



## Selección de genotipos de cacao (*Theobroma cacao* L.) con resistencia a escoba de bruja (*Moniliophthora perniciosa*) en Los Ríos, Ecuador

### Selection of cocoa genotypes (*Theobroma cacao* L.) resistant to witch broom disease (*Moniliophthora perniciosa*) in Los Ríos, Ecuador

°Omar Miguel Tarqui Freire<sup>1</sup>, Ignacio Antonio Sotomayor Cantos<sup>1,2</sup>, Teresa de Jesús Casanova Mendoza<sup>1</sup>, Gladys Angélica Rodríguez Zamora<sup>1</sup>, Luis Fernando Plaza Avellán<sup>1</sup>, Fanny Gissela Zambrano Flores<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias-INIAP. Estación Experimental Tropical Pichilingue. CP. 121250. Km 5 1/2 vía Quevedo-El Empalme, cantón Mocache, Los Ríos, Ecuador. °omar.tarqui@iniap.gob.ec; ignacio.sotomayorc@iniap.gob.ec; teresa.casanova@iniap.gob.ec; gladys.rodriguez@iniap.gob.ec; luis.plaza@iniap.gob.ec; fanny.zambrano@iniap.gob.ec

<sup>2</sup>Universidad Técnica Estatal de Quevedo. Facultad de Ciencias Pecuarias, Carrera de Ingeniería Agropecuaria. Campus Finca Experimental "La María". CP. 121250. Km. 7 ½ vía El Empalme, cantón Mocache, Los Ríos, Ecuador. iasotomayor@uteq.edu.ec

Rec.: 24.11.2016. Acept.: 22.02.2017.

Publicado el 1 de junio de 2017

#### Resumen

El Programa de Mejoramiento del Cacao y el Café en el INIAP EET-Pichilingue ha estado estudiando, durante varios años, los genotipos de cacao más altos (*Theobroma cacao* L.) caracterizados por la resistencia genética a las principales enfermedades, especialmente la escoba de brujas (*Moniliophthora perniciosa*) Factor limitante para su cultivo en varios países de América Central y del Sur. El objetivo de la investigación fue identificar y seleccionar los clones de cacao con una baja incidencia de la enfermedad de la escoba de brujas. Se probaron 21 genotipos (14) resultantes de Amazonas x Amazonas y (4) de Amazonas x Cruces Nacionales. Entre la población derivada de cruces nacionales vs. nacionales, no se encontraron genotipos mostrando resistencia a la enfermedad. Además, se seleccionó INIAPT 074 del cruce entre CCN 51 x B 60 y TIP 1 y TAP 6 como clones de control. Se evaluaron las siguientes características: Número de mazorcas sanas (MS), Peso fresco (PF), Número de mazorcas enfermas (ME), Número de escobas vegetativas (EBveg), Número de escobas portadoras (EBcojin) y Número de chirimoyas. Un análisis de componentes principales y un análisis de conglomerados se realizaron utilizando el método de Ward y se construyó un dendrograma para determinar la similitud entre las características productivas y sanitarias. Se determinó que los genotipos resultantes del cruce amazónico x amazónico: INIAPT 527, INIAPT 560 e INIAPT 526 presentaron menor incidencia de escobas y se identificaron como fuentes de resistencia genética a *Moniliophthora perniciosa*.

**Palabras clave:** *Theobroma cacao*, resistencia, enfermedad, genotipo.

#### Abstract

The Cocoa and Coffee Improvement Program at INIAP EET-Pichilingue has been studying, for several years, higher cocoa genotypes (*Theobroma cacao* L.) characterized by genetic resistance to major diseases, especially to witch broom (*Moniliophthora perniciosa*), which is the main limiting factor for its cultivation in several Central and South American countries. The objective of the research was to identify and select those cocoa clones having a low incidence of witch broom disease. 21 genotypes were tested: (14) resulting from Amazonian x Amazonian and (4) from Amazonian x National crossings. Among the population derived from National vs. National crosses, no genotypes showing resistance to the disease were found. In addition, INIAPT 074 was selected from the cross between CCN 51 x B 60 and TIP 1 and TAP 6 were used as control clones. The following features were evaluated: Number of healthy pod (MS), Fresh weight (PF), Number of diseased pod (ME), Number of vegetative brooms (EBveg), Number of bearing brooms (EBcojin) and Number of cherimoya fruits (Fchir). A Principal Components Analysis and a cluster analysis were performed using the Ward method and a dendrogram was constructed to determine the similarity between productive and sanitary characteristics. Was determined that the genotypes resulting from the Amazonian x Amazonian crossing: INIAPT 527, INIAPT 560 and INIAPT 526 presented lower incidence of witch broom, and identified themselves as sources of genetic resistance to *Moniliophthora perniciosa*.

