

# Influencia de insectos polinizadores y flujo de polen sobre la eficiencia reproductiva de cacao (*Theobroma cacao* L.).

Marlon Mena Montoya<sup>1</sup>; Luz García Cruzatty<sup>2</sup>; Viviana Armijos Vásquez<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Facultad de Ciencias Pecuarias – Universidad Técnica Estatal de Quevedo – marlonm.mena@uteq.edu.ec

<sup>2</sup>Facultad de Ingeniería Agronómica, Universidad Técnica de Manabí, Campus La Teodomira – cecilia Luz29@hotmail.com

<sup>3</sup>Facultad de Ciencias Pecuarias – Universidad Técnica Estatal de Quevedo – vivianaevvas.armijos@uteq.edu.ec

## Resumen

El conocimiento de la eficiencia reproductiva es de primordial importancia para el desarrollo de planes de mejoramiento genético y producción en cultivos agrícolas. El objetivo de esta investigación fue identificar la influencia de insectos polinizadores y el flujo de polen sobre la eficiencia reproductiva de *T. cacao*, Tipo Nacional y Trinitario. El estudio se realizó en la finca experimental “La Represa”, localizada en Quevedo, provincia de Los Ríos. Se procedió a marcar 15 flores por árbol, para determinar la producción de frutos iniciales después de polinización manual y natural. El flujo de polen registrado fue de 1 a 24 granos flor<sup>-1</sup>. Además, se observó que la temperatura máxima ambiental es determinante en el número de granos de polen que llegan hasta el estigma. Con el fin de conocer la receptividad estigmática, se aplicó peróxido de hidrogeno al 10% sobre los estigmas de las flores de *T. cacao*. Se calculó en un 12.18% y 47.48% la fecundación alcanzada por polinización natural y manual, respectivamente. Los mayores porcentajes de insectos lo obtuvo el orden Hymenoptera con 76.99%, cuya diversidad de insectos registró una sola familia como posible polinizadora (Cecidomyiidae). El índice de eficiencia reproductiva se calculó en un 30% y se observó que la receptividad inició en horas de la mañana para la mayoría de los clones.

**Palabras clave:** Clones, eficiencia, estigma, receptividad, polinizadores;

## Introducción

Ecuador es reconocido a nivel mundial como un importante productor de *Theobroma cacao* L., aunque los rendimientos por hectárea no han sido

muy alentadores (promedio nacional de 300 kg ha<sup>-1</sup> año<sup>-1</sup>). De las hectáreas cultivadas de cacao en el Ecuador (320000 ha), el 71% constituyen

huertas tradicionales de pequeños y medianos agricultores, quienes no realizan aplicación de insumos ni riego por lo cual los rendimientos de producción son muy bajos (300 - 500 Kg ha<sup>-1</sup> año<sup>-1</sup>) o moderados con manejo semi-tecnificado (riego y aplicación insuficiente de insumos). El restante 29% constituyen cultivos tecnificados de grandes productores que cultivan especialmente el clon CCN51 que presentan altos niveles de producción (3000 kg ha<sup>-1</sup> año<sup>-1</sup>) (Acebo, 2016).

Aunque es una de las especies tropicales más estudiadas, existe poca información científica que permita identificar los elementos causantes de la baja productividad. No obstante, la evidencia para otras especies, sugiere que podría estar relacionada con un ineficiente flujo de polen o con otros factores como el potencial genético de los materiales cultivados, resistencia o tolerancia a enfermedades, baja diversidad de insectos polinizadores y efectos bióticos y abióticos que condicionan la reproducción sexual y la fertilidad del suelo. Refiriéndose al flujo génico como el movimiento natural de genes entre organismos de la misma especie, mediante un proceso de recombinación sexual (Eastman & Sweet, 2002).

En las plantas la fecundación ocurre después de la llegada de polen desde las anteras hasta el estigma. Este proceso es primordial en la reproducción de plantas con flores, pues es necesario para asegurar la formación de frutos. La baja producción en cultivos agrícolas, se ha atribuido, en la mayoría de los países productores, a la polinización ineficiente (Gazit & Degani, 2002).

