatro hileras.

ABSTRACT

To evaluate the compatibility and intercompatibility of promising cocoa genotypes for use in polyclonal designs, this trial was carried out at the Tulumayo station. As genetic material, four cocoa genotypes S-8 (ICS-95 x UF-296) and S-12 (ICS-1 x SCA-6), S-28 (ICS-39 x U-45) and C-24 (farmer's selection) with different productive potential, organoleptic quality and tolerance to diseases, were evaluated. In each genotype, 60 self-pollinations and 60 allopollinations between genotypes were carried out, with 3 repetitions of 20 flowers and under a complete random design. To determine the degree of compatibility / incompatibility of the genotypes both in self-pollinations and allopollinations, the Chi-square test (X^2) was used. The variables evaluated were: number of attached flowers and non-attached flowers according to the Knight and Rogers method, at 2, 4, 8 and 15 days after pollination. The percentages of attached flowers in the self-pollinations of genotypes S-28, S-8 and C-24 were 80, 70 and 55 %, respectively, being classified as self-compatible clones, while clone S-12 with 6,7 % of attached flowers it was classified as a self-incompatible clone. In the cross pollinations the cross S-28 x S-8 with 83,3 %; S-28 x C-24 with 83,3 %; S-28 x S-12 with 71,7 %; S-12 x S-8 with 70 %; C-24 x S-8 with 55 % and C-24 x S-12 with 31,7 % of flowers attached, were classified as intercompatible clones. Taking into account of high levels of intercompatibility, two polyclonal designs were proposed: Design 1 consisting of three intercalated clones (S-28 with four rows, C-24 with two rows and S-8 with three rows) and Design 2 consisting of two intercalated clones (S-8 and S-28), both with four rows.

I. INTRODUCCION

El cacao (*Theobroma cacao* L.), es cultivado por la mayoría de los agricultores de la zona del Huallaga cuyos volúmenes de granos son exportados a diferentes países del mundo por sus apreciadas características organolépticas en el mercado internacional mejorando los ingresos de miles de pequeños agricultores. Es una especie alógama que destaca por su variabilidad genética que le permite tener una mejor adaptación a diferentes condiciones climáticas y edáficas; interactuar con los agentes biológicos benéficos (polinizadores) y perjudiciales (predadores y otros), y sobreviviendo en los ecosistemas naturales bajo la presión de las fuerzas evolutivas.

El cultivo de cacao tiene varios factores que limitan su producción que son de naturaleza fitosanitaria, agronómicas y genéticas. Este último, lo condiciona por los problemas de incompatibilidad en el proceso reproductivo sexual, y que reduce su potencial de rendimiento.

Por otro lado, la carencia de variedades o clones mejorados en nuestra zona que garanticen una alta y estable productividad, que tengan moderada resistencia a las principales enfermedades y que sean de fina calidad de almendra, desafía ensayar diferentes combinaciones (arreglos policlonales) de clones promisorios basados en su nivel autocompatibilidad e intercompatibilidad con la finalidad de incrementar y estabilizar su producción con altos estándares de calidad. La validación de esta agrotecnología permitirá que los productores tengan una oferta de clones de cacao a utilizar bajo un arreglo policlonal para que satisfaga las expectativas del productor, comercializador y consumidor final.

Hipótesis

Los cuatro clones promisorios de cacao se diferencian por sus porcentajes de autofecundación y fecundación cruzada de acuerdo a su distinta genealogía.

Objetivo general

Determinar los porcentajes de autocompatibilidad e intercompatibilidad de cuatro clones de cacao (*Theobroma cacao* L.) de diferente genealogía para la formación de cultivares policlonales.

Objetivos específicos

1. Determinar los porcentajes de autocompatibilidad/autoincompatibilidad de cuatro clones de cacao mediante autopolinizaciones.
2. Determinar los porcentajes de intercompatibilidad/interincompatibilidad de cuatro clones de cacao mediante polinizaciones cruzadas.
3. Diseñar cultivares policlonales basados en los altos porcentajes de intercompatibilidad.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Generalidades del cacao

2.1.1. Origen, domesticación y clasificación

El cultivo de cacao (*Theobroma cacao* L.) se extiende por toda la América de sur y América central, y su centro de origen está localizada geográficamente entre las cuencas de los ríos Caquetá, Putumayo y Napo (Cheesman, 1944).

La existencia de poblaciones de cacao muy variables y extendidas en la región central y sur de nuestra Amazonia Alta ameritaría que su centro de origen no solo estaría confinado a la región nororiental del Perú, sino que además incluiría las cuencas de los ríos Huallaga, Ucayali y Urubamba (García, 2000).

El descubrimiento de la cultura Mayo-Chinchi en el 2002 permitió encontrar nuevas evidencias arqueológicas (orfebrería y cerámica), que permitió sostener que el principal centro de origen y de domesticación incipiente del cacao lo compartiría entre Perú y Ecuador (García, 2017).

El cacao fue domesticado durante la época precolombina por los indígenas de Centroamérica donde se cultivó desde el siglo VI. Después, el cacao ‘Criollo’ de América Central fue introducido al Caribe, Venezuela, Filipinas, Indonesia, India y Madagascar. El cultivo del cacao ‘Forastero’ se inició en Brasil en el siglo XVIII, y en 1822, fue introducido a África, Santo Tomás, Ghana, Nigeria y Costa de Marfil (García, 2008)

Las variedades de cacao, por su origen, inicialmente se clasificaron en tres grupos: ‘Criollos’, ‘Forasteros’ y ‘Trinitarios’. Los ‘Criollos’ con granos de cotiledón blanco, proporcionan chocolate de mejor calidad y los ‘Trinitarios’ que resultaron del cruzamiento entre ‘Criollo’ x ‘Forastero’, tienen características intermedias entre estos dos grupos (Arguello y Mejía, 2000).

2.2. Biología reproductiva del cacao

2.2.1. Estructura floral

La flor de cacao es hermafrodita, pentámera, actinomorfa, cauliflora (flores adheridas en el tronco y ramas), y que están agrupadas en inflorescencias cimosas (cojines florales) o como flores solitarias (Enríquez, 1985).

La flor es perfecta pues posee androceo y gineceo, y completa, porque tiene todos sus verticilos florales: 5 sépalos, 5 pétalos, 5 estaminodios, 5 estambres y 5 lóculos placentarios en cada ovario (García, 2008).

El androceo está compuesto por cinco estambres fértiles que se alternan con cinco estaminodios (estambres infértiles). Los estaminodios actúan como órganos de atracción de insectos. El ovario es súpero, pentacarpelar y pentalocular (Dostert, 2011; Díaz y Urbina, 2015).

El periodo desde que emerge el botón floral sobre la corteza hasta la apertura de la flor dura aproximadamente 30 días y está altamente influido por el ambiente. Existe mayor emergencia de flores luego de las primeras lluvias seguida de un periodo seco; lo cual permite que algunas zonas haya producción de mazorcas en dos épocas distintas. El botón floral maduro empieza su apertura a partir de las 14:00 h., con una separación ligera de los sépalos y a las 17:00 h., abren la mayoría de los botones florales. A mayor luz y menor humedad, la apertura es más rápida. Un mayor porcentaje de éxito en la polinización del cacao sucede cuando ésta se realiza el mismo día en que la flor abre (Enríquez, 1985).

Durante las primeras horas de la mañana las anteras están abiertas y el grano de polen está listo para fecundar a la flor hasta las 48 horas después teniendo el polen un corto tiempo de viabilidad. Por esta razón, el 60 % de las flores que no fueron fecundadas caen a las 48 horas (Noriega, 2012). El tiempo total requerido para que la flor abra es entre 12 a 15 horas (García, 2008).

2.2.2. Polinización del cacao

La polinización es el acto de transferir el polen de la antera al estigma de la misma flor u otra flor. La disposición de las piezas florales del cacao no facilita la autopolinización de forma natural debido a que las anteras están ubicadas debajo de la concha petaloide (cogulla), y los estigmas están protegidos por los estaminodios. El polen por su viscosidad difícilmente llega a los estigmas por la acción del viento; sin embargo, es una condición que ayuda a ser transportados por los insectos. Existen ciertos insectos polinizadores naturales de cacao que se encargan de la fecundación, siendo las mosquitas del género *Forcipomyia*, las más eficientes y que se reproducen en las hojarascas y pedazos de frutos en descomposición (García, 2008; Córdova et al., 2013).

Varios investigadores han señalado que la polinización natural es insuficiente para fertilizar todas las flores de un árbol. En el Alto Huallaga se ha determinado que la efectividad de la polinización natural es de una flor/árbol/día, en promedio; mientras que la polinización artificial de flores puede aumentar significativamente el número de mazorcas por árbol y las variedades resulten más productivas (García, 2008).

La polinización manual se debe realizar entre las 6:00 y 11:00 am evitando hacerlo en días muy fríos o lluviosos. (Phillips et al., 2012). El horario óptimo para polinizar es de 7:00 a 10:00 am como máximo, aunque haya pequeñas variaciones en cada clon que se evalúa. Pasado de las 10:00 am, el porcentaje de prendimiento en flores de cacao se reduce drásticamente en todos los clones y se recomienda utilizar de preferencia un estambre de la flor masculina para polinizar de 1 a 3 flores femeninas como máximo (Andrade, 2011)

2.2.3. La fecundación

El proceso de fecundación ocurre como consecuencia de la llegada del tubo polínico al saco embrionario. El primer núcleo espermático (n) del tubo polínico, se fusiona con la oófera (n) para formar el cigoto (2n); mientras que el segundo núcleo espermático (n), se une a los dos núcleos polares (n+n) para formar el núcleo triploide (3n) que constituirá el endospermo (Tovar y Ortiz, 1991).

El tiempo que demora entre la germinación del grano de polen sobre el estigma, la penetración del tubo polínico en el estilo y su desarrollo hasta alcanzar el saco embrionario, es como máximo 24 horas después de la polinización (Padilla, 1995). Las polinizaciones para fecundar el óvulo pueden tardar 48 horas y las más tardías, hasta 72 horas (Enríquez, 1985).

La flor que no es polinizada o fecundada a partir de segundo día cae al separarse en el punto de inserción del pedúnculo floral; es decir, se produce la abscisión; mientras las flores que han sido fecundadas se tornan de color amarillento, sus piezas florales se van secando y el ovario inicia su crecimiento rápidamente. Este es el único momento en que la flor o el fruto miniatura puede abscionarse (Enríquez, 1985). El 60 % de las flores que no son fertilizadas caen a las 48 h., después de la polinización. Cuando la polinización es exitosa, la fructificación puede iniciarse después de las 36 h.; se caen los pétalos y después de 72 h., los ovarios fecundados ya se muestran hinchados (Dostert et al., 2011).

Cuando la flor de cacao recibe menos de 25 granos de polen es decir menor al 50 % de los óvulos de la flor, ocurre la marchitez del fruto y esto se debe a factores genéticos (Cope, 1962). Bajo condiciones de polinización natural existe sub-polinización; es decir, reducido contenido de almendras y consecuentemente aborto de mazorcas cuando no se supera el límite o punto de marchitamiento diferencial ($X_w = 15$ granos de polen). En cambio, a partir de $X_w = 31$ granos de polen, se asegura un buen llenado de granos de la mazorca. Cuando el polen es escaso en el estigma también puede caerse la flor sin que se haya establecido y desarrollado el grano de polen (Tovar y Ortiz, 1991).

2.3. Sistemas de incompatibilidad

En un sistema de incompatibilidad, el grano de polen no germina o si germina, el tubo polínico detiene su crecimiento al querer ingresar a un determinado estilo; en consecuencia, no llega a ocurrir la fecundación (Vernonica y Tong, 2008). Para la mayoría de las especies, también actúan a nivel de inhibición del crecimiento del polen o a nivel del ovario, lo que lleva a una falla en el desarrollo del embrión favoreciendo la heterocigosidad de las plantas (Lanaud et al., 2017)

La autoincompatibilidad se refiere a la incapacidad de una planta de poder autofecundarse. En especies hermafroditas, esta barrera reproductiva evita la pérdida de vigor y la consanguinidad cuando se cruzan las plantas del mismo género y/o especie, siendo autoincompatibles (Vernonica y Tong, 2008).

2.3.1. Sistema de incompatibilidad homomórfico

En el sistema de incompatibilidad homomórfico, a diferencia del sistema heteromórfico no existen diferencias en la morfología floral; siendo la fecundación impedida genéticamente por un gen ubicado en el locus 'S' con alelos múltiples y cuyo mecanismo de reacción puede ser gametofítico o esporofítico.

En el sistema gametofítico, la incompatibilidad del polen está controlada por su propio genotipo y generalmente determinado por un solo gen con alelos múltiples. Se caracteriza por la acción independiente, tanto del estilo como en el polen de los alelos pertenecientes al locus de incompatibilidad 'S', donde las células del estilo presentan dos alelos en los individuos diploides para el locus 'S'. Cuando el alelo del gameto masculino es igual a uno de los alelos que contiene las células estigmáticas, el grano de polen que ha iniciado su

germinación dentro del estilo, detiene su crecimiento por diferencias osmóticas rompiéndose el tubo polínico en su interior y no llegando a fecundar a la óosfera (Vernonica y Tong, 2008).

En cambio, en el sistema esporofítico que se presenta en las plantas de cacao, la reacción de incompatibilidad de polen está controlada por el núcleo diploide del esporofito ($2n$) que es el genotipo de la planta productora del polen, mas no por el genotipo del polen; es decir, la selectividad por un tipo de grano de polen está controlado por el genotipo diploide. Por ello, si existe una relación de dominancia en dicho locus, el polen manifestara un comportamiento diferente. El esporofito o planta madre del grano de polen sintetiza compuestos que quedan depositados en sus capas externas (exina), generando la reacción de incompatibilidad. Por lo general, los alelos 'S' muestran dominancia y/o codominancia; es decir, interactúan ambos alelos (interacción polen-estilo) y en algunos casos, puede predominar la dominancia en el estilo (Vernonica y Tong, 2008).