**Key words:** *Theobroma cacao*, resistance, disease, genotype.

## Introducción

El Ecuador participa con el 63% de la oferta mundial de cacao fino aromático. En el 2014 el país exportó 240,000 toneladas métricas, de las cuales 230,000 han sido destinadas al mercado de exportación, situación que ha permitido desplazar del quinto lugar a Camerún (ANECACAO, 2014); y tiene la oportunidad de aumentar su participación con una mayor producción que puede venir de la intensificación tecnológica de sus cacaotales.

La disponibilidad de variedades genéticamente mejoradas con mayor productividad que el material de siembra tradicional, es una condición básica vinculada a la consecución de este objetivo. La obtención de variedades con mayor valor económico depende de procesos de mejoramiento genético y selección conducidos en centros de investigación como la Estación Experimental Tropical Pichilingue (EETP) del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP). En ésta estación experimental, el país cuenta con un banco de germoplasma de cacao compuesto por varias colecciones vivas, además de parcelas de observación y nuevas poblaciones híbridas creadas durante la última década.

La escoba de bruja (*Moniliophthora perniciosa*) es una enfermedad que causa infección en brotes jóvenes, cojinetes florales, yemas vegetativas y en frutos jóvenes; está 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 (Surujdeo-Maharaj, 2003). El uso de genotipos resistentes para el control de las enfermedades es sin duda una herramienta importante para el desarrollo de híbridos con altos niveles de resistencia; por tanto, la obtención de variedades con mayor valor económico, ayudaría a enfrentar este problema, por su efectividad, bajo costo económico y ambiental, como parte de un combate integrado.

Con el propósito de seleccionar genotipos de cacao resistentes a escoba de bruja, se inició un nuevo esquema de cruzamientos elaborado por el personal técnico-científico del Programa Nacional de Cacao y Café del INIAP. Para el efecto, se partió con la selección de progenitores en las colecciones disponibles en la EET-Pichilingue y dos poblaciones híbridas antiguas (más de 50 años de edad). Por consiguiente las selecciones de los progenitores para cada bloque o esquema de cruzamientos, consistieron entre otras características, identificar aquellos con baja incidencia de escoba de bruja. Se desarrollaron tres esquemas de cruzamientos, obteniendo de esta manera tres poblaciones híbridas.

La primera población se obtuvo cruzando clones Amazónicos x Amazónicos; la segunda población se obtuvo cruzando árboles provenientes de hibridaciones, entre cacao de tipo Nacional x Amazónicos y la tercera población se obtuvo cruzando clones de cacao tipo Nacional x Nacional (Peña et al., 2008).

Por lo antes expuesto, el presente estudio se basó en la evaluación de 21 genotipos de cacao obtenidos a partir de plántulas seleccionadas en una gran población híbrida obtenida de los esquemas de cruzamientos comentados anteriormente, y cuyo objetivo principal fue valorar la reacción a la escoba de bruja de genotipos de cacao derivados de híbridos de diverso origen y seleccionar materiales promisorios para uso en mejora genética.

## Materiales y métodos

### Ubicación del experimento y condiciones ambientales

La investigación se ejecutó en la Estación Experimental Tropical Pichilingue del INIAP durante el período de agosto 2006-noviembre 2013, en el km 5 de la vía Quevedo-El Empalme, 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).

El suelo en el sitio experimental presenta textura franco-limosa con un buen nivel de fertilidad y drenaje moderado. La topografía del sitio es ligeramente ondulada, tratándose de un campo experimental heterogéneo se empleó un Diseño de Bloques Completos al Azar (21 genotipos y 4 repeticiones).

### Material genético

El antecedente de esta prueba fue la ejecución de tres esquemas de cruzamientos dirigidos durante el periodo 2003-2004. Obteniendo de esta manera tres poblaciones híbridas. La primera población se obtuvo por el cruce de genotipos Amazónicos x Amazónicos (Población A); la segunda por el cruce de genotipos de cacao de tipo Nacional x Amazónicos (Población B); y la tercera población, al cruzar genotipos de cacao tipo Nacional x Nacional (Población C). Se planificó 157 cruces, de los cuales provienen 91, 30 y 36 de las poblaciones A, B, y C respectivamente. 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, logrando 124 cruces (familias híbridas), de las cuales provinieron 76, 22 y 26 familias híbridas de las poblaciones A, B y C, respectivamente.

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 “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 “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, 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.

#### **Factores en estudio y tratamientos**

Las plántulas híbridas obtenidas de los tres 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 la 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, los mismos que fueron sometidos a una poda ligera para la penetración de luz. Las plántulas fueron ubicadas en una bolsa plástica grande en doble hilera de cinco cada una, con distancia de 0,50 m entre bolsas e hileras. 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 12 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, (666 plantas asintomáticas a escoba de bruja en las evaluaciones); 2) aquellas plantas que presentaron incidencia de la enfermedad durante la primera evaluación y que en el resto de las evaluaciones no presentaron (166 plantas con síntomas en la primera evaluación y asintomáticas en las otras evaluaciones) 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 (277 con menor relación entre diámetro de la escoba de bruja y la base del punto infectado ( $<0.6$ ). 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, que posteriormente se sembraron en campo abierto para su evaluación.