En muchas especies la ineficiente polinización ha sido atribuida a factores climáticos adversos que a su vez condicionan la presencia de polinizadores. Además en algunas especies como el *T. cacao* los problemas de polinización se han atribuido a su peculiar morfología floral. Sus flores hermafroditas presentan hercogamia de aproximación, sus estambres están recurvados hacia afuera, protegidos por pequeñas brácteas y separados de los estigmas por estaminoides, dando la impresión de que el transporte de polen lo realizan polinizadores especializados (Young., 2003).

Justamente, la polinización en *T. cacao* es realizada por microdípteros de la familia Ceratopogonidae, género *Forcipomyia*, especializadas en polinizar las flores de esta especie,

debido a sus características morfológicas (tamaño, disposición de setas en diferentes partes del cuerpo).

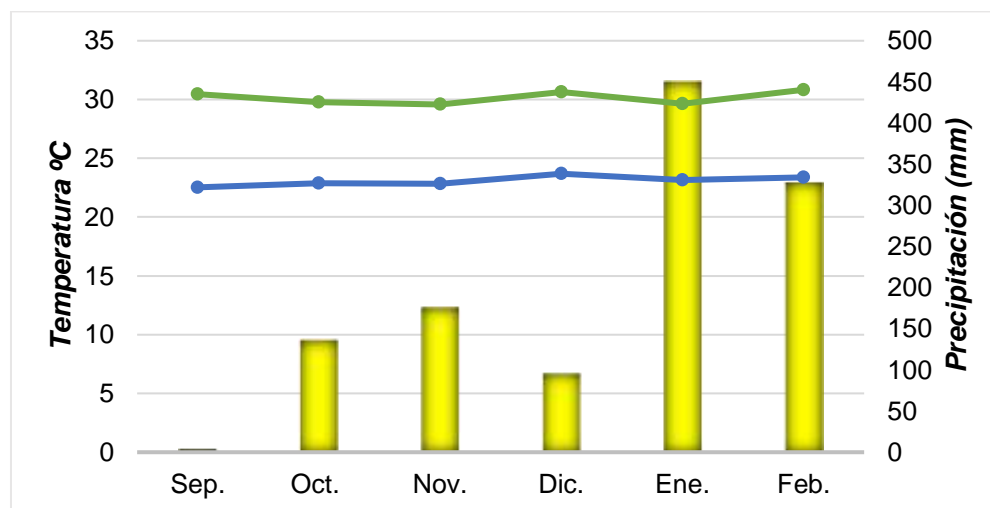
El presente estudio representa una primera aproximación en cuanto a la evaluación del flujo de polen y su

## Métodos

El estudio se realizó en la finca experimental “La Represa”, localizada en Quevedo-, provincia de Los Ríos. La finca se encuentra ubicada en una zona de topografía plana con pendientes ligeras, temperatura promedio de 24,2° C y una textura de suelo franco

relación con diversos factores. El objetivo de la investigación fue cuantificar el flujo de polen (viable y no viable) y evaluar qué factores climáticos condicionan la llegada de polen hasta los estigmas en clones de *T. cacao*.

arcillosa. Esta área se caracteriza por tener un clima tropical. Durante la temporada que se realizó el estudio, la temperatura osciló entre 22 y 30° C, precipitaciones mensuales de 0 y 450 mm (Figura 1) y la humedad relativa entre 80 y 87% (INIAP., 2015).



**Figura 1.** Condiciones climáticas durante el periodo de estudio en la finca experimental “La Represa” de precipitación (barras), temperatura mínima y máxima (líneas con marcadores)

El estudio en 7 clones de *T. cacao* forman parte de un ensayo de 152 clones, seleccionados por sus características sobresalientes de producción entre 6000 árboles

provenientes de semillas, establecidos en la finca experimental “La Buseta” (Sánchez, *et al.* 2014) descendientes de la colección CCAT (Centro de cacao fino y de aroma Tenguel), en la

provincia del Guayas, con características sobresalientes de producción. Los clones que se estudiaron en el proyecto fueron obtenidos por injerto de yema, cuyas labores culturales corresponden a una adecuada fertilización de suelo y foliar incorporando los principales nutrientes, bajo riego manual en época de escases de lluvia. Las flores evaluadas se colectaron de siete clones de *T. cacao*, cinco de Tipo Nacional: DICYT-C107, DICYT-C119, DICYT-C217, DICYT-C114 y DICYT-C186, y dos Tipo Trinitario: CCN-51 y LR-35.