El sistema de autoincompatibilidad esporofítico está determinado y controlado por un locus 'S' altamente polimórfico que tiene dos genes muy vinculados; el gen rico en el gen del aminoácido Cistina: Cys (SP11/SCR) del locus S, que es el determinante masculino localizado en la superficie de los granos de polen y el estigma receptor del gen de la Serina: Ser/Thr quinasa del locus 'S', que es el determinante femenino localizado en el estigma. En este sistema, el fenotipo de autoincompatibilidad de polen está determinado por el genotipo de sus progenitores por la relación de dominancia entre sus alelos, y de ambos alelos del polen que expresan el mismo fenotipo de autoincompatibilidad cuando interactúan con las células del estigma, concluyéndose que el éxito de la fusión de gametos depende de las interacciones entre alelos masculinos y femeninos, como en el sistema gametofítico, pero que también depende de la interacción entre alelos en los tejidos parentales como en el sistema esporofítico, es decir, la activación de la reacción de incompatibilidad depende de las relaciones de dominancia entre los dos alelos (Stein et al., 1991 citado en Lanaud et al., (2017).

2.3.2. La incompatibilidad en cacao

La primera evidencia reportada de plantas de cacao autoincompatibles denominadas "cacaos macho" debido a su completa esterilidad en sus anteras, fue reportado en el siglo XX por Harland (1925) y que fue confirmada una década después (León, 2002).

Un estudio sobre la existencia de incompatibilidad en las plantas de cacao permitió estudiar la fecundación y la embriogénesis donde se concluye que el tiempo de

germinación del grano de polen en el estigma hasta la fecundación es de 6 horas, lo cual llevó a proponer la siguiente clasificación: (a) plantas autocompatibles que producen fruto cuando se polinizan con polen de otras plantas autocompatibles y/o plantas autocompatibles del mismo grupo, clon o híbrido y (b) plantas autoincompatibles que producen fruto al ser polinizadas con polen de plantas autoincompatibles y las que no producen fruto cuando son polinizadas con polen de plantas autoincompatibles (Cheesman, 1938).

Otro estudio concluyó que las plantas autoincompatibles presentaban mayor cantidad de flores que las compatibles, y agrega que no existe diferencia en el desarrollo del tubo polínico en plantas autoincompatibles y autocompatibles durante el proceso de germinación del grano de polen en el estilo hasta alcanzar el ovario. Sin embargo, el inicio tardío y el bajo nivel de actividad nuclear en un ovario incompatible polinizado son responsables de la caída de la flor (Cope, 1939).

Se ha señalado que es posible tener mazorcas en las plantas de cacao autoincompatibles cuando son autopolinizadas aplicando el mismo polen autoincompatible mezclado con polen autocompatible en la flor de la planta autoincompatible (Glendining, 1960). Otro investigador ha reportado que el lugar donde opera la incompatibilidad no es en el estilo sino en el saco embrionario donde se unen el polen y el óvulo. Las flores caen mayormente a los 3 o 4 días después de ser polinizadas y las que son fecundadas (flores prendidas) se observa un ligero hinchamiento en la sección anatómica del ovario (Cope, 1962).

La falla en el cuajamiento en una planta autoincompatible de cacao se puede deber a: (a) la inhabilidad del grano de polen para germinar, (b) desarrollo lento del tubo polínico, (c) falla de los gametos para fertilizar el óvulo, d) falla del núcleo masculino o femenino para emerger dentro del citoplasma del huevo y (e) por la acción subsecuente de factores letales. Se concluye que un polen incompatible no puede desarrollar un tubo polínico capaz de alcanzar el ovario. (Possnette, 1973, citado en Enríquez, 1985).

Inicialmente la incompatibilidad en cacao fue atribuida a una serie de 5 alelos múltiples ubicados en el locus 'S'. Los 5 alelos de incompatibilidad difieren en su expresión según el siguiente orden de dominancia: $S_1 > S_2 = S_3 > S_4 > S_5$ (Knight y Rogers, 1953). Estudios posteriores concluyeron que el clon Parinari 7 posee los alelos S_1 y S_5 , el Parinari 35, los alelos S_3 y S_5 , y el Nanay 32, los alelos S_2 y S_4 . El alelo S_1 es dominante a los otros; los alelos S_2 y S_3 son independientes pero dominantes al alelo S_4 , que a su vez domina al alelo S_5 . Un árbol será

incompatible (masculino o femenino) con otro, si ambos poseen el mismo alelo dominante; mientras que un árbol portador de dos alelos independientes es incompatible con árboles que llevan cualquiera de ellos en ausencia de otros alelos dominantes a ellos.

Una década después, Cope (1962) agregó un sexto alelo recesivo de compatibilidad (S_6) a la teoría de la incompatibilidad del cacao propuesta por Knight y Rogers (1953). Cope sostuvo que además de los alelos 'S' de incompatibilidad intervienen dos genes A y B complementarios e independientes; que, en estado dominante, activan a los alelos 'S' de incompatibilidad residentes en el óvulo declarando la autoincompatibilidad al evitar la no fusión de los gametos en el saco embrionario. Estos genes A y B, en estado homocigoto recesivo, son incapaces de activar a los alelos de incompatibilidad.

Cope (1962) demostró que los cruzamientos incompatibles en cacao son debido a fallas de los núcleos generativos del polen con los óvulos, en proporciones de 25, 50 o 100 % de óvulos no fusionados, mientras que los cruzamientos compatibles no presentan ningún caso de no fusión; es por ello encontramos tres tipos de árboles autoincompatibles: (a) árboles que dan solo una proporción de 1:3 de óvulos no fusionados, (b) aquellos que dan una proporción 1:1 y (c) árboles que dan una proporción 1:0 en las autopolinizaciones. Además, señala que la fusión se debe a que el locus 'S' tendría una acción en dos etapas, una antes de la meiosis y otra después de este proceso. La acción pre-meiótica del locus 'S' establece el control esporofítico de la incompatibilidad; mientras que la acción post-meiótica es necesaria para asegurar que todos los gametos (excepto los homocigotos), no sean iguales en su reacción de fusión.

El grado de compatibilidad o incompatibilidad sexual es expresado en porcentaje de flores fecundadas resultante de una polinización manual. Con objeto de evaluación se considera que una planta es autocompatible o intercompatible cuando las polinizaciones artificiales producen un prendimiento de flores mayor o igual a 30 %. Cuando se cumple este requisito usando el polen del mismo árbol, se considera que la planta es autocompatible (AC), y si rechaza el polen, se dice que es una planta autoincompatible (AI). Cuando una flor de una planta autoincompatible es fecundada con polen de otra planta se dice que es un cruce inter-compatible, pero cuando la flor no puede ser fecundada con polen de otra planta, se dice que el cruce es inter-incompatible (Aranzazu, et al., 2008).

2.3.3. Estudios recientes sobre la incompatibilidad en cacao

Lanaud et al. (2017), reporta que el mecanismo de incompatibilidad en *Theobroma cacao* se ha descrito como un sistema de autoincompatibilidad de acción tardía; es decir, en reacciones de compatibilidad e incompatibilidad del polen que puede alcanzar el ovario a la misma velocidad que el tubo polínico (4 h después de la polinización); mientras que Cope (1939) señalaba que la doble fertilización se completa después de 24 h., en reacciones compatibles; mientras que en incompatibles los núcleos masculinos se liberan en el saco embrionario, pero que no logran la fusión de gametos en gran parte de los óvulos, lo cual produce abscisión floral.

La autoincompatibilidad tardía en cacao opera como no fusión de gametos incompatibles. El clon SCA-24 considerado fuertemente autoincompatible después de las 24 h., los núcleos de los gametos masculino y femenino de polinizaciones compatibles ya habían fusionado, y en los autoincompatibles la migración incompleta del polen se produjo a la mitad de los sacos embrionarios, donde los núcleos masculinos no habían alcanzado el núcleo del gameto femenino al cabo de 24 h. (Ford y Milkinson, 2012).

Una reciente investigación que evaluó la incompatibilidad de 10 clones de cacao a los 10 días después de la polinización encontró que 6 clones resultaron autocompatibles (≥ 30) y el porcentaje de prendimiento de flores varió entre 53 y 3 %. La polinización cruzada entre clones resultó ser inter-incompatible, siendo el valor más alto de 24 % de flores prendidas (Claude et al., 2017).

Otra investigación que evaluó la autocompatibilidad e intercompatibilidad de 5 clones de cacao (UF-296, UF-221, GS-36, POUND-12, y PACAYA) mediante aislamiento de 20 flores por clon usando una flor por cada 3 flores aisladas, y evaluando al segundo y tercer día después, reportó que todos los clones fueron autocompatibles (≥ 30 % flores prendidas), siendo los mejores clones: UF-296 y PACAYA, que superaron el 70 % de las autofecundaciones y todos los clones resultaron ser intercompatibles con porcentajes que variaron de 55 hasta 91 % de flores prendidas (Diaz y Urbina, 2015).

En Ecuador, un estudio que evaluó la compatibilidad de clones de cacao Nacional en época seca (julio y agosto) a los 10 días después de polinizar, concluyó que un 71 % de plantas fueron autocompatibles con 42 % de flores fecundadas y 43 % fecundadas en polinizaciones cruzadas. La variación del grado de incompatibilidad debería a genes

precursores de incompatibilidad además de los factores ambientales, y que la compatibilidad varía en determinadas épocas del año. También se observó que arboles incompatibles entre sí resultaron compatibles con otros grupos de árboles de cacao al realizar la polinización cruzada (Mazeira, 2013).

2.4. Diseños de parcelas policlonales

En vista que los materiales autoincompatibles e intercompatibles con características sobresalientes de productividad y calidad organoléptica se pueden cruzar unos con otros, las plantaciones comerciales pueden ser renovadas usando diseños de siembra apropiados (plantaciones clonales) que propicien el intercambio de polen entre clones intercompatibles (Phillips et al., 2012).

Actualmente, ya se viene recomendando el establecimiento de plantaciones que incluyan diferentes tipos de clones para diversificar la heterogeneidad de las poblaciones en función a las características de autoincompatibilidad natural que presenta ciertos clones de cacao. (Arvelo, et al., 2017).

Se ha señalado que una plantación policlonal se caracteriza por tener un buen comportamiento promedio en términos de producción, tolerancia a enfermedades, compatibilidad y calidad industrial. Esto implica que las ventajas comparativas de algunos clones compensen los defectos de otros. Se ha propuesto que la siembra sea a corta distancia (2 x 3; 2 x 4; 3 x 3 y 3 x 4 m) y se pueda dirigir la poda con el fin de que, al tercer año, las ramas de clones intercompatibles queden entrecruzadas para acercar las flores entre ellos y mejorar la eficiencia de los agentes polinizadores (Enríquez, 1970).

Una investigación en el CATIE (Costa Rica) reportó clones con alto nivel de intercompatibilidad, sugiriendo que en el campo no presentarían problemas de fecundación si los materiales se siembran en mezclas o hileras alternas (simples, dobles y hasta triples). Además, recomienda incluir un clon con capacidad de combinarse con diferentes clones, como por ejemplo el clon IMC- 67, que es productivo y resistente a algunas enfermedades de la raíz. En un diseño policlonal se usó clones resistentes a *Monilia* y de buena producción establecidas en dos hileras de cada clon intercompatible (Echeverri, 2013).

III. MATERIALES Y METODOS

3.1. Lugar de ejecución

La investigación se realizó en la Estación de Tulumayo, hoy denominado CIPTALD (Centro de Investigación y Producción de Tulumayo y Anexo La Divisoria), situado en el Km. 26 de la carretera Tingo María – Aucayacu, en el margen derecho del río Huallaga, correspondiendo al centro poblado de Santa Lucía, distrito de José Crespo y Castillo.

Las coordenadas geográficas de la Estación de Tulumayo son:

Este : 0385709

Norte : 8990405

Altitud : 500 msnm.

3.1.1. Características climáticas

La Estación de Tulumayo se encuentra en la Selva alta. Esta se caracteriza por ser una formación vegetal clasificada como bosque tropical muy húmedo, premontano, con una temperatura media de 26 °C y una mínima de 22 °C; con 85 % de humedad relativa en promedio y con una precipitación pluvial anual de 3 600 mm.

3.2. Materiales

3.2.1. Material genético

El material genético estudiado estuvo constituido por cuatro clones promisorios de cacao de diferente origen genético. Los cuatro clones de cacao con su codificación y genealogía se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Codificación, genealogía y características de cuatro clones promisorios de cacao.

Código	Clon	Genealogía	Características
G1	S-28	(ICS-39 x U-45), 5	Fino de aroma y sabor. Mezcla de frutas (plátano de la isla + anona). Productividad: n.d.
G2	C-24	Selección del campo del agricultor	Fino de sabor. Mezcla de frutas (anona + melocotón + banano). Productividad: n.d
G3	S-12	(ICS-1 x SCA-6),1	Fino de sabor. Acidez media con sabor a mandarina + banano + aguaymanto. Productividad: 2,3 kg/árbol
G4	S-8	(ICS-95 x UF-296), 8	Fino de aroma y sabor. Acidez baja (mandarina), sabor afrutado (melocotón + plátano de la isla) y nota de nueces. Productividad: 2,0 kg/árbol.