Para el presente experimento se seleccionaron 19 tratamientos (clones provenientes de plantas híbridas), que presentaron menor porcentaje de incidencia a la escoba de bruja. La parcela fue distribuida en cuatro repeticiones, con tres plantas por clon y repetición. Como parte del estudio fueron incluidos dos clones controles el TIP 1 y TAP 6 los cuales presentaron la menor incidencia de escoba de bruja en una investigación previa (Calderón, 2004), para facilitar la interpretación de las respuestas de los nuevos clones. La superficie experimental se encuentra delimitada por una hilera-borde del clon EET 103.

Durante la evaluación se observaron algunos clones que mostraron signos de productividad y resistencia a escoba de bruja. Para el monitoreo cercano de estos comportamiento, se examinó la base de datos construida (enriquecida mensualmente) dentro del período diciembre/2007 a noviembre /2013 (seis años de evaluación). El experimento corresponde a 252 plantas de cacao que han sido registradas normalmente.

Los genotipos derivados de cruzamiento Amazónicos por Amazónicos, correspondientes a la población A fueron INIAPT 200 e INIAPT 277 (AMAZ 11 x TAP 10); INIAPT 054, INIAPT 270 e INIAPT 367 (AMAZ 14 x TIP 1); INIAPT 478 (CUR 3 x TIP 1); INIAPT 176 (TAP 10 x EBC 148); INIAPT 331 (TAP 10 x LCT 368); INIAPT 402 (TAP 10 x CUR 3); INIAPT 560 (TAP 3 x TIP 1); INIAPT 526, INIAPT 527 e INIAPT 528 (TAP 6 x TIP 1); e INIAPT 107 (TIP 1 x LCT 368).

Los genotipos correspondientes a la población B, derivados de los cruzamientos entre Nacional y Amazónico fueron INIAPT 212 (EET 387 x B 60); INIAPT 474 (SIL 1 x B 60); INIAPT 585 e INIAPT 626 (EET 233 x A 645).

De la población C, derivada de los cruces Nacional por Nacional, no hubo genotipos que presentaron resistencia a la enfermedad. Adicionalmente se seleccionó el INIAPT 074 que procede del cruce entre CCN 51 x B 60. Como controles se utilizaron el TIP 1 y TAP 6. Los tratamientos constituyen el número de clones en estudio con clara diferenciación de su origen genético. Las variables registradas cada 15 días, al momento de la cosecha y durante el período de

diciembre 2007 a noviembre 2013 son las siguientes:

**Número de mazorcas sanas.** Cuyas almendras no habían sido afectadas por alguna enfermedad.

**Peso fresco.** Se registró por árbol y se midió con la ayuda de una balanza, en gramos planta<sup>-1</sup>.

**Número de mazorcas con escoba de bruja.** Aquellas mazorcas infectadas con escoba de bruja.

**Número de mazorcas enfermas con Moniliasis.** Mazorcas infectadas por moniliasis.

Mientras, las variables que se registraron una vez al año hacia el final de la época seca (agosto) son:

**Número de escobas vegetativas.** Se contó el número de escobas secas o verdes en la copa. Inmediatamente, después de esta labor las escobas de bruja se desprendieron de la planta y distribuyeron en el suelo para acelerar su descomposición.

**Número de escobas de cojinetes.** Se contaron el número de escobas en los cojinetes florales. Después las escobas de bruja se desprendieron del tronco o ramas, y se distribuyeron en el suelo para acelerar su descomposición.

**Número de frutos chirimoya.** Se contaron el número de frutos chirimoya luego de esto, seguido se desprendieron del tronco o ramas.

#### **Manejo del cultivo durante el estudio**

Para el control de malezas se combinó el uso de una guadaña mecánica motorizada con rozas manuales, éstas últimas, principalmente, para la limpieza de las coronas alrededor de las plantas. La frecuencia del control fue más intensiva durante la época de lluvias (cada 15 días) que promueve el vigoroso crecimiento de las malezas. Se realizaron podas de formación y sanitarias en el tercer trimestre de cada año. Las heridas provocadas por los cortes se protegieron con pasta cúprica, una mezcla de cobre y cal agrícola en una proporción 1:5, mezclada con agua hasta formar una pasta homogénea. El abonamiento consistió de dos aplicaciones anuales de fertilizante completo (N-P-K). La primera se realizó a inicios de la época lluviosa (enero) y la otra hacía el final del mismo período (abril). La dosis total dividida en dos partes iguales consistió de 150 g de Sulfato de Amonio, 350 g de abono completo (10-30-10) y 250 g de urea. La sombra temporal está constituida por plátano (barraganete y dominico), sembrado a un distanciamiento de 5x5 metros, mientras, de sombra

permanente está presente la guaba de bejuco sembrada a un distanciamiento de 15x15 metros. El número de pies de plátano prácticamente había desaparecido al finalizar la investigación.