Las flores colectadas fueron analizadas bajo lupa, se cortaron los estigmas y se tiñeron con fucsina y azul de metileno (modificación de la tinción de Alexander) para lograr contraste de colores y facilitar el conteo de los granos de polen.

El conteo de los granos de polen se realizó bajo microscopio óptico. El número total de granos de polen se determinó mediante un conteo total de granos depositados sobre los estigmas (Stain, 2009). Se consideró como granos de polen viables los que se tornaron de color rojo y como no viable los constreñidos y sin teñir (Osborn, 2008). Los resultados se expresaron en porcentaje.

El Índice de eficiencia reproductiva (IER) se determinó, calculando el cociente entre la producción natural de frutos iniciales y la producción de frutos después de polinización cruzada (manual) (fórmula 1).

$$IER = \frac{\text{Producción natural de frutos iniciales}}{\text{Polinización manual}} [1]$$

La evaluación de receptividad estigmática consistió en colocar una gota de peróxido de hidrógeno (10%) sobre los estigmas, observando inmediatamente la formación de burbujas o su ausencia (Galen *et al* 2007). El análisis en campo, que se realizó con ayuda de una lupa de bolsillo (30x), concordaba con los datos de laboratorio bajo un estereomicroscopio adaptado a una computadora para la observación y captura de fotografías (Figura 2).



Figura 2. Burbujeo en estigmas receptivos después de la colocación de Peróxido de hidrógeno (A y B en laboratorio, C y D en campo)

Para conocer la diversidad de insectos, se colocaron cajas plásticas (con aberturas en la tapa, cubiertas con tela negra de agujero fino que impedía la entrada de luz y permitía el paso de humedad y aire), éstos llevaron un tubo

**Análisis estadístico.-** Los datos fueron ordenados de manera factorial y distribuidos en un diseño completamente al azar con cuatro repeticiones, considerando como factores los diferentes meses y clones. Los datos referentes al flujo de polen fueron analizados bajo el programa estadístico SAS (Statistical Analysis

### Resultados y discusión

Hubo diferencias estadísticas en el flujo promedio de polen, entre los clones analizados. El clon que obtuvo el mayor promedio fue el LR35 con 20,89 granos de polen. No obstante, el clon que obtuvo el menor promedio fue el 119 con 9,96 granos de polen.

Esto indica que las variables granos de polen viable y no viable fueron significativamente diferentes con promedios que oscilaron entre 7,89 y 16,87 granos de polen viable para los

plástico al cual se le adiciono sustratos provenientes de hojarasca y musáceas en descomposición para la atracción y captura de los insectos (Young, 2003).

System), con la aplicación de la prueba de Tukey con un nivel de probabilidad de error de 0,05.

La correlación del flujo de polen con las variables climáticas se analizó bajo un modelo de regresión y un gráfico de dispersión de puntos, utilizando el programa Statistic 7.0

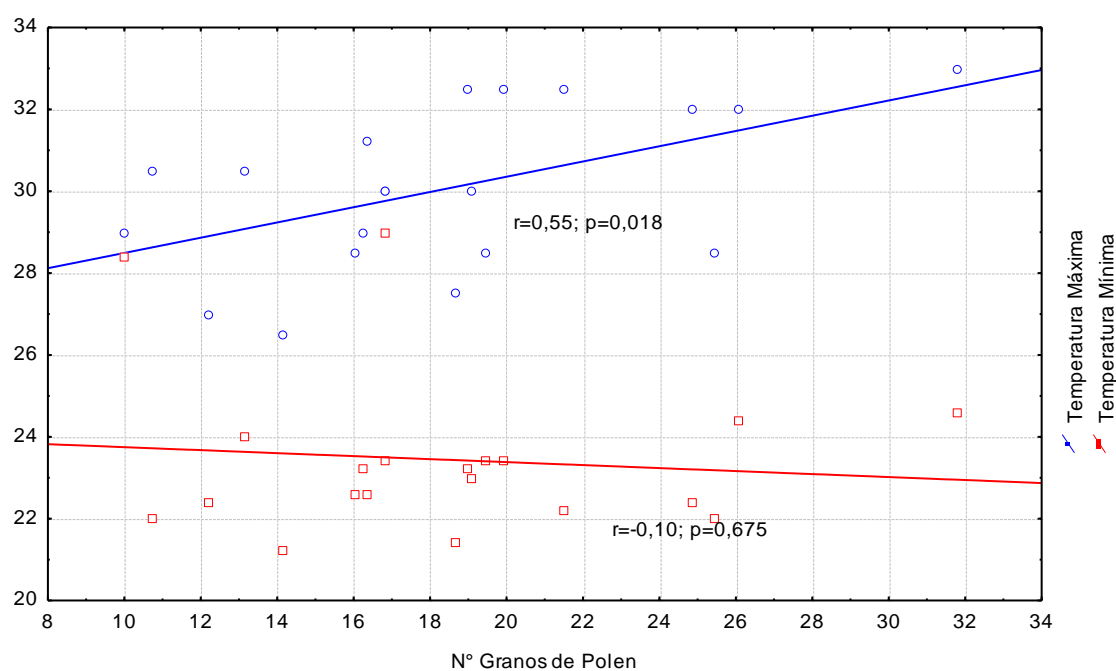
clones 119 y CCN51 y promedios comprendidos entre 1,96 y 3,29 granos de polen no viable para los clones 114 y 107 respectivamente.