Fuente: García L. (2014); García J. (2018)

3.2.2. Materiales, instrumentos y equipos

Los materiales, instrumentos y equipos utilizados fueron los siguientes:

- Tubos plásticos transparentes 5 x 2 cm
- Cajas de plastilina
- Arandelas de alfileres de cabeza coloreada
- Malla antiáfida
- Cámara fotográfica
- Tapers plásticos
- Flores de cacao
- Lupa de 10X

3.3. Componentes en estudio

3.4.1 Autopolinización

Para este propósito se utilizaron cuatro clones promisorios (S-28, C-24, S-12 y S-8) cuyos botones florales fueron aislados y las flores abiertas se autopolinizaron con flores del mismo clon, resultando un total de 4 tratamientos para las autopolinizaciones.

3.4.2 Polinizaciones cruzadas

Para este objetivo se utilizaron cuatro clones promisorios (S-28, C-24, S-12 y S-8), cuyas flores fueron interpolinizadas mediante polinización cruzada, resultando un total de seis tratamientos (cruzamientos).

3.4. Tratamientos en estudio

Los tratamientos estudiados lo constituyeron las autopolinizaciones (4) y las polinizaciones cruzadas (6) entre los cuatro clones. En la tabla 2 y tabla 3 se presentan los tratamientos generados y su codificación.

Tabla 2. Cuatros clones promisorios de cacao para evaluación de autocompatibilidad

Clones (A)	Clon
A ₁	S-28
A ₂	C-24
A ₃	S-12
A ₄	S-8

Tabla 3. Seis cruza biconales de cacao para evaluación de intercompatibilidad

Cruzamiento (C)	Genealogía
C ₁	S-28 x C-24
C ₂	S-28 x S-12
C ₃	S-28 x S-8
C ₄	C-24 x S-12
C ₅	C-24 x S-8
C ₆	S-12 x S-8

3.5. Diseño experimental.

Se utilizó un diseño completo al azar (DCA) para las autopolinizaciones con cuatro tratamientos y tres repeticiones; así como, para las polinizaciones cruzadas, con seis tratamientos y tres repeticiones. La prueba de Duncan con un nivel de significación $\alpha \leq 0.05$ de probabilidad fue usada como prueba de comparación de promedios.

3.5.1. Modelo aditivo lineal

$$Y_{ij} = \mu + T_i + \xi_{ij}$$

Donde:

Y_{ij} : Es la respuesta obtenida en la j-ésima repetición al cual se polinizó el i –ésimo clon de cacao

μ : Efecto de la media general

T_i : Efecto del i -ésimo clon de cacao

ξ_{ij} : Efecto aleatorio del error experimental obtenido en la j-ésima repetición a la cual se polinizó el i –ésimo clon de cacao

Para:

i (A) = 1, 2, ..., 4 tratamientos

i (I) = 1, 2, ..., 6 tratamientos

j= 1, 2, 3 repeticiones

Tanto para el análisis de variancia ($F_{\alpha} \leq 0,05$) como para la prueba de comparación de medias de Duncan ($\alpha \leq 0,05$) se utilizó el software Microsoft Office Excel 2016, ver. Español.

Tabla 4. Esquema parcial del análisis de varianza en el diseño completo al azar (DCA) para autopolinizaciones y polinizaciones cruzadas.

Fuente de variación		GL	
		Autopolinizaciones	Polinizaciones cruzadas
Tratamiento	t-1	3	5
Error experimental	t (r-1)	8	12
Total	tr-1	11	17

t = tratamiento r = repetición

Además, para calificar la reacción o respuesta de la autocompatibilidad/autoincompatibilidad en las autopolinizaciones, y la intercompatibilidad / interincompatibilidad en las polinizaciones cruzadas, se utilizó la prueba estadística de Chi-cuadrado (X^2), al nivel $\alpha \leq 0,05$ de probabilidad. Esta prueba muy generalizada, es usada en experimentos genéticos cuando se trata de contrastar hipótesis sobre el tipo de segregación

genética, o para determinar la reacción de compatibilidad y/o incompatibilidad de genotipos procedentes de autopolinizaciones y/o polinizaciones cruzadas, y cuya fórmula es la siguiente:

$$X_c^2 = \sum_{i=1}^c \frac{(O_i - E_i)^2}{E_i} = \frac{(O_1 - E_1)^2}{E_1} + \frac{(O_2 - E_2)^2}{E_2}$$

Donde:

X_c^2 = valor del chi – cuadrado total

O_i = i – ésimo dato observado

E_i = i – ésimo dato esperado

c = N° de clases fenotípicas

3.6. Características (variables) evaluados

En las autopolinizaciones y polinizaciones cruzadas (interclonales), se evaluaron mediante contaje, las siguientes variables:

- a. Número de flores totales polinizadas (NFT)
- b. Número de flores prendidas (NFP), a los 2, 4, 8 y 15 días después de la polinización.
- c. Número de flores no prendidas (NFNP), a los 2, 4, 8 y 15 días después de la polinización.
- d. Compatibilidad (C) y/o incompatibilidad (I) de los clones.

Un clon se clasifica como compatible (proporción 1:1 de compatibilidad): si el número de flores prendidas es mayor o igual a 6 flores (\geq a 30 % de flores prendidas) de un total de n = 20 flores, según la prueba estadística de Chi-cuadrado (X^2).

3.7. Ejecución del experimento

Las polinizaciones manuales se realizaron en los meses de marzo a junio del 2018, cuando la intensidad de floración es media, es decir los árboles de cacao se encuentra en etapa de desarrollo de fruto e inicio de producción. El procedimiento realizado es el siguiente:

3.7.1. Identificación y señalización de clones

En el campo experimental de la Estación Tulumayo – UNAS bajo un diseño completamente al azar (DCA) con cuatro repeticiones y doce tratamientos, se identificaron y

señalizaron los cuatro clones promisorios. Para ello se usaron estacas de bambú para su reconocimiento de las plantas en las diferentes parcelas seleccionadas para el estudio.

3.7.2. Aislamiento del botón floral

Un día antes de realizar las polinizaciones manuales se seleccionaron los botones florales que estuvieron morfo-fisiológicamente maduros y listos para abrirse al día siguiente. Estas se caracterizaban por haber alcanzado el tamaño normal, presentar un hinchamiento o iniciando una agrietadura entre los sépalos.

A estos botones seleccionados se colocó un tubo plástico aislante y transparente de 5 x 2 cm, abierto en ambos extremos, cubriendo el extremo distal con una malla fina asegurada con una liga y en el extremo basal, un anillo de plastilina para fijar el protector del botón floral al tronco o rama del árbol del cacao asegurándolo con ligas adicionales para evitar que al momento de apertura de la flor ningún agente polinizador tenga acceso a ellas y pueda ser polinizado con un padre no seleccionado y/o el pedicelo floral fuera cortado por algún insecto (larva) masticadora.

3.7.3. El método de la autopolinización

Las autopolinizaciones se realizaron en horas de la mañana de 7:00 hasta las 9:30 am, y cuando no se presentaron precipitaciones. El procedimiento consistió en lo siguiente:

a. La planta receptora de polen (♀)

De los cojines florales receptivos, se escogió el mejor botón floral eliminando botones inmaduros y/o flores abiertas ubicadas en la rama principal o ramas primarias del árbol hasta una altura de 1,5 metros. Al día siguiente se verificó que las flores estén abiertas y se retiró el tubo plástico aislante. Luego, se cortaron los estaminodios con las uñas, se aplicó polen de una flor masculina desprovista de pétalos. Para esto se utilizó dos anteras de la flor extraída del mismo árbol, frotándolas por 2-3 veces consecutivas, de arriba hacia abajo sobre el estigma del pistilo

Las flores polinizadas se señalaron con un alfiler de un color diferente para cada clon y la fecha de polinización, las fechas de evaluaciones y la identificación del clon, se registraron en una libreta de apuntes. A los 2, 4, 8 y 15 días después de la polinización manual se hicieron las evaluaciones del número de flores prendidas y flores desprendidas de cada clon; así como, el inicio de la formación de frutos a los 4, 8 y 15 días después de la polinización.

b. La planta donadora de polen (♂)

Del árbol utilizado como progenitor masculino, se extrajeron flores frescas que se mantuvieron frescas dentro de un recipiente de plástico donde se colocó una bolita húmeda de algodón. Antes de efectuar la polinización, se tuvo la precaución de que el polen esté fresco, observando con una lupa 5X que éste muestre un color verde amarillento. Luego, se eliminaron los pétalos de las flores dejando libre las anteras para luego acercar al estigma de la flor madre y realizar los frotamientos al estigma de la flor receptiva.

3.7.4. La polinización cruzada

El método usado fue similar al descrito para las autopolinizaciones, sólo que se tuvo la precaución sobre la identidad del clon que hizo de donador de polen.

3.7.5. Evaluación de la compatibilidad/ incompatibilidad

Para determinar la reacción de compatibilidad/incompatibilidad tanto para las autopolinizaciones como para las polinizaciones cruzadas, se siguió el método de Knight y Rogers (1953), es decir, realizar polinizaciones artificiales (manuales) y evaluar el número de flores prendidas y flores desprendidas en cada uno de los árboles (clones) de cacao.

El tamaño de muestra es 20 flores, sin embargo, para darle mayor confiabilidad a mis resultados el número de flores evaluados fue 60 flores para cada tratamiento (autopolinizaciones y alopolinizaciones), evaluadas en 3 repeticiones de 20 flores. El número de flores a ser polinizadas en las autopolinizaciones y polinizaciones cruzadas por cada clon (tratamiento), fue por cuatro tratamientos (20 flores por cada una de las 3 repeticiones), haciendo un total de 240 para las autopolinizaciones y 360 para las polinizaciones cruzadas, con un total general de 600 polinizaciones. El monitoreo del contaje de número de flores prendidas y desprendidas en autopolinizaciones y polinizaciones cruzadas se realizó al 2°, 4°, 8° y 15° día después de la polinización, donde ya se pudo distinguir una pequeña mazorca de cacao de un tamaño de 4-6 mm aproximadamente.

3.8. Diseños policlonales

Con los porcentajes más altos de prendimiento de flores en las autopolinizaciones y polinizaciones cruzadas, se diseñaron dos arreglos policlonales, que son propuestos y discutidos en el capítulo de Resultados y Discusión.

IV. RESULTADOS Y DISCUSION

4.1. De las autopolinizaciones

En la tabla 5, se muestra el análisis de variancia para el porcentaje de flores fecundadas a los 2, 4, 8 y 15 días después la autopolinización manual de cuatro clones de cacao. Allí se observa que a los dos días de polinizadas no se encontró diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos (clones); lo cual se interpreta que el número de flores fecundadas fueron similares en todos los clones autopolinizados; sin embargo, a los 4, 8 y 15 días, si se encontraron diferencias altamente significativas entre los clones; es decir que al menos en un clon obtuvo un resultado diferente, siendo el mejor clon, el S-28, con mayor número de flores fecundadas.

Los coeficientes de variabilidad fueron 8,2; 15,6; 13,5 y 13,6 % respectivamente, que indican excelente homogeneidad, a los dos días y muy buena homogeneidad, a los 4, 8 y 15 días entre las unidades experimentales de cada tratamiento (clones).

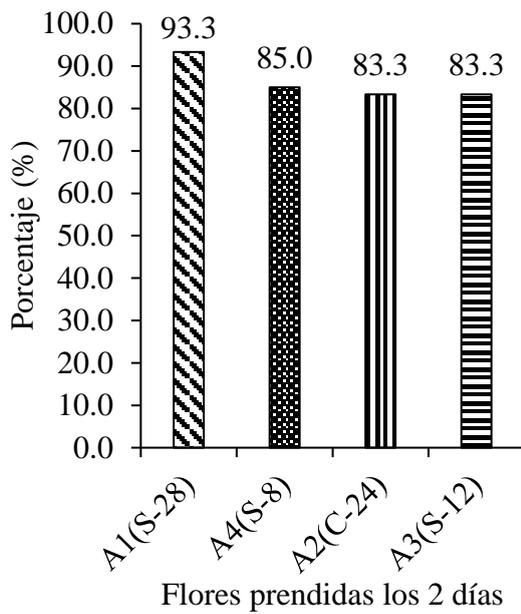
En la tabla 6, se muestra la prueba de Duncan ($\alpha \leq 0,05$) para el porcentaje de flores fecundadas a los 2, 4, 8 y 15 días después de la autopolinización de cuatro clones de cacao. A los dos días, no hubo diferencias estadísticas significativas entre los clones; es decir, todos los clones tuvieron respuesta similar para esta variable. A los cuatro días, si bien no se observan diferencias estadísticas significativas entre los clones S-28 y S-8; en cambio, sí los hubo entre los clones C-24 y S-12. Además, se encontraron diferencias estadísticas entre estos clones con respecto a los clones S-28 y S-8. A los ocho días tampoco hubo diferencias estadísticas significativas entre los clones S-28 y S-8; así como, entre S-8 y C-24; en cambio, sí los hubo entre este clon con los demás. Finalmente, a los quince días, si bien no hubo diferencias estadísticas significativas entre los clones S-28 y S-8, sí los hubo con respecto a los clones C-24 y S-12. Además, hubo diferencias estadísticas significativas entre estos dos últimos clones con los clones S-28 y S-8.