#### **Análisis Estadístico**

Para visualizar el comportamiento multivariado de todos los individuos, se condujo un Análisis de Componentes Principales (ACP). Después 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. 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**

#### **Variabilidad Genética**

Los estadígrafos de las variables experimentales, de los 21 genotipos de cacao en estudio, se presentan en el cuadro 1. Los altos valores de coeficientes de variación en las variables fruto chirimoya (206.70%) y escoba de bruja cojinete (141.12%) indican una elevada variabilidad en incidencia de escoba de bruja, situación deseable para una población inicial, objeto de selección. Se encontraron clones con poca o casi nula infección de escoba de bruja. Peña (2003), menciona que los caracteres con valores altos son importantes para determinar niveles de variabilidad genética dentro de la especie *Theobroma cacao* L., mientras mayor sean los niveles de variación hay mayores potencialidades de obtener respuestas genéticas a la selección natural o artificial.

#### **Análisis de Componentes Principales (ACP)**

Según los resultados del ACP, el 100% de la varianza total se distribuye en siete componentes principales (CP's). La figura 1 muestra el plano definido por los dos primeros Componentes que conjuntamente explican el 69.30% de la varianza total exhibida por los datos analizados. El primer componente principal

**Cuadro 1. Medias, desviación estándar (DE), coeficiente de variación (CV), valor máximo y valor mínimo de las características productivas y sanitarias de 21 cruces de distinto origen genético**

Variables	Media	DE	CV	Mínimo	Máximo
MS	17.07	19.93	116.70	0.30	71.33
PF	1482.88	1642.49	110.80	20.00	6654.17
ME	4.19	3.15	75.10	0.20	11.27
MEmonil	0.82	0.84	103.20	0.00	4.00
EBveg	4.95	1.68	33.90	0.58	7.45
EBcojin	0.17	0.23	141.10	0.00	0.64
Fchir	0.13	0.26	206.70	0.00	1.17

MS: Mazorcas sanas; PF: Peso fresco; ME: Mazorcas enfermas con escoba de bruja; MEmonil: Mazorcas enfermas con monilia; EB: Escobas de bruja vegetativas; EBcojin: Escobas de bruja cojinetes; Fchir: Frutos chirimoyas.

explica el 51.50% de la variancia total donde se agrupan las características que aportan la mayor información. El segundo componente principal explica el 17.80% de la variación total. Además, los vectores correspondientes a las variables utilizadas, la Figura 1 también muestra la distribución de los puntos que corresponden a los 21 genotipos. 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 527, INIAPT 560 e INIAPT 526) que terminan ubicándose en posiciones bastante distantes respecto a la mayoría, posiblemente influidos por algún carácter particular que los segrega notoriamente, demuestra una importante variabilidad fenotípica, en gran parte, puede explicarse por un fundamento genético. Varios autores (Federec *et al.*, 1987) han demostrado que existe un alto grado de asociación entre la variabilidad fenotípica y genotípica. 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 mayor incidencia de escoba de bruja vegetativas (EBveg). En el mismo plano definido hacia el cuadrante inferior se encuentra otro grupo que presenta mayor incidencia de escobas de bruja cojinetes (EBcojin) y frutos chirimoya (Fchir). A la derecha con una orientación hacia el cuadrante superior del plano definido, 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 (ME). 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 (Nacional, Alto Amazónico y Nacional x Trinitario) 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). Hallazgo reciente (Loor, 2010) muestra que el cacao Alto Amazónico se compone de distintos grupos genéticos, aumentando las oportunidades de recombinación y creación de variabilidad.

#### **Análisis de Cluster**

La amplia variabilidad entre genotipos (Figura 1) se estructuró en tres grupos principales (Figura 2), y describe los resultados del dendograma obtenido por el método de Ward. Los miembros de cada grupo comparten características comunes que los diferencian de los clones en otros grupos. Hay que destacar que el grupo uno, contiene solo tres genotipos distanciados del resto de clones, además, están ampliamente distanciados entre sí (Figura 1). El grupo uno contiene 11 genotipos de cacao (siete provenientes de cruces Amazónicos x Amazónico: INIAPT-331, INIAPT-277, INIAPT-478, INIAPT-367, INIAPT-107, INIAPT-402 e INIAPT-054, 3 de cruces Nacional x Amazónico: INIAPT-585, INIAPT-212 e INIAPT-474 y el control Tap-6), que comparten características de resistencia a la incidencia de mazorcas enfermas (ME). El grupo dos está conformado por tres genotipos provenientes de cruces Amazónico x Amazónico (INIAPT-526, INIAPT-527 e INIAPT-560) que comparten los valores más altos para peso fresco (PF) y mazorcas sanas (MS), y al mismo tiempo, se benefician básicamente por resistencia a escoba de bruja vegetativa (EBveg), cojinetes (EBcojin) y frutos chirimoya (Fchir). El