De la misma forma el mes que presentó las mejores características en cuanto a la llegada natural de polen fue el mes de febrero con 24,90 granos de polen (promedio obtenido de datos semanales). El mes que presentó el menor valor fue diciembre con 9,06 granos de polen (Tabla 1)

**Tabla 1.** Promedios y cuadrados medios del flujo de polen en siete clones de *Theobroma cacao* durante seis meses, en la finca experimental “La Represa”.

	TGP	GV	GNV
<b>Clones</b>			
CCN51	19,40 <sup>ab</sup>	16,87 <sup>ab</sup>	2,53 <sup>ac</sup>
LR-35	20,89 <sup>a</sup>	18,25 <sup>a</sup>	2,64 <sup>b</sup>
107	12,27 <sup>cd</sup>	8,98 <sup>c</sup>	3,29 <sup>abd</sup>
114	13,88 <sup>c</sup>	11,92 <sup>e</sup>	1,96 <sup>ac</sup>
119	9,96 <sup>d</sup>	7,89 <sup>c</sup>	2,06 <sup>cd</sup>
186	16,39 <sup>ce</sup>	13,18 <sup>de</sup>	3,21 <sup>abcd</sup>
217	17,80 <sup>be</sup>	15,10 <sup>bd</sup>	2,70 <sup>d</sup>
<b>Meses</b>			
Septiembre	17,56 <sup>a</sup>	14,87 <sup>a</sup>	2,70 <sup>a</sup>
Octubre	10,60 <sup>b</sup>	9,50 <sup>b</sup>	1,10 <sup>b</sup>
Noviembre	14,80 <sup>c</sup>	12,64 <sup>a</sup>	2,16 <sup>a</sup>
Diciembre	9,06 <sup>bc</sup>	7,44 <sup>b</sup>	1,63 <sup>b</sup>
Enero	17,86 <sup>a</sup>	13,60 <sup>a</sup>	4,26 <sup>c</sup>
Febrero	24,90 <sup>d</sup>	20,99 <sup>c</sup>	0,83 <sup>b</sup>
<b>GL</b>			
Clon	6	67345	11224
Mes	5	137339	27468
Clon x mes	30	116501	3883
Error experimental	4998	1673463	335
Total	5039		
Probabilidad <sub>(clon)</sub>		<.000	<.000
Probabilidad <sub>(mes)</sub>		<.000	<.000
Probabilidad <sub>(clon x año)</sub>		<.000	<.000

\*Medias estadísticas diferentes. Según Tukey ( $p \leq 0,05$ ). \* GL: Grados de libertad. \* TGP: Total granos de polen. \*GV: Granos viables. \*GNV: Granos no viables.



**Figura 3.** Correlación lineal entre la temperatura máxima y mínima y el flujo de polen en clones de *Theobroma cacao* en la finca experimental “La Represa”

La temperatura máxima presentó una moderada correlación con la cantidad de granos de polen por flor ( $r=0,55$ ;  $p=0,018$ ). Sin embargo, la temperatura mínima no determinó la cantidad de granos de polen por flor observados sobre los estigmas, ya que no se observó una relación entre estas dos variables ( $r=0,10$ ;  $p=0,675$ ) (Figura 3).