En la figura 1 se observa el porcentaje de flores fecundadas, (A) 2 días; (B) 4 días; (C), 8 días y (D) 15 días después de la autopolinización de los cuatro clones de cacao. En la primera evaluación (figura 1A) a dos días después de autopolinización, se observa que el clon S-28, logró un 93,3 % de flores fecundadas, le sigue el clon S-8 con 85 %, luego los clones C-24 y S-12, con 83,3% de flores fecundadas. En la Fig. 1B, de la segunda evaluación se observa que el clon S-28 con 83,3 % superó a los demás clones, le siguió el clon S-8 con 78,3 %, luego el clon C-24 con 60,5 % y el último clon S-12 con 26,7 % de flores fecundadas. En la figura 1C, de la tercera evaluación, el clon S-28 tenía 80 % de flores fecundadas, le siguió el clon S-8 con 71,7 %, luego el clon C-24 con 58,3 % y el último clon S-12 con solo 11,7 % de flores fecundadas. Finalmente, en la figura 1D, el clon S-28 mantenía el 80 % de flores fecundadas (frutos), le siguió el clon S-8 con 70 %, luego el clon C-24 con 55 % y el último clon S-12 con solo 6,7 % de flores fecundadas. En todas las cuatro evaluaciones el clon S-28 obtuvo el más alto porcentaje de flores fecundadas; mientras que el clon S-12 el más bajo porcentaje al final de todas las evaluaciones.

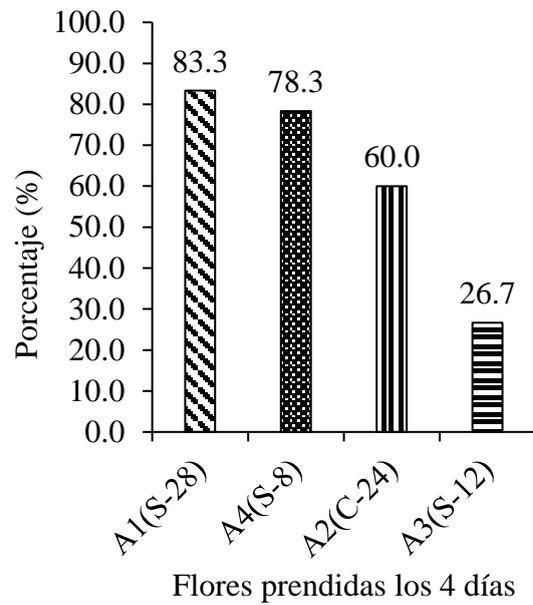
Tabla 6. Prueba de Duncan ($\alpha \leq 0,05$) para porcentaje de flores prendidas de cuatro clones de cacao a los 2, 4, 8 y 15 días después de la autopolinización.

Tratamiento	Clon	Días de evaluación							
		2 día		4 día		8 día		15 día	
		Promedio	Sig.*	Promedio	Sig.*	Promedio	Sig.*	Promedio	Sig.*
A ₁	S-28	93,3	a	83,3	a	80,0	a	80,0	a
A ₄	S-8	85,0	a	78,3	a	71,7	a b	70,0	a
A ₂	C-24	83,3	a	60,0	b	58,3	b	55,0	b
A ₃	S-12	83,3	a	26,7	c	11,7	c	6,7	c

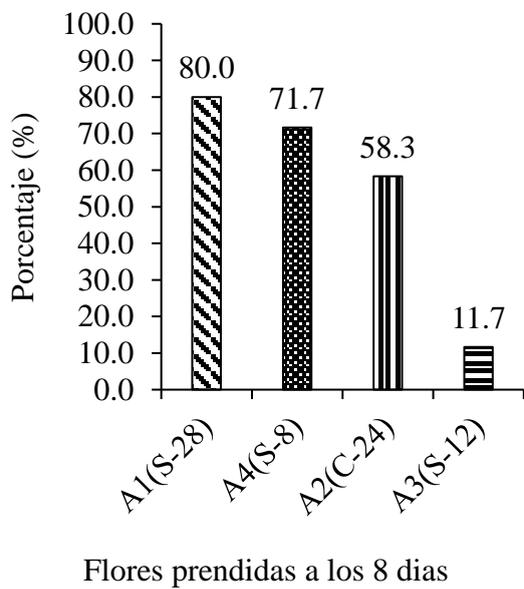
(*) Letras iguales en la misma columna, no existe diferencias estadísticas significativas ($\alpha \leq 0,05$)



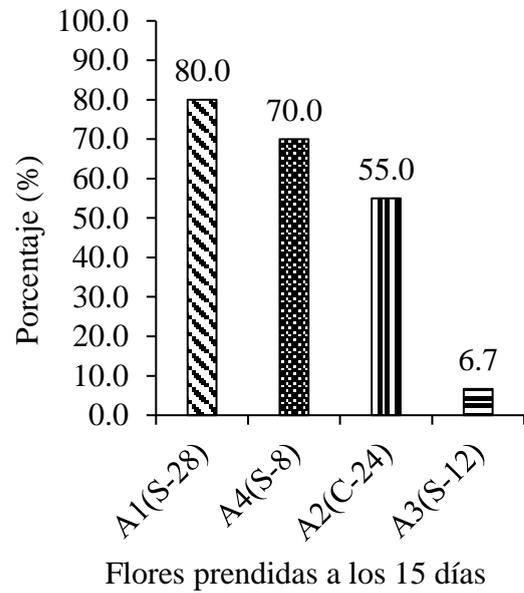
A. Flores prendidas a los 2 días



B. Flores prendidas a los 4 días



C. Flores prendidas a los 8 días



D. Flores prendidas a los 15 días

Figura 1. Porcentaje de flores prendidas, (A) 2 días, (B) 4 días, (C) 8 días y (D) 15 días, después de la autopolinización de cuatro clones de cacao.

En la tabla 7 y se muestra la tabla resumen de la autocompatibilidad y autoincompatibilidad de cuatro clones de cacao y los valores del Chi cuadrado (X^2).

Al comparar los valores observados a los 15 días después de la autopolinización, los clones S-28, S-8 y C-24 obtuvieron 80, 70 y 55 % de flores fecundadas respectivamente, clasificándolas como clones autocompatibles por superar el valor crítico (≥ 30 % de flores prendidas), según la prueba de Chi-cuadrado. Por el contrario, el clon S-12 al obtener solo un 6,7 % de flores fecundadas, es clasificado como clon autoincompatible; a pesar de que a los 2 días después de ser autopolinizada todos los clones aparentemente eran clasificados como autocompatibles.

Tabla 7. Monitoreo de evaluación de la autocompatibilidad/autoincompatibilidad de cuatro clones de cacao.

Cod.	Clon	Frecuencia de evaluación de flores autopolinizadas										TFF (%)	TFNF (%)	Comp. (X ²)
		0 días		2 días		4 días		8 días		15 días				
		NFP	%	NFF	NFNF	NFF	NFNF	NFF	NFNF	NFF	NFNF			
A ₁	S-28	60	100	51	9	50	10	48	12	48	12	80	20	C
A ₂	C-24	60	100	56	4	36	24	35	25	33	27	55	45	C
A ₃	S-12	60	100	50	10	16	44	7	53	4	56	7	93	I
A ₄	S-8	60	100	50	10	47	13	43	17	42	18	70	30	C

NFP= N° flores polinizadas. NFF= Número de flores prendidas. NFNF= Número de flores no prendidas. TFF= Total de flores prendidas.

TFNF= Total de flores no prendidas.

C= Autocompatible. I = Autoincompatible.

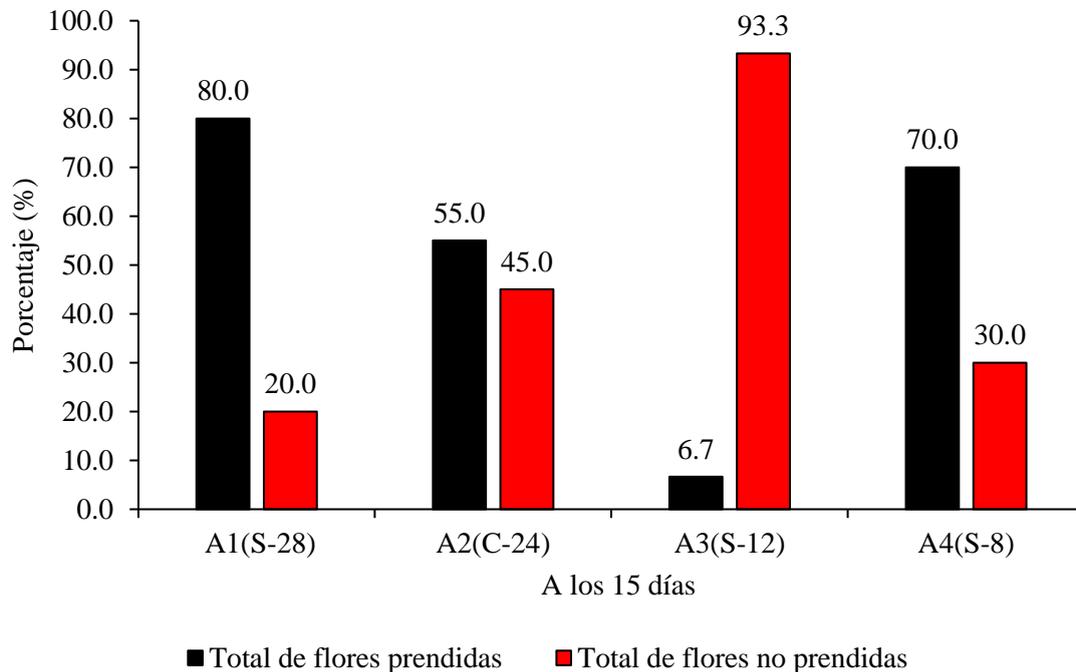


Figura 2. Porcentaje de flores preñadas y no preñadas de cuatro clones de cacao a los 15 días después de la autopolinización.

En la figura 2 se muestra el porcentaje de flores preñadas y no preñadas de cuatro clones de cacao a los 15 días después de la autopolinización. Allí se observa que el clon S-28 obtuvo 80 % de flores preñadas y 20 % de flores no preñadas, le sigue el clon S-8 con 70 y 30 %; luego el clon C-24 con 55 y 45 %, y finalmente, el clon S-12 con 6,7 % de flores preñadas y 93,3 % de flores no preñadas. En este último clon, hubo un muy bajo porcentaje de compatibilidad entre el polen y el óvulo de la misma flor.

Los resultados obtenidos de las evaluaciones del preñamiento de flores a los 2, 4, 8 y 15 días de 4 clones de cacao mediante la autopolinización (tabla 7), indican que a los 2 días después de la autopolinización, el clon A₁ (S-28) con 93,3 % de flores preñadas superó al clon A₂ (C-24) y al clon A₃ (S-12) que presentó el valor más bajo con 83,3 % de flores preñadas; pero muy superiores al límite crítico de polinizaciones exitosas ($x \geq 30$ % de flores preñadas) tal como lo establece la prueba de Chi-cuadrado y los resultados obtenidos por Knight y Rogers (1953) y Aranzazu, et al., (2008).

Todos los clones, en general, registraron un preñamiento muy alto de flores, y a los 2 días, podría deberse a que ciertos clones, el proceso de fecundación sea más rápido que en otros

o que el pedicelo de la flor no fecundada siga aún adherida al tallo sin que se haya formado completamente la capa de abscisión que devendría en el subsecuente desprendimiento (Enríquez, 1985; Dostert et al., 2011) o que en algunos clones autoincompatibles, más del 60 % de las flores que no fueron fecundadas caen dentro de las 48 h., después de la autopolinización (Noriega, 2012); siendo esta evaluación muy prematura y poco confiable para dar un veredicto de si el clon es autocompatible o no lo es dependiendo de los alelos o genotipos de incompatibilidad.

A los 15 días, el clon A₁ (S-28) superó a los demás clones con 80 % de flores prendidas, siguiéndole el clon A₄ (S-8) con 70 % de flores prendidas; no obstante, estos porcentajes fueron menores si se compara con los porcentajes registrados a los 4 y 8 días después de la autopolinización. Estas respuestas evidentemente dependen de diferenciales genotipos de incompatibilidad; no descartando la influencia de otros factores como la densidad y eficiencia de los polinizadores (García, 2017), el nivel de sombra (Noriega, 2012), la intensidad y frecuencia de las precipitaciones, y la variación de la temperatura (Mazeira, 2013).

Otro factor que incrementa la caída de las flores se atribuye a la densidad del grano de polen en el estigma. Si la escasez de granos de polen que llega al ovario es menor de 15, produce aborto del fruto; por el contrario, si es mayor de 31 granos de polen se asegura un crecimiento normal del fruto y buen llenado de las semillas de la mazorca (Tovar y Ortiz, 1991). Por estas y otras razones, Phillips et al. (2012), recomendaron que la evaluación de la respuesta de la autocompatibilidad/autoincompatibilidad se realice hasta los 15 días después de la polinización.

Otro factor clave, además del factor genético, que permitió lograr altos porcentajes de prendimiento en las autopolinizaciones fue el de haberlo realizado el mismo día que la flor abrió (Enríquez, 1985; García, 2008), en un horario de 7:30 a 10:30 am, muy similar a lo recomendado por Andrade (2011), evitando polinizar en los días lluviosos o inmediatamente después de las lluvias (Noriega, 2012).

El clon A₃ (S-12) solo obtuvo 26,7 % de flores prendidas a los 4 días después, 11,7 % a los 8 días después y 6,7 % de flores prendidas a los 15 días después de la autopolinización; por consiguiente, a partir de los 4 días y en adelante (tabla 7), este clon se le clasifica como autoincompatible. La incompatibilidad ha sido atribuida al inicio tardío y bajo nivel de actividad nuclear de un ovario incompatible que genera la caída de la flor (Cope, 1939). Cuando el grano de polen no germina o germina en el estigma, el tubo polínico detiene su crecimiento en el estilo

y no llega a unirse con la ovocélula al momento de la fecundación, se atribuye a ciertos clones que poseen diferentes genotipos y/o similares alelos de incompatibilidad con distinta relación de dominancia entre ellos y que provienen de los genotipos de sus progenitores (Vernonica y Tong, 2008; Lanaud et al., 2017)

Es posible determinar el nivel de compatibilidad de manera confiable a partir del cuarto día según varios estudios que son similares a Enríquez (1985) quien reporta que las polinizaciones pueden durar 72 h., como máximo, ya que después de los tres días de efectuada, los ovarios fecundados ya se muestran hinchados (Cope, 1962; Dostert et al., 2011). Otro estudio también coincide en señalar que, a los 3 días, todos los clones evaluados resultaron autocompatibles; mientras que a los 10 días después de polinizados, 2 de los 21 clones resultaron autoincompatibles, probablemente por la influencia del medio ambiente, tal como sostiene Padilla (1995).