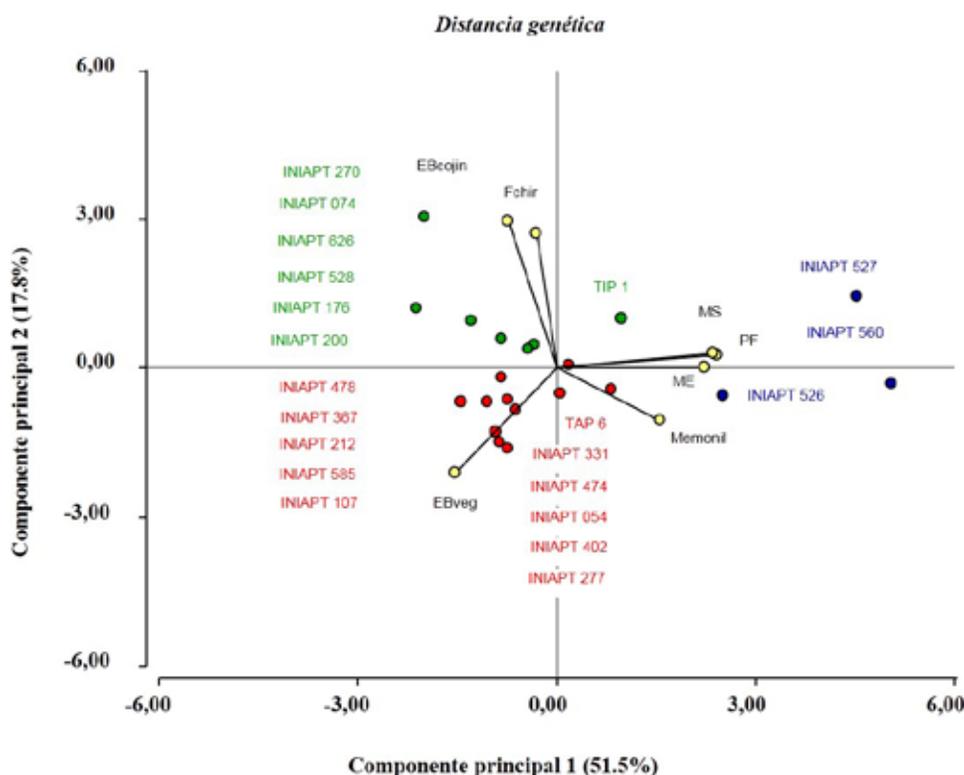


Figura 1. Análisis de Componentes Principales (ACP) de 21 clones seleccionados por presentar resistencia a escoba de bruja

grupo tres contiene siete genotipos (cuatro genotipos procedentes de cruces Amazónico x Amazónicos: INIAPT-270, INIAPT-528, INIAPT-200 e INIAPT-176, un genotipo de cruce entre Nacional x Amazónico: INIAPT-626, el INIAPT-074 proveniente del cruce entre CCN 51 x B60 y el control TIP-1), características de resistencia a moniliasis (MEmonil).

Sin embargo, la amplia variabilidad observada entre estos, según Lerceteau *et al.* (1997), puede deberse al grado de introgresión de genes de clones de origen forastero.

#### Análisis de Varianza multivariado

Para confirmar la separación estadística de los tres grupos definidos por el análisis de Cluster (Fig. 2), se condujo un Análisis de Varianza Multivariado (Hotelling, 1936). Los resultados permiten constatar las diferencias altamente significativas ( $P < 0.0001$ ) entre los grupos analizados, confirmando que los clones en cada grupo comparten características comunes que justifican su inclusión en éstos y exclusión a su vez de los otros grupos. Para separar las medias de grupo se utilizó la prueba de Hotelling ( $P = 0.05$ ).

El grupo dos está marcado con los promedios más

alto para peso fresco (PF) y número de mazorcas sanas (MS), a gran distancia de los promedios de las mismas variables en los grupos restantes. El valor para la variable de peso fresco (PF) en los genotipos del grupo dos es 5032.77. Con relación al número de mazorcas sanas (MS) es 60.49, para el mismo grupo. Las cifras señaladas demuestran que al menos para las variables en cuestión si existen amplias diferencias entre ambos grupos de clones. Aquellos que sobresalen por sus promedios más altos para el peso fresco (PF) y número de mazorcas sanas (MS), son: INIAPT 527, INIAPT 560 e INIAPT 526.

El grupo dos y tres también están marcados con los promedios más bajos para el número de escoba de bruja vegetativa (EBveg) en comparación del grupo uno. El grupo uno y dos, también están marcados con los promedios más bajos para el número de escobas de bruja cojinetes (EBcojin) en comparación del grupo tres.