**Índice de eficiencia reproductiva.-**

En todos los individuos estudiados, la fertilidad en polinización natural es baja, el índice de eficiencia reproductiva (IER), se encuentra en un rango de 0.16 a 0.40. El clon DICYT-107 presentó el mayor IER, calculado en 0.40 por cuanto la fecundación después de la

polinización natural fue de un 18% mientras que mediante polinización manual se observó que un 44% de las flores polinizadas formaron fruto. En la polinización manual, el mejor clon fue el DICYT-186, seguido del clon LR35 con índices de 0.67 y 0.57 respectivamente.

**Receptividad estigmática.-** hubo variación en todos los individuos analizados, por lo que la receptividad estigmática inicio a las 11h00 (5 horas después de la apertura floral). No

obstante, a partir de las 15h00 (9 horas después de la apertura floral) se redujo el periodo de receptividad en todos los clones evaluados.

**Diversidad de insectos**

**Tabla 2.** Visitantes florales de *T. cacao* en la finca experimental La Represa

Comportamiento de los visitantes	Orden	Nº de Insectos	Nº de flores visitadas por insectos
Visitantes	<i>Coleoptera,</i>	8	1-2
	<i>Hymenoptera</i>	6	1-3
	<i>Díptera</i>	1	1-2
	<i>Hemíptera</i>		1-2
	<i>Homóptera</i>		Casi todas
Polinizadores	<i>Díptera</i>	6	1-2

Se identificó la familia del orden Díptera, la cual indicó ser una mosquita de la familia *Cecidomyiidae*. Se encontró que, por lo general, las mosquitas visitan las flores de *T. cacao* entre las 9h00 y 11h00 y solo se posaban en flores que no estuvieran con presencia de otros insectos. Los insectos que visitaban las flores del *T. cacao* con mayor frecuencia eran las Hymenopteras y Dípteras.

## Discusión

El escaso flujo de polen registrado en los clones evaluados sería una de las principales limitantes en la producción. No existen reportes de estudios referentes al flujo de polen para la especie *Theobroma cacao*, pero numerosos estudios en otras especies han demostrado que la insuficiente recepción de polen limita la producción de semillas en las poblaciones (Larson, *et al.* 2005).

Souza y Venturieri (2010) determinaron que para la especie emparentada *Theobroma speciosum*, un 60% de granos de polen encontrados sobre estigmas receptivos son viables. Dichos resultados son similares a los registrados en el presente estudio donde esta variable osciló entre 73 y 87%. Estos datos revelarían que la calidad de polen no sería una limitante para la producción de los árboles evaluados; si bien la cantidad de polen es importante, no es menos la calidad. La cantidad y calidad de polen transferido de anteras a estigmas varía sustancialmente entre plantas, con consecuencias para la fertilidad, sistema de apareamiento y vigor híbrido (Aizen y Harder, 2007)

Los datos climáticos analizados permitieron conocer que hay una moderada correlación positiva entre la temperatura máxima y la llegada natural de polen; sin embargo la humedad relativa, y la precipitación registraron una baja correlación con la cantidad de granos de polen/flor. En los meses de enero y febrero (etapa lluviosa) la temperatura promedio es más alta, lo que justificaría el mayor número de polen encontrado en los estigmas; además según observaciones de los autores, justamente en esos meses hay mayor cantidad de flores, pues según Meyer, *et al.* (2009) altas densidades florales atraen a los polinizadores que visitan más flores por plantas, aumentando la deposición de flores en distancia cortas.

Según De La Cruz y Soria (2003), factores de tipo ambiental como el clima, humedad, incidencia de luz, influyen sobre la polinización; sobre todo la precipitación que estimula la reproducción de insectos polinizadores y por ende el transporte de polen. Sin embargo; habría que considerar que las precipitaciones inciden en la caída del polen y por ende de las flores. Por lo que para especies vegetales polinizadas por insectos el éxito



reproductivo y el intercambio genético por medio de la transferencia de polen depende de la eficiencia, abundancia y comportamiento de los visitantes florales (Meyer et al., 2009).

El análisis de correlación demostró que el flujo de polen está influenciado en gran parte por la humedad relativa y las precipitaciones, lo que justificaría la

## Conclusiones

La producción de frutos en las huertas cacaoteras está sujeta al flujo de polen, siendo bajo el porcentaje calculado. Solamente un bajo porcentaje de las flores producidas le llega polen suficiente para formar un fruto.

