



UNIVERSIDAD REGIONAL AMAZÓNICA IKIAM

Facultad de Ciencias de la Vida

Ingeniería en Ecosistemas

**Biología reproductiva del cacao blanco (*Theobroma bicolor*
Humb. & Bonpl.) en Napo Ecuador**

Juan Francisco Ponce Sánchez

Directora:

PhD. María Cristina Peñuela Mora

Co directora

PhD María Gabriela Zurita Benavides

26 de febrero de 2020, ciudad de Tena, Napo, Ecuador

Derechos de autor

Declaración de derecho de autor, autenticidad y responsabilidad

Tena, 26 de febrero de 2020

Yo, Juan Francisco Ponce Sánchez con documento de identidad N°1600476913, declaro que los resultados obtenidos en la investigación que presento en este documento final, previo a la obtención del título Biología reproductiva del cacao blanco (*Theobroma bicolor* Humb. & Bonpl.) en Napo Ecuador son absolutamente inéditos, originales, auténticos y personales.

En virtud de lo cual, el contenido, criterios, opiniones, resultados, análisis, interpretaciones, conclusiones, recomendaciones y todos los demás aspectos vertidos en la presente investigación son de mi autoría y de mi absoluta responsabilidad.

Por la favorable atención a la presente, suscribo de usted,

Atentamente,

Firma:

Juan Francisco Ponce Sánchez

Certificado del director

Certifico que el trabajo de integración curricular titulado: “Biología reproductiva del cacao blanco (*Theobroma bicolor* Humb. & Bonpl.) en Napo Ecuador” en la modalidad de: proyecto de investigación en formato tesis, fue realizado por: Juan Francisco Ponce Sánchez, bajo nuestra dirección.

El mismo ha sido revisado en su totalidad y analizado por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto, cumple con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad Regional Amazónica Ikiam, para su entrega y defensa.

Tena, 26 de febrero de 2020

Firma:

.....

María Cristina Peñuela Mora

C.I: 1756861496

Firma:

.....

María Gabriela Zurita Benavides

C.I: 1712165008

Aprobación del tribunal

Agradecimientos

Gracias a mi papá John Ponce por confiar en mí, enseñarme a ser enfocado en mis objetivos y brindarme todas las comodidades para estudiar. A mi mamá Adriana Sánchez quien me apoyó y me motivó a seguir estudiando en los momentos más pesados. A mi tutora María Cristina Peñuela y co tutora María Gabriela Zurita quienes me enseñaron lo importante que son las especies alimenticias de la Amazonía, por inspirarme a realizar la investigación, guiarme para estudiar el *T. bicolor* y darme su tiempo para corregir esta tesis.

Un especial agradecimiento a la familia Vargas Grefa dueños de la finca del Cerro Chiuta y habitantes de San Vicente por permitirme estudiar sus árboles durante todo el estudio. A la GIZ por apoyarnos con algunos equipos para la toma de datos. También les doy las gracias a mis amigos de carrera que me ayudaron y me brindaron alegrías a lo largo de todos los semestres.

ÍNDICE GENERAL

Capítulo I: Planteamiento del problema de investigación	1
Antecedentes.....	1
Planteamiento del problema	6
Justificación de la investigación	8
Objetivos de la investigación.....	9
Capítulo II: Marco metodológico.....	10
Área de estudio.....	10
Biología Floral.....	10
Morfología de la flor.....	10
Proporción de polen y óvulos.	12
Etapas florales y receptividad del estigma	13
Fenología reproductiva	14
Análisis de datos.....	15
Capítulo III: Presentación de datos y resultados	17
Biología floral	17
Morfología floral	17
Proporción de polen y óvulos.....	17
Etapas florales.....	18
Receptividad del estigma.....	19
Fenología reproductiva	20
Restricciones de la reproducción	24
Capítulo IV: Interpretación y discusión	26
Biología floral	26
Morfología floral	26
Proporción de polen y óvulos.....	27
Etapas florales y Receptividad de estigma	27
Fenología de la reproducción.....	28
Restricciones de la reproducción	29
Capítulo V: Conclusiones y recomendaciones.....	31