A pesar de la aparente regularidad de la distribución, se hace difícil la definición de grupos clonales, en los que sus miembros se organizan por compartir similitudes y diferencias que los separan de otros grupos. Por esta razón, los resultados del Análisis

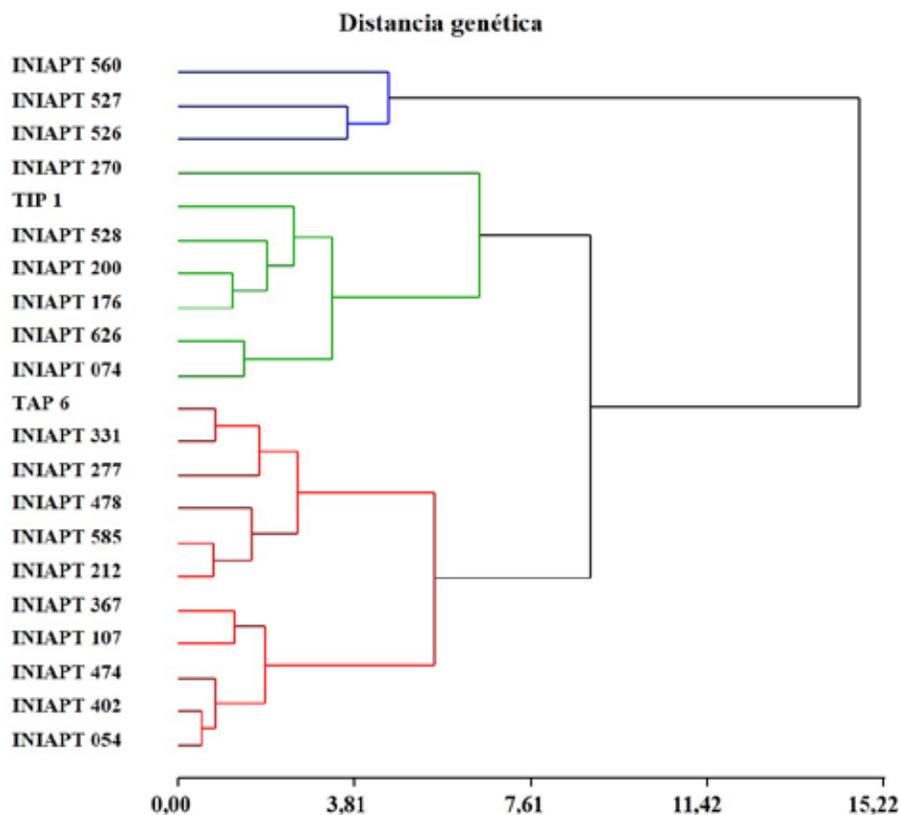


Figura 2. Dendrograma de la similitud entre 21 genotipos de cacao de distinto origen genético

de “cluster”, al provocar la formación de tres grupos de clones en función del desdoblamiento de la varianza multivariada, cumplen un rol clave para la mejor definición de estos grupos, confirmando la amplitud de la variabilidad observada en los análisis previos.

Las diferencias estadísticas altamente significativas entre grupos de clones (análisis de cluster) producto de la aplicación del ANOVA multivariado (Cuadro 2), refuerzan la opinión que la variabilidad estructurada de esa manera, es el resultado de diferencias reales entre grupos de clones, los que comparten estrechamente algunas similitudes como por ejemplo valores altos de pesos fresco (PF) y número de mazorcas sanas (MS). La utilidad de este tipo de análisis como herramienta para explorar los patrones de variabilidad de un número grande de accesiones y orientar la preselección de genotipos superiores, ha sido ampliamente demostrada (Cascante-Sánchez *et al.*, 1991).

### Resistencia a Escoba de bruja

Para la variable de escoba vegetativa (EBveg) los clones que presentaron los valores menores fueron los del grupo dos: INIAPT 527, INIAPT 560 e INIAPT

526 con valores de 0,58; 3,73; y 4,58, lo cual indica que estos clones tienden a infectarse muy poco con esta enfermedad, dando a conocer el grado de resistencia que tienen (Figura 3). Porras y Sánchez (1991), mencionan que el uso de material tolerante contribuye al control de la escoba de bruja. Aquellos genotipos que presentan características promisorias de la enfermedad, provienen de poblaciones híbridas que se cruzaron entre parentales Amazónicos por Amazónicos. La baja incidencia de escoba de bruja presentada por los clones de origen Amazónico podía deberse además de su alto grado de tolerancia a la enfermedad, lo que concuerda con lo manifestado por Evans *et al.* (1977).

La alta variabilidad encontrada en los clones INIAPT 527, INIAPT 560 e INIAPT 526 en lo referente a infección de escoba de bruja revela que es factible encontrar fuentes de resistencia a la enfermedad; lo cual indica que estos clones tienden a infectarse muy poco con esta enfermedad, dando a conocer el grado de resistencia 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

**Cuadro 2. Análisis de varianza multivariado de Hotelling y significación estadística entre grupos**

Grupo de clones	MS	PF	ME	MM	EBveg	EBcojin	Fchir
1	10.41 b	952.22 b	3.07 b	0.72 b	5.62 a	0.01 b	0.07 a
2	60.49 a	5032.77 a	10.20 a	1.89 a	2.96 b	0.03 b	0.14 a
3	8.93 b	795.38 b	3.39 b	0.51 b	4.75 b	0.47 a	0.21 a