El flujo de polen por flor de *T. cacao* es insuficiente lo que se refleja en el bajo porcentaje de frutos fecundados, resultado negativo que se ve favorecido predominantemente por temperaturas entre 21 a 24 °C, pues la temperatura mínima no determina la cantidad de granos de polen sobre los estigmas, pero sí la temperatura máxima.

La calidad de polen no es una limitante para la producción de clones de *T. cacao*, pues se encontró una alta viabilidad en los granos de polen sobre los estigmas.

mayor presencia de polen en la época lluviosa, tal y como lo menciona (Treu y Emberlin, 2000; Aylor, et al. 2003), en la observación de variables climáticas (precipitación y temperatura) que influyeron directamente en el desprendimiento de los granos de polen de las anteras.

El índice de eficiencia reproductiva indicó que la producción de mazorcas en las huertas cacaotales podría mejorarse en un 34% realizando suplementación polínica.

El periodo de receptividad estigmática en *T. cacao* coincide entre las 11h00 y 14h00, para la mayoría de los clones evaluados, conocimiento fundamental para optimizar las polinizaciones controladas en programas de mejoramiento genético.

La observación directa en las flores de *T. cacao* permitió identificar los visitantes florales, siendo las dípteras de la familia *Cecidomyiidae*, los insectos de mayor presencia en esta especie.

## Bibliografía

- Acebo, M. (2016). *Estudios industriales orientación estratégica para la toma de decisiones. Industria de Cacao. Escuela Politécnica del Litoral.*
- Aizen, M y Harder, L. (2007). Expanding the limits of the pollen limitation concept: effects of pollen quantity and quality. *Ecology*, 88, 271–281.
- Aylor, D. (2003). An aerobiological framework for assessing cross-pollination in maize. . *Agricultural and Forest Meteorology*, 199, 111-129.
- De La Cruz, J. y Soria, S. (2003). *Estudio de fluctuaciones de polinización del cacao por las mosquitas Forcipomyia spp. (Diptera, Ceratopogonidae), en Palmira. Acta Agronómica (Colombia) , pp. 1-17.* Valle, Colombia.
- De Souza, M., y Venturieri, G. (2010). Biología floral de (*Theobroma speciosum* - Malvaceae). 53(4). *Scielo.*
- Eastman, K., & Sweet, J. (2002). *Genetically modified organisms (GMOs): the significance of recent/current, European Environment Agency. Report N° 28.*
- Gazit, S., & Degani, C. (2002). *Reproductive Biology: In: Wiley T., Schafer B, Wolstenholme BN (eds). The Avocado: Botany, Production and Uses. CABI Publishing, Wallingford Oxen, UK pp. 101-133.*
- INIAP (Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias). (2015). *Departamento Agrometeorológico del INIAP Estacion Experimental Tropical Pichilingue Mocache.* Quevedo.
- Osborn, M. (2008). Pollination biology of *Opuntia polyacantha* and *Opuntia phaeacantha* (Cactaceae) in souther Colorado. *Plant System*, 159, 139-144.
- Sánchez, F., Zambrano, J., Vera, J., Ramos, R., Gárces, F., Vásconez, G., (2014). *Productividad de clones de cacao tipo Nacional en una zona del bosque húmedo Tropical de la provincia de Los Ríos.* Ecuador.

- Somarriba, E. (2010)). Sexual reproduction of cacao. *Tropical Agricultural Research and Higher Education Center (CATIE) Turrialba. Costa Rica.*
- Stain, T. (2009). Staining and observing pollen tubes in the style by means of fluorescence. *Stain Tech. Scielo.*, 34(3), 125-128.
- Treu, R. y Emberlin, J. (2000). *Pollen dispersal in the crops maize (Zea mays), oil seed rape (Brassica napusspp. oleifera), potatoes (Solanum tuberosum), sugar beet (Beta vulgaris spp. vulgaris) and wheat (Triticum aestivum). A report commissioned by the Soil Association. University College Worcester, UK.*
- Young., A. (2003). Seasonal differences in abundance and distribution of cocoa-pollinating midges in relation to flowering and fruit set between shaded and sunny habitats of the La Lola coca farm in Costa Rica. *Journal of Applied Ecology*, 20, 81-82.