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición nutricional de semillas (secas) de <i>Theobroma bicolor</i> comparadas con nueces secas comercializadas.	2
Tabla 2. Composición mineral de semillas (secas) de <i>Theobroma bicolor</i> comparadas con nueces secas comercializadas.	3
Tabla 3. Datos de las mediciones de las partes de la flor de <i>Theobroma bicolor</i>	17
Tabla 4. Comparación entre flores de <i>Theobroma bicolor</i> , medidas en Napo (este estudio) y en otros estudios	26

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mapa de sitios de muestreo y ubicación de los árboles de <i>Theobroma bicolor</i> estudiados.	11
Figura 2. Partes de la flor de <i>Theobroma bicolor</i> con sus respectivas mediciones.	12
Figura 3. Etapas florales de <i>Theobroma bicolor</i>	18
Figura 4. Porcentaje de flores de <i>Theobroma bicolor</i> , en cada etapa floral a lo largo de tres días.	19
Figura 5. Intensidad de burbujeo en el estigma de flores de <i>Theobroma bicolor</i> a diferentes horas del día.....	20
Figura 6. Correlaciones entre las variables climáticas de Worldclim 2.0. con floración y fructificación de <i>Theobroma bicolor</i>	21
Figura 7. Correlaciones entre las variables climáticas de la estación meteorológica Ikiam con floración y fructificación de <i>Theobroma bicolor</i>	22
Figura 8. Fenología floral de <i>Theobroma bicolor</i> de junio de 2019 a febrero de 2020.....	23
Figura 9. Fenología frutal de <i>Theobroma bicolor</i> de junio de 2019 a febrero de 2020.	23
Figura 10. Efecto de la infestación de árboles de <i>Theobroma bicolor</i> por lumbitzi (<i>O. cf. alveolatus</i>).	24
Figura 11. Porcentaje de árboles de <i>Theobroma bicolor</i> , infectados con <i>Moniliophthora roreri</i>	25

Resumen

El cacao blanco (*Theobroma bicolor*) posee una amplia distribución en el neotrópico, con una variedad de nombres y usos. Su semilla presenta valores nutricionales para su aprovechamiento y comercialización internacional. Con el objetivo de contribuir al conocimiento de la biología reproductiva de *T. bicolor* en Ecuador se estudiaron aspectos sobre la biología floral, la fenología reproductiva y las restricciones bióticas sobre la reproducción de la especie. El estudio fue realizado en la provincia de Napo, cantón Tena. A partir de la observación de 80 flores se describió la morfología de la flor; de la observación de 35 botones florales la proporción entre óvulos y polen; mediante el monitoreo en campo de 260 flores, se determinaron las etapas florales y la receptividad del estigma utilizando para esto peróxido de hidrógeno. Para conocer la fenología reproductiva (floración y fructificación) se monitorearon mensualmente 55 árboles durante los meses de julio de 2019 a febrero de 2020. Se determinaron las correlaciones entre la floración y fructificación con la temperatura, precipitación, radiación solar y humedad relativa. Finalmente, para conocer las restricciones bióticas sobre la especie se describió el efecto de la maleza (*Oryctanthus cf. alveolatus*) y el hongo (*Moniliophthora roreri*) sobre la producción de frutos. Se encontraron diferencias en algunas variables de la morfología de la flor comparados con reportes de otros países. Se encontró en promedio 6819 ± 1177 granos de polen y 44 ± 5 óvulos por flor, teniendo una proporción de polen/óvulos igual a 158 ± 33 , por lo que se sugiere que las plantas son autógamas facultativas. Las flores en botón a las 18:00 de un día estarán en máxima receptividad del estigma entre 6:00-10:00 del día siguiente y totalmente abiertas a las 14:00. Las flores duran hasta tres días en el árbol, que es menos tiempo del que se ha reportado en otros lugares. La floración de *T. bicolor* presentó una correlación alta y positiva ($r > 0.7$) con los meses con mayor temperatura y radiación solar. Se registró 310 frutos inmaduros de 46 árboles, con un promedio por árbol de 7 ± 5 frutos y maduraron solamente 130 frutos de 29 árboles. Se encontró una menor producción de flores ($W=64$, $p=0.042$) y de frutos ($W=74.5$, $p=0.003$) en las plantas infestadas por la maleza *O. cf. alveolatus*. Se registró una pérdida del 29% de frutos por la enfermedad producida por el hongo *M. roreri*. Los resultados de este estudio sirven de base para la realización de experimentos de polinización, de hibridación, sirve para recomendar periodos de cosecha y establece la necesidad de generar estrategias para eliminar las dos restricciones a la producción de frutos encontrada.