Varios investigadores han señalado que no existe una autocompatibilidad absoluta que alcance al 100 %. Ellos asumen que la caída de flor no solo depende de los genes precursores de la incompatibilidad sino también de la influencia del medio ambiente y su fisiología (Padilla, 1995; Mazeira, 2013). Nuestros resultados a los 15 días después de la autopolinización indican que los clones S-28 y S-8 con 80 y 70 % de compatibilidad respectivamente, tuvieron los más altos porcentajes de autocompatibilidad; calificándose como clones autocompatibles; mientras que el clon S-12 que solo obtuvo 6,7 % de compatibilidad y 93,3 % de incompatibilidad, es calificado como clon autoincompatible.

Al relacionar la autoincompatibilidad del clon S-12 con la teoría propuesta por Knight y Rogers (1953) sobre la existencia de una serie de alelos múltiples en el locus "S", se podría postular que el genotipo de este clon tendría 2 de los 5 alelos S de incompatibilidad en condición diploide o a lo más, un alelo recesivo de compatibilidad S6, enmascarado en condición heterocigota. Según Padilla (1995), cuando un ovario contiene de 30 a 50 óvulos y una flor cae es porque de un 50 a 75 % de los óvulos no fusionan, y las flores que si fecundan, es porque más del 50 % de óvulos fusionan; en consecuencia, el clon autoincompatible S-12, con 6,7 % de flores prendidas (fecundadas), los óvulos que si fusionaron y no fusionaron estarían en una proporción muy lejana a 1:3 (25 % de fusión: 75 % de no fusión, aprox.). Si bien el porcentaje de no fusión del clon S-12, no coincide ni se acerca a ninguna categoría de cacao incompatibles que no fusionan en 25, 50 o 100 % de óvulos propuesto por Cope (1962), este investigador no descarta la posibilidad de añadir un valor mayor de 75 % de óvulos no fusionados. A pesar de

que en la actualidad, si bien se han logrado avances significativos, la teoría de Knight y Rogers (1953) y la de Cope (1962) aún tienen debilidades y no explican claramente los mecanismos fisiogenéticos que determinan los genotipos de compatibilidad/incompatibilidad; así como, los mecanismos de la segregación de las progenies del cacao.

4.2. De las polinizaciones cruzadas

En la tabla 8, se muestra el análisis de variancia para porcentaje de flores fecundadas a los 2, 4, 8 y 15 días después de la polinización cruzada de cuatro clones de cacao. Allí se observa que a los 2, 4, 8 y 15 días después de polinizadas se encontraron diferencias altamente significativas entre los clones; es decir, al menos un clon muestra un resultado diferente, siendo el mejor el cruzamiento S-28 x S-8, con el mayor número de flores prendidas.

Los coeficientes de variabilidad (C.V), fueron de 7,37; 11,38; 13,79 y 12,91 % respectivamente, lo cual indican excelente homogeneidad a los dos días y muy buena homogeneidad, a los 4, 8 y 15 días después de la polinización cruzada entre las unidades experimentales de los clones estudiados.

Tabla 8. Cuadrados medios y significación estadística para el porcentaje de flores prendidas de cuatro clones de cacao a los 2, 4, 8 y 15 días después de la polinización cruzada.

Fuente de variación	G.L.	Frecuencia de evaluación de flores prendidas (fecundadas)							
		2° día		4° día		8° día		15° día	
		C.M.	Sig.	C.M.	Sig.	C.M.	Sig.	C.M.	Sig.
Cruzamientos	5	1 190,000	AS	1 419,167	AS	1 268,889	AS	1 169,167	AS
Error experimental	12	33,333		68,056		90,278		72,222	
Total	17								
CV (%):		7,37		11,38		13,79		12,91	

AS: Diferencias estadísticas altamente significativas ($\alpha \leq 0,01$).

En la tabla 9, se presenta la prueba de Duncan ($\alpha \leq 0,05$) para porcentaje de flores preñadas (fecundadas) a los 2, 4, 8 y 15 días después de la polinización cruzada de cuatro clones de cacao. A los dos días, el cruzamiento S-28 x S-8 alcanzó el más alto valor no diferenciándose estadísticamente de los demás cruzamientos: C₁ (S-28 x C-24), C₂ (S-28 x S-12), C₆ (S-12 x S-8) e C₅ (C-24 x S-8), pero sí, con respecto al cruzamiento C₄ (C-24 x S-12). A los 4, 8 y 15 días, se observa que el cruzamiento C₃ (S-28 x S-8), obtuvo el más alto valor no diferenciándose estadísticamente de los cruzamientos C₁ (S-28 x C-24), C₂ (S-28 x S-12) e C₆ (S-12 x S-8), pero sí, de los demás cruzamientos.

En la figura 3 se observa el porcentaje de flores preñadas (fecundadas) a los 2 días (A) y 4 días (B), después de la polinización cruzada de cuatro clones de cacao. En la Fig. 3 (A), los valores de preñamiento de los cruzamientos se ubicaron entre 90 y 38,3 %. En la Fig. 3 (B), los valores de preñamiento se ubicaron entre 88,3 y 31,7 %. Los cruzamientos C₃ y C₁, presentaron los mayores porcentajes de preñamiento con 88,3 %, mientras que el cruzamiento C₄ presentó el más bajo porcentaje de preñamiento con 31,7 %.

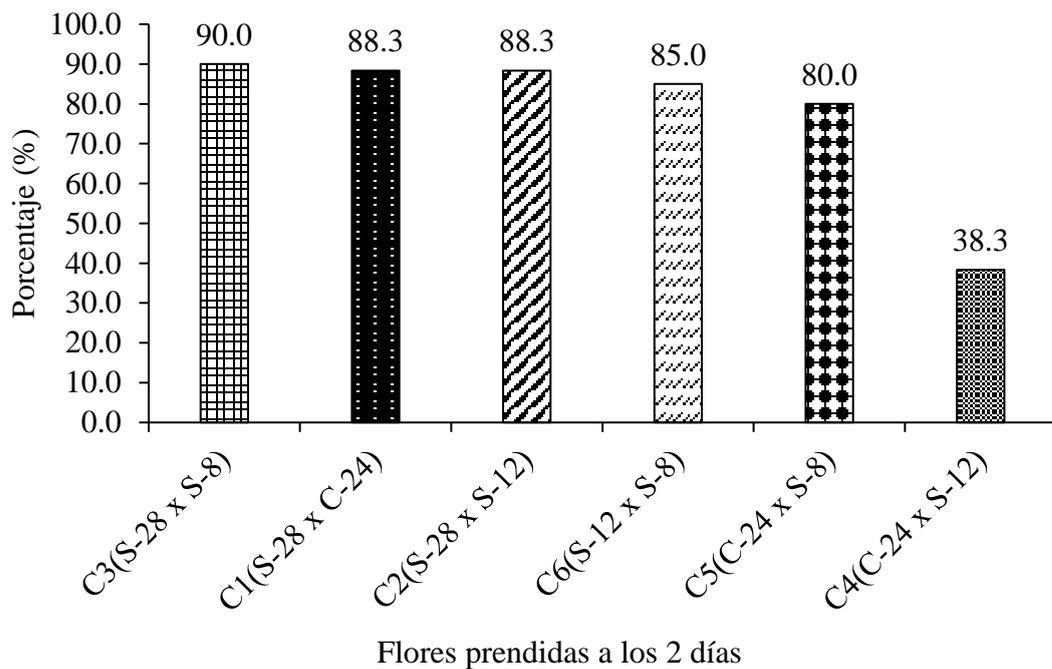
En la figura 4 (C), los valores de preñamiento de los cruzamientos interclonales oscilaron entre 86,7 y 31,7 %. Los cruzamientos C₃ e C₁, presentaron los mayores porcentajes de preñamiento con 86,7 y 85 %, respectivamente; mientras que el cruzamiento C₄, presentó el más bajo porcentaje de preñamiento con 31,7 %; no obstante, fue declarado como un cruce intercompatible (≥ 30 % de flores preñadas).

En la figura 4 (D), los porcentajes de cruzamientos se variaron entre 83,3 y 31,7 %. Los tratamientos C₃ e C₁ presentaron los mayores porcentajes de preñamiento con 83,3 y 83,3 %, respectivamente; mientras que el cruzamiento C₄, presentó el más bajo porcentaje de preñamiento con 31,7 %, ya declarado como cruce intercompatible (≥ 30 % de flores preñadas).

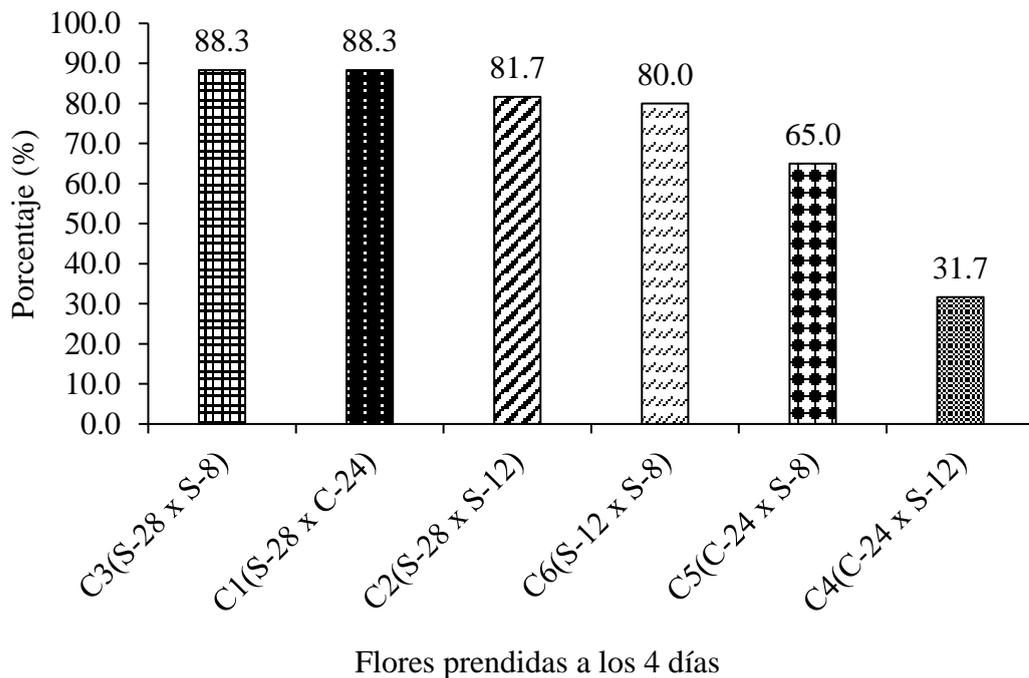
Tabla 9. Prueba de Duncan ($\alpha \leq 0,05$) para porcentaje de flores prendidas a los 2, 4, 8 y 15 días después de la polinización cruzada de cuatro clones de cacao.

Tratamiento	Clones	Días de evaluación							
		2 días		4 días		8 días		15 días	
		Promedio	Sig.*	Promedio	Sig.*	Promedio	Sig.*	Promedio	Sig.*
C ₃	S-28 x S-8	90,0	a	88,3	a	86,7	a	83,3	a
C ₁	S-28 x C-24	88,3	a	88,3	a	85,0	a	83,3	a
C ₂	S-28 x S-12	88,3	a	81,7	a	75,0	a b	71,7	a
C ₆	S-12 x S-8	85,0	a	80,0	a	75,0	a b	70,0	a b
C ₅	C-24 x S-8	80,0	a	65,0	b	60,0	b	55,0	b
C ₄	C-24 x S-12	38,3	b	31,7	c	31,7	c	31,7	c

(*) Letras iguales en la misma columna, no existe diferencias estadísticas significativas.