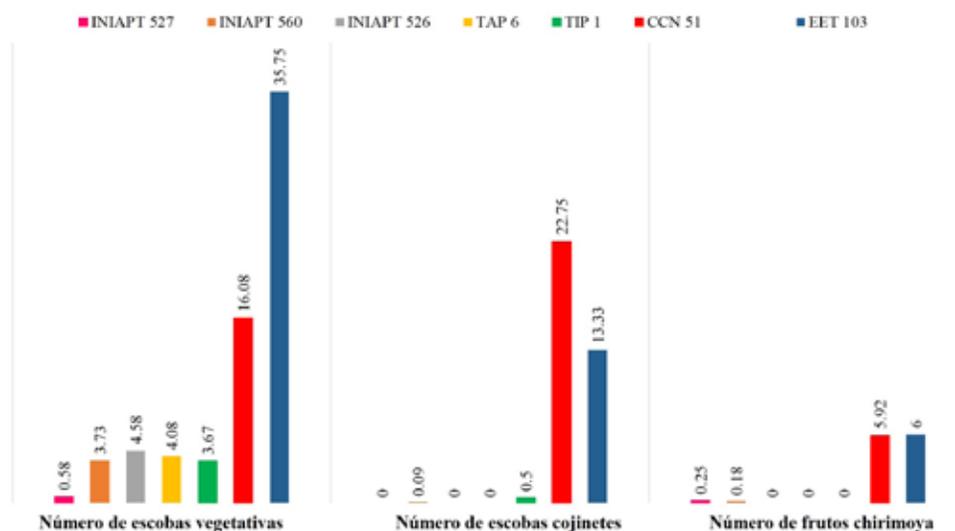
Mazorcas sanas (MS); Peso fresco (PF); mazorcas enfermas (ME); Mazorcas Monilia (MM); EBveg: Escobas de bruja vegetativas; EBcojin: Escobas de bruja cojinetes; Fchir: Frutos chirimoyas. Medias con una letra común, no son significativamente diferentes (Tukey,  $p > 0.05$ )

cacao con resistencia a escoba de bruja, para impedir la utilización de productos químicos, como los fungicidas. Sin embargo, estos tipos de control pueden generar altos costos y en algunos casos, pueden ser ineficaz; debido a la resistencia que pueden desarrollar los microorganismos a este tipo de compuestos, además del impacto negativo en la salud ambiental y humana según (López et al., 2009; Krauss et al., 2010; Medeiros et al., 2010).

Estudio realizado por Calderón (2004), identificó al TAP 6 y TIP 1, como genotipos que presentaron la menor incidencia de Escoba de bruja. Estos árboles fueron recolectados en la Amazonía ecuatoriana, exclusivamente en las riberas de los ríos Tapiche y Tiputine. Aquellos árboles son los progenitores del INIAPT 526, INIAPT 527 e INIAPT 560, considerados genéticamente resistentes a la enfermedad, concordando con Tirado-Gallego et al. (2016), quienes publican que el mejoramiento genético del árbol de cacao se vislumbra como una alternativa para enfrentar estos patógenos al conferir niveles crecientes de resistencia.

Los clones TIP 1 y TAP 6 que actuaron como controles durante la investigación y aunque participaron en todos los análisis multivariados conducidos hasta aquí, no aparecieron en el grupo 2 (INIAPT 526, INIAPT 527 e INIAPT 560) para las variables de escoba vegetativa (EBveg) y escoba cojinete (EBcojin), que fueron los que presentaron rangos menores en estas dos variables, incluso al compararlos con los clones comerciales como EET 103 y CCN 51, con respecto a la incidencia de escoba de bruja. Se puede apreciar que el comportamiento sanitario de estos genotipos es bastante coherente con el desempeño observado en estudios previos en la EETP-Pichilingue, (Tarqui, 2010).

Según estudio realizado por Sánchez-Mora et al. (2012), el clon comercial CCN 51, registró el menor número de escobas por planta; lo cual indica que en los clones INIAPT 527, INIAPT 560 e INIAPT 526, se ha logrado encontrar fuentes de resistencia a esta enfermedad, pues, tienden a infectarse muy poco.



**Figura 3. Resistencia a escoba de bruja en genotipos de cacao de distinto origen genético, en la provincia de Los Ríos-Ecuador**

## Conclusiones

La variabilidad genotípica de 21 clones estudiados de distinto origen genético: Amazónico x Amazónico (14), Amazónico x Nacional (4), genotipo proveniente del cruce entre CCN 51 x B60 (1) y los controles (2), fue muy alta en las características sanitarias relacionadas con escoba de bruja, lo que indica una elevada potencialidad de obtener respuestas genéticas a la selección.

Se identificaron tres clones derivados del cruzamiento entre genotipos Amazónico x Amazónico: INIAPT 527, INIAPT 560 e INIAPT 526 con menor incidencia de la enfermedad, que pueden considerarse fuentes de resistencia genética frente a la *Moniliophthora perniciosa*, y usarse en futuros programas de mejoramiento genético.