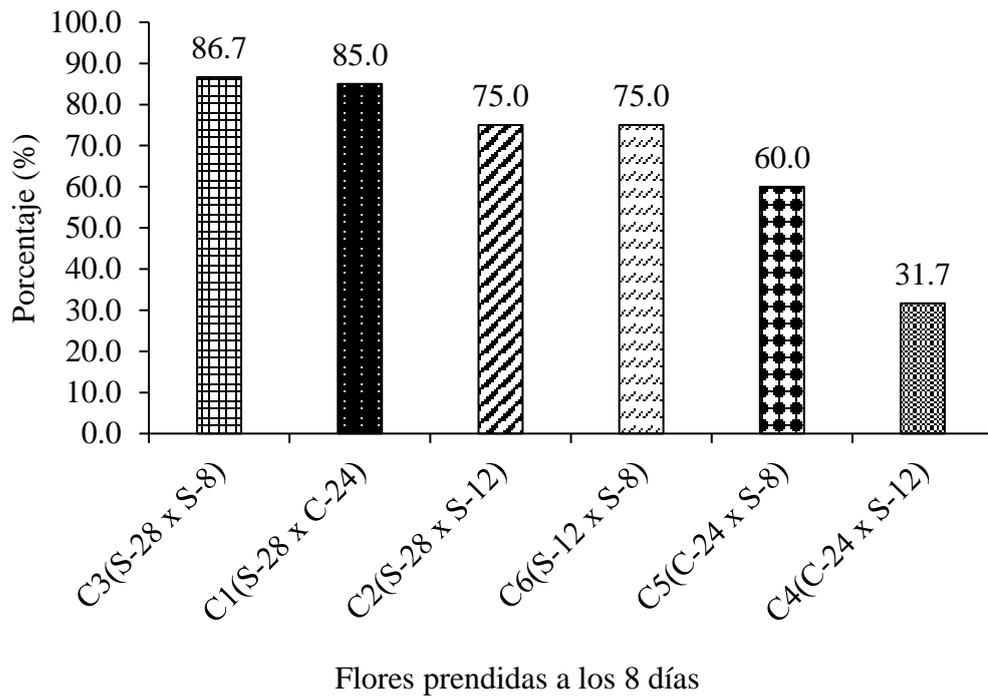


A. Porcentaje de flores prendidas a los 2 días

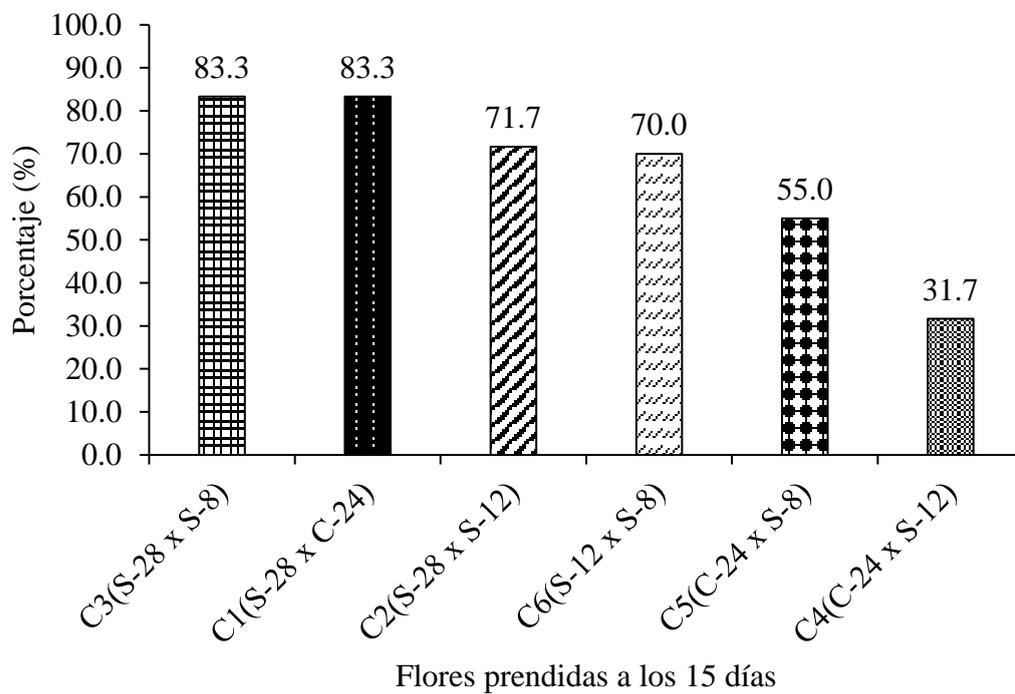


B. Porcentaje de flores prendidas a los 4 días

Figura 3. Porcentaje de flores prendidas a los 2 (A) y 4 días (B) después de la polinización cruzada de cuatro clones de cacao.



C. Porcentaje de flores prendidas a los 8 días



D. Porcentaje de flores (mini-frutos) prendidas a los 15 días

Figura 4. Porcentaje de flores prendidas (mini-frutos) a los 8 (C) y 15 días (D), después de la polinización cruzada de cuatro clones de cacao.

En la tabla 10 se muestra un resumen de cruzamientos compatible/ incompatible de cuatro clones de cacao y los valores del Chi-cuadrado. En dicha tabla se interpreta que al superar el valor de Chi cuadrado X^2 t (3,84), se rechaza la hipótesis planteada (proporción teórica 1:1) de compatibilidad e incompatibilidad, respectivamente, clasificándose como cruzamiento intercompatible.

Comparando los valores observados a los 15 días después de la polinización cruzada, con el valor mínimo esperado ($x = 30\%$ de flores prendidas), o polinizaciones exitosas para calificar como compatible un cruzamiento interclonal. Al evaluar a los 2, 4 y 8 días después que las flores fueron alopolinizadas (polinización cruzada), se presentaron los valores más altos de flores prendidas ($x \geq 30\%$).

Tabla 10. Evaluación de cruzamientos compatibles/incompatibles y calificación de la compatibilidad de cuatro clones de cacao a los 2, 4, 8 y 15 días después de la polinización.

Cruza	Clones	Días de evaluación										TFP (%)	TFNP (%)	X ²
		0 días		2 días		4 días		8 días		15 días				
		NFP	NFNP	NFP	NFNP	NFP	NFNP	NFP	NFNP	NFP	NFNP			
C ₁	S-28 x C-24	60	0	53	7	53	7	51	9	50	10	83,3	16,7	C
C ₂	S-28 x S-12	60	0	53	7	49	11	45	15	43	17	71,7	28,3	C
C ₃	S-28 x S-8	60	0	54	6	53	7	52	8	50	10	83,3	16,7	C
C ₄	C-24 x S-12	60	0	27	37	19	41	19	41	19	41	31,7	68,3	C
C ₅	C-24 x S-8	60	0	48	12	39	21	36	24	33	27	55,0	45,0	C
C ₆	S-12 x S-8	60	0	51	9	48	12	45	15	42	18	70,0	30,0	C

NFP= Número de flores preñadas. NFNP= Número de flores no preñadas. TFP= Total de flores preñadas.

TFNP= Total de flores no preñadas. C= Compatible.

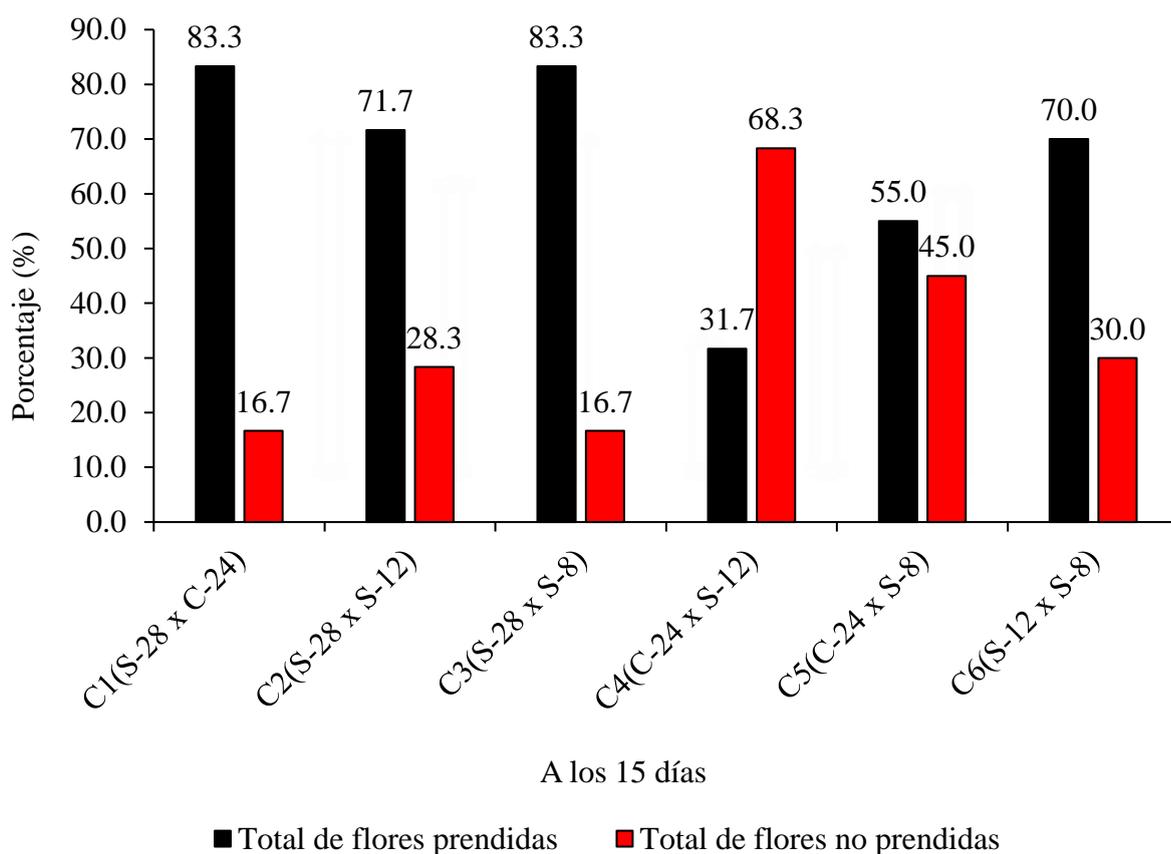


Figura 5. Porcentaje de flores prendidas y no prendidas de cruces entre cuatro clones de cacao a los 15 días después de la polinización.

En la figura 5 se muestra el porcentaje de flores prendidas y no prendidas del cruzamiento de 4 clones de cacao a los 15 días después de realizadas las polinizaciones. Se observa que los cruces S-28 x S-8 y S-28 x C-24, lograron los máximos porcentajes con 83,3 % de flores prendidas, siguiéndole el cruce S-28 x S-12, con 71,7 %; mientras que el cruce C-24 x S-12 obtuvo más bajo valor de prendimiento, con 31,7 %.

Los resultados de las evaluaciones de flores prendidas a los 2, 4, 8 y 15 días como consecuencia de los cruzamientos interclonales de 4 clones de cacao (Tabla 10), permiten señalar que con excepción del cruzamiento C-24 x S-12 que tan solo obtuvo el 38,3 % de flores prendidas al segundo día de evaluación, los demás cruzamientos superaron el 80 % de prendimiento. Estos resultados se pueden atribuir, por una parte, a la disimilitud de alelos de incompatibilidad (S₁-S₅) de los genotipos participantes de los cruzamientos o, por otra parte, a la presencia de alelos de compatibilidad recesivos (S₆) que portan los genotipos heterocigotos.

Si nos apoyamos de Mazeira (2013), la variación de flores prendidas en cada clon puede ser atribuida a los genes precursores de incompatibilidad. A los 15 días de la evaluación, el rango de flores prendidas (cuajadas) osciló de 83,3 % hasta 31,7 % que correspondió al cruzamiento C-24 x S-12; considerándose a todos los clones como de cruce intercompatible con cierta variación en su expresión con respecto a la evaluación del octavo día. Mazeira (2013) encontró un resultado de 43 % de flores fecundadas, muy cercano al de este estudio y que puede ser atribuido a una incompatibilidad parcial, tal como lo sostiene Padilla (1995) al evaluar 4 clones autocompatibles y de cruce intercompatible.

Asimismo, Diaz y Urbina (2015) reportan resultados similares a los de nuestro estudio donde todos los cruces resultaron intercompatibles con porcentajes de 55 hasta 91 % de flores prendidas. Sin embargo, Claude et al, (2017) en polinizaciones cruzadas obtuvo como máximo 24 % de flores prendidas, pudiéndose atribuir a clones con diferentes genotipos de incompatibilidad respecto a los nuestros y con diferente procedencia geográfica y grado evolutivo.

El cruce C-24 x S-12 que logró el menor valor de flores prendidas, a pesar de que el clon C-24 es autocompatible en un 55 %, y el clon S-12 es autoincompatible con 6,7 % de prendimiento, la baja respuesta de intercompatibilidad se atribuiría a la compartición de alelos dominantes de incompatibilidad similares en ambos progenitores que provocaría una reacción de rechazo semejante a una reacción antígeno-anticuerpo, resultado ser un cruce intercompatible cuyo valor superó ligeramente el valor crítico ($x \geq 30$ %) de flores prendidas. Mazeira (2013) sostiene que los árboles autoincompatibles pueden ser de cruce compatible cuando se polinizan con otro grupo de árboles de cacao.

Como el valor de X^2 calculado supera al valor de X^2 tabular para una proporción teórica de 1:1, ubicándose en la región de rechazo de la H_0 , se decide rechazar esta segregación; es decir, 50 % compatible y 50 % incompatible, con excepción del cruce C-24 x S-8 que alcanzó un 55 % de flores prendidas a los 15 días después de realizada la polinización cruzada.

4.3. De los diseños policlonales

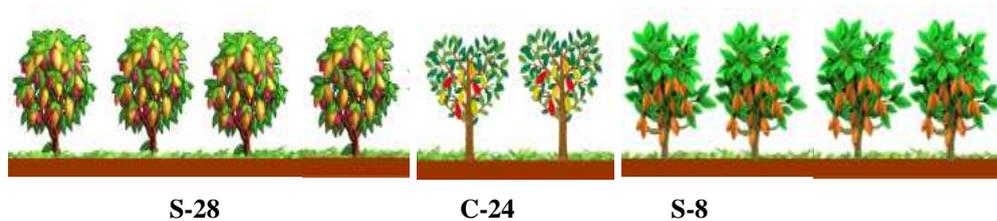
En función de los porcentajes de autocompatibilidad e intercompatibilidad clonal, en la tabla 11, de doble entrada (diseño dialélico), se presenta los porcentajes de flores prendidas en autopolinizaciones (diagonal) y polinizaciones cruzadas, organizadas de tal manera que nos permiten analizar y proponer un diseño policlonal. Para tal efecto, se seleccionaron aquellos

clones que alcanzaron los más altos porcentajes de autocompatibilidad y/o intercompatibilidad. Así, los materiales genéticos seleccionados fueron los clones autoincompatibles (S-28 con 80 % y S-8 con 70 %) y los cruzamientos intercompatibles (S-28 x C-24 y S-28 x S-8), ambos con 83,3 %. Si bien los cruzamientos S-28 x S-12, con 71,7 % y S-12 x S-8, con 70 %, no fueron incluidos; sin embargo, cualquiera de ellos podría ser incluidos en algún diseño policlonal, previamente validado.

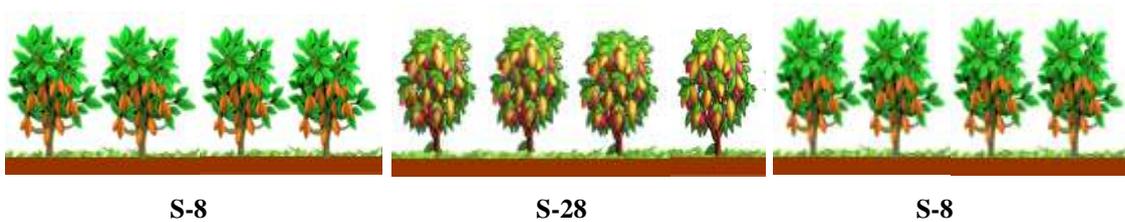
Tabla 11. Porcentaje de flores prendidas de cuatro clones de cacao en autopolinizaciones y polinizaciones cruzadas.

♀ / ♂	S-28	C-24	S-12	S-8
S-28	80	83,3	71,7	83,3
C-24		55	31,7	55
S-12			6,7	70
S-8				70

De acuerdo con los clones y los cruces escogidos, en la figura 5, se propone dos diseños policlonales. El diseño 1 incluye tres clones, el clon S-28 con cuatro hileras, seguido por el clon C-24 con dos hileras, y luego el clon S-8 con cuatro hileras, todos clones autocompatibles y con altos porcentajes de intercompatibilidad. El diseño 2 incluye solo dos clones autocompatibles e intercompatibles que se distribuyen del modo siguiente: el clon S-8 con cuatro hileras, seguido del clon S-28 con cuatro hileras y luego el clon S-8 con cuatro hileras, y así sucesivamente. Abajo, se presentan las dos propuestas de diseños de cultivares policlonales:



A. Diseño 1



B. Diseño 2

Figura 4. Diseños de arreglos policlonales de cacao (A) Diseño 1. (B) Diseño 2.

En la tabla 11, a manera de un dialelo, se presentaron los valores porcentuales de la autocompatibilidad e intercompatibilidad de los clones estudiados. Con fines de selección y siendo el propósito de incrementar la producción de mazorcas por árbol mediante los agentes polinizadores y coincidente con Phillips et al. (2012), se eligieron los mejores clones autocompatibles y de cruce intercompatible con el fin de diseñar parcelas policlonales. El uso de más de dos o más clones tiene como ventaja el incremento la productividad en función del alto grado de intercompatibilidad y reducir la vulnerabilidad genética. Aparte de la diversificación del material genético (Arvelo, et al., 2017), que contribuye con la conservación de la biodiversidad y de los agentes polinizadores, permite la mitigación de los efectos del cambio climático coadyuvando en la restauración del paisaje.

Los clones autocompatibles S-28 sembrados en cuatro hileras, C-24 en dos hileras y S-8 en cuatro hileras a 3 x 3 m., facilitan que los agentes polinizadores puedan desarrollar mejor su función y puedan incrementar la producción de frutos como consecuencia del alto porcentaje de intercompatibilidad. Para asegurar y/o potenciar esta labor, se requiere mejorar las condiciones de los nichos reproductivos para incrementar la densidad poblacional y la eficiencia de las mosquitas polinizadoras, particularmente del género *Forcypomyia spp.* No está demás señalar que no se presentan restricciones a la fecundación cuando se siembran árboles en

mezclas o en hileras (simples, dobles o triples) con el fin de que se puedan distribuirse los diferentes clones (Echeverri, 2013).

En las especies hermafroditas como el cacao, la incompatibilidad, se erige como una barrera reproductiva que evita la pérdida de vigor y la consanguinidad cuando se cruzan plantas del mismo género, especie o variedades, pero autoincompatibles (Vernonica y Tong, 2008). La utilización de variedades policlonales autocompatibles y de cruza intercompatible es una estrategia que una vez validada se puede constituir en un eficiente y eficaz sistema de producción que ayude a incrementar los niveles de productividad y producción de almendras de cacao.

V. CONCLUSIONES

1. A los 15 días después de la autopolinización, los clones: S-28 con 80 %, S-8 con 70 % y C-24 con 55 % de flores prendidas, se clasifican como clones autocompatibles, mientras que el clon S-12 con 6,7 % de flores prendidas (fecundadas), se le clasifica como clon autoincompatible.
2. A los 15 días después de la polinización cruzada, las cruzas interclonales con los más altos porcentajes de intercompatibilidad son: S-28 x S-8, con 83,3 %; S-28 x C-24, con 83,3 % y S-28 x S-12, con 71,7 % de flores prendidas (fecundadas), se consideran como cruzas intercompatibles.
3. Los dos diseños policlonales propuestos: Diseño 1, conformado por los clones autocompatibles S-28 (cuatro hileras) junto al clon C-24 (dos hileras) y del clon S-8 (cuatro hileras), alcanzan más del 70 % de intercompatibilidad. El Diseño 2 conformado por los clones S-8, S-28 con cuatro hileras c/u, distribuidos en forma intercalada, permiten asegurar un alto nivel de intercompatibilidad y muy alto nivel de autocompatibilidad.

VI. PROPUESTAS A FUTURO

1. Realizar evaluaciones de autocompatibilidad e intercompatibilidad con otros clones promisorios que sobresalgan por su productividad, calidad y/o tolerancia a plagas y enfermedades.
2. Evaluar y comparar la reacción de compatibilidad en épocas de invierno y verano para estudiar la posible influencia de la temperatura y la precipitación en el prendimiento de las flores.
3. Comparar y validar los dos diseños policlonales propuestos con el clon CCN-51 cultivado en sistema monoclonal.

VII. REFERENCIAS

1. Andrade, G.E.R. (2011). *Incidencia del tiempo de polinización artificial y la relación estambre – flor sobre la fecundación y desarrollo inicial de mazorca en cuatro clones de cacao (Theobroma cacao L.) en la Estación Experimental de Sapecho*. Tesis de Ingeniero Agrónomo. Universidad Mayor de San Andrés. Bolivia. 119 p.
2. Aranzazu, F., Martínez, N. y Rincón, D. (2008). Autocompatibilidad e íntercompatibilidad sexual de materiales de cacao. Proyecto FEDECACAO. Colombia. 28 p.
3. Arciniegas, A. M. (2005). *Caracterización de árboles superiores de cacao (Theobroma cacao L.) seleccionados por el programa de mejoramiento genético del CATIE*. Tesis Mg. Sc., en el Programa de Enseñanza para el Desarrollo y la Conservación. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. Turrialba, Costa Rica. 126 p.
4. Arguello, O. y Mejía, L. (2000). Variabilidad morfológica de 59 árboles de cacao (*Theobroma cacao* L.) en Santander. Tecnología para el mejoramiento de sistema de producción de cacao. CORPOICA. Bucaramanga, Colombia. p. 50 - 54
5. Arvelo M, Gonzáles D., Maroto S., Delgado, T. y Montoya, P. (2017). Manual técnico del cultivo de cacao. Prácticas latinoamericanas. Instituto Interamericano para la Agricultura (IICA). p. 38-39
6. Cheesman, E. (1938). Fertilization and embryogeny in *Theobroma cacao* L. *Ann. of. Bot.* 41(161): 107-126
7. Cheesman, E. (1944). Notes on nomenclature, classification and possible relationships of cacao populations. *Tropical Agriculture*, 22:4-159
8. Cope, F. (1939). Studies in the mechanism of self-incompatibility in cacao. Imperial College of Tropical Agriculture. *Trinidad*, 8:20-21
9. Cope, F. (1962). The mechanism of pollen incompatibility in *Theobroma cacao* L. *Heredity*, 17: 157-182
10. Córdova, C., Cerda, R., Deheuvels, O., Hidalgo, E. y Declerck, F. (2013). Polinizadores, polinización y producción potencial de sistemas agroforestales de Bocas del Toro, Panamá. *Agroforestería en las Américas*, 49: 26-32.

11. Claude, N.J.; Kahia, J. & Kouamé, C. (2017). Compatibility of ten elite cocoa (*Theobroma cacao* L.) clones. *Act Horticulturae*. 3(45):1-8.
12. Diaz, T.E.Y. y Urbina, E.J.W. (2015). *Estudio sobre la auto/inter compatibilidad de cinco clones de cacao (Theobroma cacao L.), en el Centro de Desarrollo Tecnológico del INTA-El Recreo, El Rama, RAAS*. Tesis de Ingeniero Agrónomo. Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua. 48 p.
13. Echeverri, R.J. (2013). Tecnología moderna en la producción de cacao: Manual para productores orgánicos. Ministerio de Agricultura y Ganadería. *Costa Rica*. 29-33 p.
14. Enríquez, G. (1985). Curso sobre el cultivo de cacao. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. *Costa Rica*. p. 30 - 44
15. Enríquez, G. (1970). La incompatibilidad en cacao. Boletín Divulgativo EET/70-05, Instituto Autónomo de Investigaciones Agropecuarias, Estación Experimental Tropical Pichilingue. s/p.
16. Ford, C.S. & Wilkinson, M.J. (2012). Confocal observations of late-acting self-incompatibility in *Theobroma cacao* L. *Sex. Plant Reproduction*, 25(3): 169-183.
17. García, L.F. (2017). Recursos genéticos, Genética y Mejoramiento del Cacao. Universidad Nacional Agraria de la Selva. Tingo María. 165 p.
18. García, L.F. (2008). Caracterización molecular de 11 árboles de cacao mediante marcadores *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP), de la iniciativa “Buscando el Cacao de Oro de Perú”. Informe Final de Consultoría. USAID PERU/PDA. Lima. 17 p.
19. García, L.F. (2000). Grupos y variedades de cacao. Cultivo del Cacao en la Amazonía Peruana. Arca, M. (ed.), Instituto Nacional de Investigación Agraria (INIA), Lima. p. 16-26
20. García, J. (2018). *Selección por hipoacumulación de metales pesados en órganos vegetativos y reproductivos de clones de cacao (Theobroma cacao L.) en la estación Tulumayo*. Tesis de Ingeniero Agrónomo. Universidad Nacional Agraria de la Selva. Tingo María. Perú. 75p.
21. Glendining, D.R. (1960). Selfing of self-incompatible cocoa. *Nature*, 187: 170

22. Dostert N., Roque, J., Cano, A., La Torre, M. y Weigend, M. (2011). Hoja botánica: Cacao. Programa Desarrollo sostenible-GIZ. Lima. p. 13-14.
23. Knight, R. & Rogers, H. (1953). Incompatibility in *Theobroma cacao* L. *Heredity*, 9 : 67-69.
24. Lanaud, C., Fouet, O., Legavre, T., Lopes, U., Sounigo, O., Eyango, M., Mermaz, B., Ramos, M., Llor. R., Argout, X., Gyapay, G., Ebai, H., Colonges, K., Sanier, C., Mastin, E., Nicholas, G., Boccara, M., Verdeil, J., Efombagn, I., Peres, K. & 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
25. León, J. (2002). Botánica de los cultivos tropicales. 3^{ra} ed. IICA. San José, Costa Rica. 678 p.
26. Mazeira, H.F.E. (2013). *Compatibilidad genética en árboles de cacao (Theobroma cacao L.) tipo Nacional in situ en la zona de Valencia durante la época seca*. Tesis Ingeniero Agropecuario. Universidad Técnica Estatal de Quevedo. Quevedo - Ecuador. 53 p.
27. Noriega, C. (2012). *Determinación de la habilidad combinatoria de 14 clones de cacao de tipo Nacional seleccionados por el INIAP en la Estación Experimental Litoral Del Sur (EELS)*. Tesis Ingeniero Agropecuario. Escuela Politécnica del Ejército. Ecuador 74 p.
28. Padilla, A.N.O. (1995). *Determinación de la autocompatibilidad de 21 plantas elites seleccionadas en un ensayo comparativo de 36 genotipos de cacao (Theobroma cacao L.)*. Trabajo de Diplomado para Ingeniero Agrónomo. Universidad Nacional Agraria. Managua, Nicaragua. 28 p.
29. Phillips, W.; Arciniegas, A.; Mata, A. y Motamayor, J.C. (2012). Catálogo de clones de cacao seleccionados por el CATIE para siembras comerciales. Manual Técnico n°. 105. Costa Rica. 69 p.
30. Puentes, P.Y.J.; Menjivar, F.J.C. y Ortíz, C.A.M. (2016). Eficiencia fisiológica de uso de NPK en clones autoincompatibles y autocompatibles de cacao (*Theobroma cacao* L.) en Colombia. *Revista de investigación Agraria y Ambiental*, 7(1): 17-24.