## Bibliografía

- Anecacao (2014). Exportaciones de cacao del Ecuador, 2014. Anecacao-Ecuador. (2014). Retrieved October 16, 2015.
- Atanda, O.A. (1975). Yield characteristics of *Theobroma cacao* L. with special reference to studies in Nigeria. *Revista Theobroma (Brasil)* 5(3), 21-36.
- Calderón, D. (2004). Caracterización y Evaluación de accesiones de cacao Amazónico con énfasis en su comportamiento sanitario y productivo. Babahoyo, Ecuador. 87 p.
- Cascante-Sánchez, M., García-Cortés, V., & Marín-Arias, G. (1991). Identificación de hongos filamentosos y levaduras aislados durante la fermentación de almendras de cacao (*Theobroma cacao*) en Costa Rica. Characterization of yeasts and moulds isolated during the fermentation process of cocoa beans in Costa Rica. *Agronomía Costarricense*. 15(1-2), 177-180.
- Enríquez, G. (1981). El cultivo de cacao. Turrialba, Costa Rica, Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. 162 p.
- Evans, H.C., Edwards, D.F., & Rodríguez, M. (1977). Research on cocoa diseases in Ecuador: past and present. *PANS*, 23(1), 68-80.
- Federc, W.T., McCulloch, E.E., Milles-Mcdermont, J.N. (1987). Illustrative examples of Principal Components. *Journal of Sensory Studies*. 2: 37-57.
- Frias, G. (1987). An inoculation method to evaluate resistance to Witches broom disease of cocoa. Tesis Ph D. Florida, USA. University of Florida. 111 p.
- Hotelling, H. (1936). Relations between two of varieties, *Biometrika*, 28(3/4), 321-377.
- INAMHI, (2016). Instituto Nacional de Meteorología. Anuarios Meteorológicos 2000-2016. [Abril, 2016].
- Jacob, V.J. (1975). Compatibility and fruit setting in *Theobroma cacao* L. *Revista Theobroma (Brasil)* 5(2), 12-18.
- Krauss, U., Hidalgo, E., Bateman, R., Adonijah, V., Arroyo, C., Garcia, J., Crozier, J., Brown, N., Ten Hoop, G.M., Holmes, K.A. (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.
- Lerceteau, E., Flipo, S., Quiroz, J., Soria, J., Pétiard, V., & Cruzilat, D. (1997). Genetic differentiation among Ecuadorian *Theobroma cacao* L. accessions using DNA and morphological analyses. *Euphytica*, 95(1), 77-87.
- 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.H.V., Pomella, A.W.V., De Souza, J.T., Niella, G.R., Valler, R.P., Bateman, R., Fravel, D., Vinyard, B., Hebbbar, P.K. (2010). A novel, integrated method for management of witches' broom disease in Cacao in Bahia, Brazil. *Crop Prot.* 29(7), 704-711.
- Peña, G. (2003). Caracterización morfológica de 57 accesiones de cacao (*Theobroma cacao* L.), tipo Nacional del Banco de Germoplasma de la Estación Experimental Tropical Pichilingue. Portoviejo, Ecuador. 1-18 p.
- 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.
- Porras, V.H. y Sánchez, L.J. (1991). Enfermedades del Cacao. Fundación Hondureña de Investigación Agrícola. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. Serie: Tecnología, Comunicación y Desarrollo. Fascículo No. 5. La Lima, Cortes, Honduras. 14-16 p.
- 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.

- Sánchez-Mora, FD., Vera, JF., Ramos, RA., Kamphorst, SH. (2012). Avaliação do desempenho agrônômico e sanitário de clones de cacau (*Theobroma cacao* L.) na zona de Quevedo. Equador. Em: Anais do II Congresso Brasileiro de Recursos Genéticos. Belém do Pará. BR. Trabalho 456. (Resumen extendido).
- Surujdeo-Maharaj, S., Umaharan, P., Butler, DR., Sreenivasan, TN. (2003). An optimized screening method for identifying levels of resistance to *Crinipellis pernicioso* in cocoa (*Theobroma cacao*). Plant Pathology 52, 464–75.
- Tarqui, O. (2010). Evaluación de clones de cacao (*Theobroma cacao* L) provenientes de plántulas híbridas seleccionadas por resistencia a la enfermedad Escoba de bruja (*Moniliophthora pernicioso*). Tesis de Ingeniero Agrónomo. Universidad Técnica Estatal Quevedo, Quevedo, Ecuador. 50 p.
- Tirado-Gallego, PA., Lopera-Álvarez, A., Ríos-Osorio, LA. (2016). Estrategias de control de *Moniliophthora roreri* y *Moniliophthora pernicioso* en *Theobroma cacao* L.: revisión sistemática. Corpoica Cienc Tecnol Agropecuaria. 17(3), 417-430.