31. Stein, J., Howlett, B., Nasrallah, M., & Narsallah, J. (1991). Molecular cloning of a putative receptor protein kinase gene encoded at the self-incompatibility locus of *Brassica oleracea*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, EE. UU*, 88: 8816-8820.
32. Tovar, G. y Ortiz, M. (1991). Evaluación de algunos componentes del rendimiento en una plantación de híbridos de cacao de 5 años en la región de Granada. *Agronomía Colombiana*. 8(1): 105-115.
33. Vera, J., Cabrera, R., Morán, J., Neira, K., Haz, R., Vera, J., Molina, H., Moncayo, O., Díaz, E. y Cabrera, C. (2016). Evaluación de tres métodos de polinización artificial en clones de cacao (*Theobroma cacao* L.) CCN-51. *IDESIA*, 34 (6):35-40.
34. Vernonica, E. & Tong, F. (2008). *Self-incompatibility in flowering plants; evolution, diversity, and mechanisms*. Springer. USA. 313 p.
35. Zavaleta, O. (1992). *Estudio de la incompatibilidad en 10 clones de cacao (Theobroma cacao L.) colectados en las cuencas de los ríos Huallaga y Ucayali*. Tesis Ingeniero Agrónomo. Universidad Nacional Agraria de la Selva. Tingo María. p. 55-81.

VIII. ANEXO

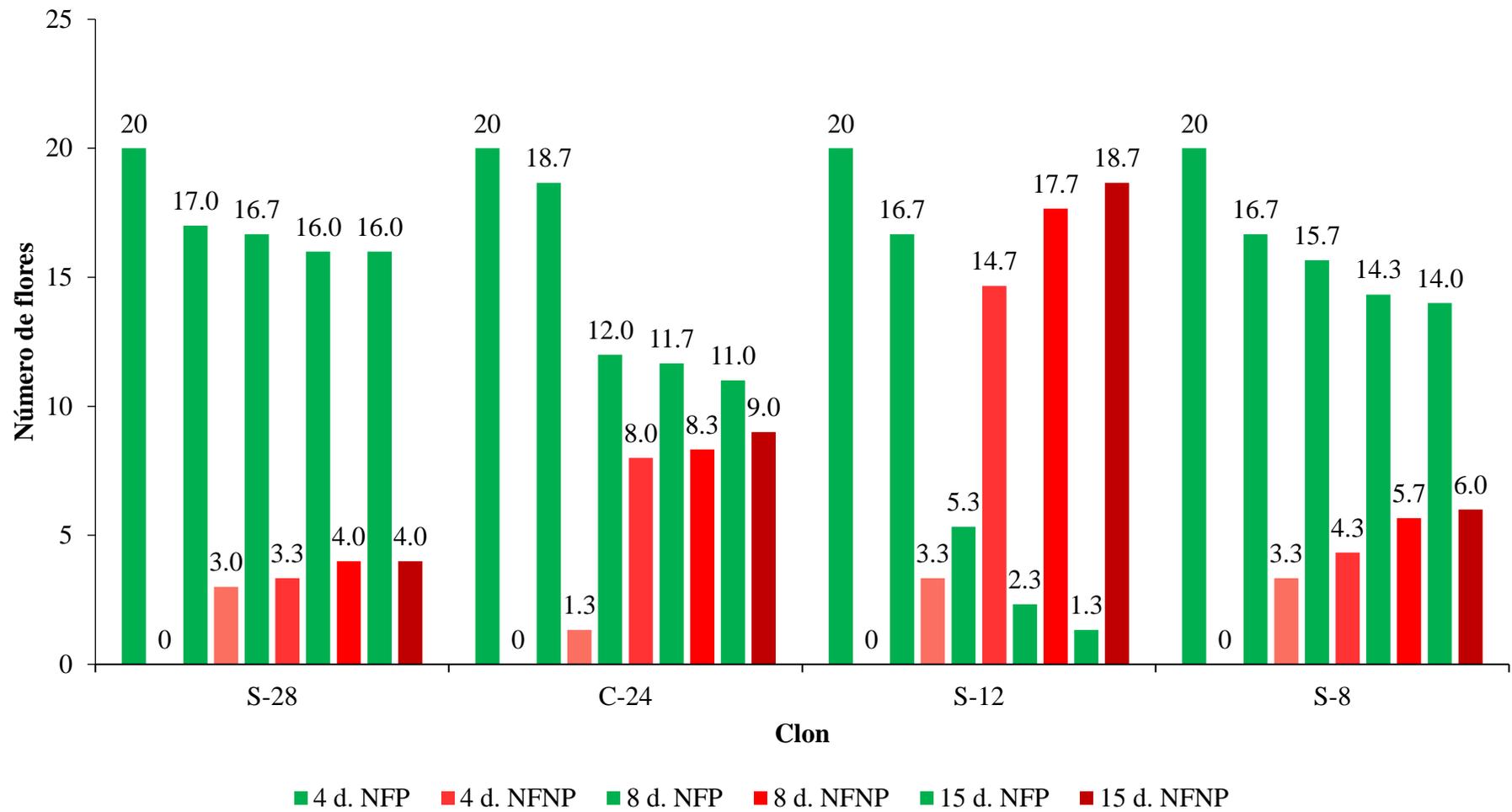


Figura 5. Flores prendidas y no prendidas de cuatro clones de cacao a los 2, 4, 8 y 15 días después de las autopolinizaciones.

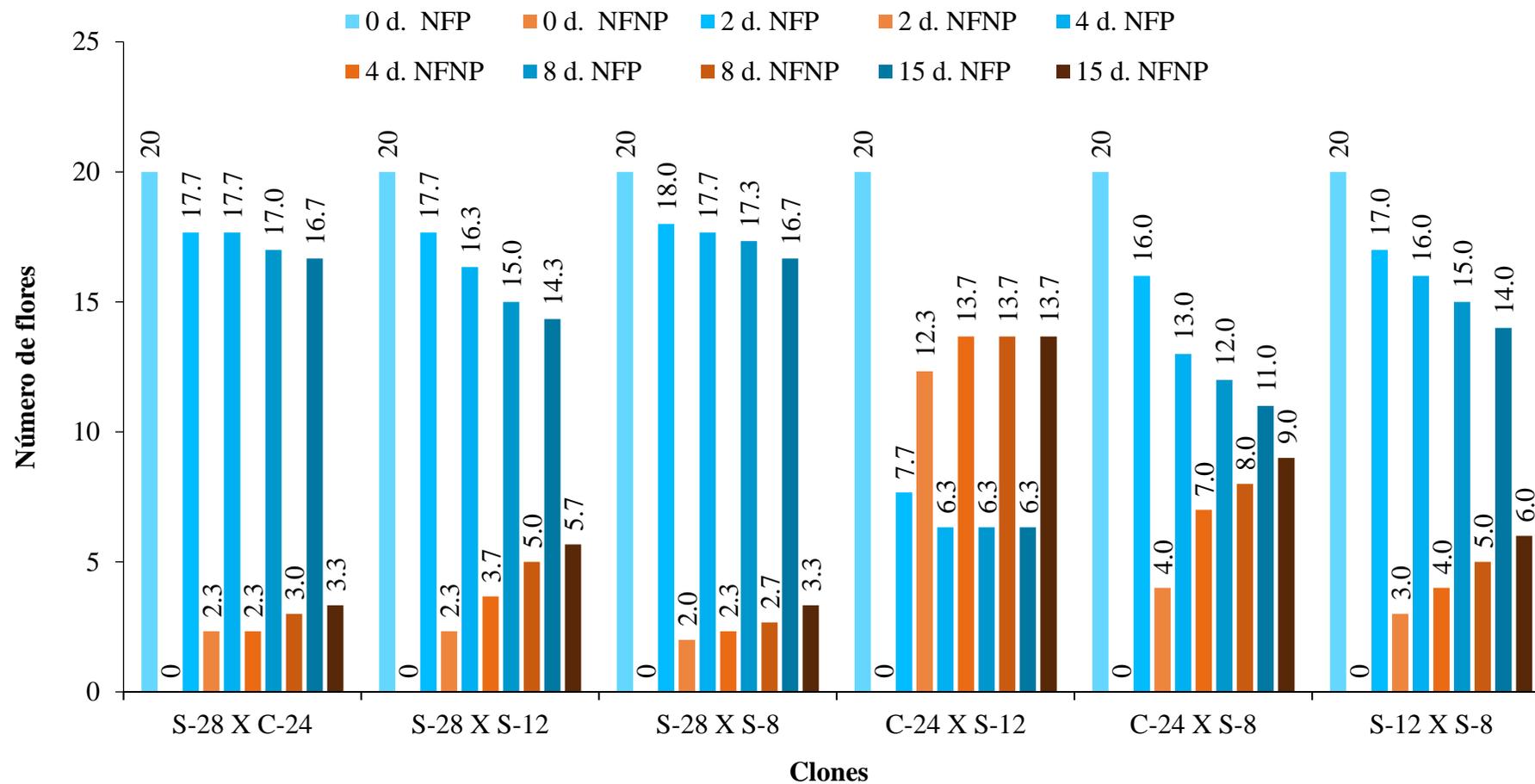


Figura 6. Flores prendidas y no prendidas de cruzamientos de cuatro clones de cacao a los 2, 4, 8 y 15 días después de las polinizaciones cruzadas.

Tabla 12. Determinación de la compatibilidad/intercompatibilidad de cuatro clones a los 2 días después de la polinización.

Autopolinización	Clon	NFT	NFP	NFNP	% P	Compatibilidad
A ₁	S-28	60	51	9	85,0	C
A ₂	C-24	60	56	4	93,3	C
A ₃	S-12	60	50	10	83,3	C
A ₄	S-8	60	50	10	83,3	C
Cruzamiento	Clones	NFT	NFP	NFNP	% P	Compatibilidad
C ₁	S-28 x C-24	60	53	7	88,3	C
C ₂	S-28 x S-12	60	53	7	88,3	C
C ₃	S-28 x S-8	60	54	6	90,0	C
C ₄	C-24 x S-12	60	23	37	38,3	C
C ₅	C-24 x S-8	60	48	12	80,0	C
C ₆	S-12 x S-8	60	51	9	85,0	C

NFT: Número de flores totales.

NFP: Número de flores prendidas.

NFNP: Número de flores no prendidas.

% P: Porcentaje de prendimiento.

C: Compatible.

I: Incompatible.

Tabla 13. Determinación de la compatibilidad/intercompatibilidad de cuatro clones de cacao a los 4 días después de la polinización.

Autopolinización	Clon	NFT	NFP	NFNP	% P	Compatibilidad
A ₁	S-28	60	50	10	83,3	C
A ₂	C-24	60	36	24	60,0	C
A ₃	S-12	60	16	44	26,7	I
A ₄	S-8	60	47	13	78,3	C
Cruzamiento	Clones	NFT	NFP	NFNP	% P	Compatibilidad
C ₁	S-28 x C-24	60	53	7	88,3	C
C ₂	S-28 x S-12	60	49	11	81,7	C
C ₃	S-28 x S-8	60	53	7	88,3	C
C ₄	C-24 x S-12	60	19	41	31,7	C
C ₅	C-24 x S-8	60	39	21	65,0	C
C ₆	S-12 x S-8	60	48	12	80,0	C

NFT: Número de flores totales.

NFP: Número de flores prendidas.

NFNP: Número de flores no prendidas.

% P: Porcentaje de prendimiento.

C: Compatible.

I: Incompatible.

Tabla 14. Determinación de la compatibilidad/intercompatibilidad de cuatro clones de cacao a los 8 días después de la polinización.

Autopolinización	Clon	NFT	NFP	NFNP	% P	Compatibilidad
A ₁	S-28	60	48	12	80,0	C
A ₂	C-24	60	35	25	58,3	C
A ₃	S-12	60	7	53	11,7	I
A ₄	S-8	60	43	17	71,7	C
Cruzamiento	Clones	NFT	NFP	NFNP	% P	Compatibilidad
C ₁	S-28 x C-24	60	51	9	85,0	C
C ₂	S-28 x S-12	60	45	15	75,0	C
C ₃	S-28 x S-8	60	52	8	86,7	C
C ₄	C-24 x S-12	60	19	41	31,7	C
C ₅	C-24 x S-8	60	39	21	60,0	C
C ₆	S-12 x S-8	60	45	15	75,0	C

NFT: Número de flores totales.

NFP: Número de flores prendidas.

NFNP: Número de flores no prendidas.

% P: Porcentaje de prendimiento.

C: Compatible.

I: Incompatible.

Tabla 15. Determinación de la compatibilidad/intercompatibilidad de cuatro clones de cacao a los 15 días después de la polinización.

Autopolinización	Clon	NFT	NFP	NFNP	% P	Compatibilidad
A ₁	S-28	60	48	12	80,0	C
A ₂	C-24	60	33	27	55,0	C
A ₃	S-12	60	4	56	6,7	I
A ₄	S-8	60	42	18	70,0	C
Cruzamiento	Clones	NFT	NFP	NFNP	% P	Compatibilidad
C ₁	S-28 x C-24	60	50	10	83,3	C
C ₂	S-28 x S-12	60	43	17	71,7	C
C ₃	S-28 x S-8	60	50	10	83,3	C
C ₄	C-24 x S-12	60	19	41	31,7	C
C ₅	C-24 x S-8	60	33	27	55,0	C
C ₆	S-12 x S-8	60	42	18	70,0	C

NFT: Número de flores totales.

NFP: Número de flores prendidas.

NFNP: Número de flores no prendidas.

% P: Porcentaje de prendimiento.

C: Compatible.

I: Incompatible.



Figura 7. Rotulado de las plantas y cruza a efectuar.



Figura 8. Estado óptimo de la flor femenina para ser polinizada



Figura 9. Flores extraídas donantes de polen listas para polinizar.



Figura 10. Protector aislante de la flor femenina en la rama de cacao.



Figura 11. Procedimiento de la polinización manual.



Figura 12. Inicio de crecimiento del fruto a los 4 días de la polinización



Figura 13. Observación del mini-fruto a los 8 días de la polinización.



Figura 14. Estado del crecimiento del fruto a los 15 días de la polinización.



Figura 15. Evaluación de flores prendidas y desprendidas.