Abstract

White cocoa (*Theobroma bicolor*) is widely distributed in the Neotropics, with a variety of names and uses. Their seeds present nutritional values for its use and international commercialization. In order to contribute to the knowledge of the reproductive biology of *T. bicolor* in Ecuador, aspects of the floral biology, reproductive phenology and biotic restrictions to the reproduction of the species were studied. The study was carried out in the province of Napo, canton Tena. From the observation of 80 flowers, the morphology of the flower was described; from the observation of 35 flower buds, the proportion between ovules and pollen; through the field monitoring of 260 flowers, the floral stages and the receptivity of the stigma were determined using hydrogen peroxide. To know the reproductive phenology (flowering and fruiting) 55 trees were monitored monthly during the months of July 2019 to February 2020. Correlations between flowering and fruiting were determined with temperature, precipitation, solar radiation and relative humidity. Finally, to know the biotic restrictions on the species, the effect of the weed (*Oryctanthus cf. alveolatus*) and the fungus (*Moniliophthora roreri*) on fruit production was described. Differences were found in some variables of the flower morphology compared to reports from other countries. An average of 6819 ± 1177 pollen grains and 44 ± 5 ovules per flower was found, having a pollen/ovule ratio equal to 158 ± 33 , so it is suggested that the plants are facultative autogamous. The flowers in bud at 18:00 will have maximum receptivity of the stigma between 6:00-10:00 of the next day, and will be totally open at 14:00. The flowers last up to three days on the tree, which is less time than has been reported elsewhere. The flowering of *T. bicolor* showed a high and positive correlation ($r > 0.7$) with the months with higher temperature and solar radiation. A total of 310 immature fruits were recorded of 46 trees, with an average per tree of 7 ± 5 fruits, and only 130 fruits from 29 trees matured. A lower production of flowers ($W=64$, $p=0.042$) and fruits ($W=74.5$, $p=0.003$) was found in the plants infested by the weed *O. cf. alveolatus*. A loss of 29% of fruit was registered caused by the fungus *M. roreri*. The results of this study serve as a basis for the realization of pollination experiments, of hybridization, serves to recommend harvesting periods and establishes the need to generate strategies to eliminate the two restrictions to fruit production found.

Capítulo I: Planteamiento del problema de investigación

Antecedentes

La familia Malvaceae tiene 180 géneros y 4465 especies aceptadas [1] la mayoría de las cuales crece en el trópico y subtropical. En Ecuador está representada en 33 géneros y 113 especies [2]. Entre los géneros más importantes por su uso en la industria alimenticia e incluso cosmética está el género *Theobroma*.

El nombre del género *Theobroma* fue asignado por Linnaeus en 1737, en griego significa el alimento de los dioses (Theo=dios y broma=alimento) [3]. El género comprende 22 especies ubicadas en los bosques húmedos del Neotrópico [3]. Su diversificación coincide con el levantamiento de la cordillera de los Andes, hace 13 Ma [4]. Nueve especies se encuentran en la parte occidental de la cordillera de los Andes, 11 en la parte oriental y dos en ambos sitios [5]. El género se caracteriza por comprender árboles de troncos con ramas dismórficas, hojas alternas y enteras, flores pentámeras y bisexuales, ovario súpero, fruto drupáceo, semillas envueltas en pulpa [3].

La pulpa y la semilla de los árboles de algunas especies del género *Theobroma* se consumen en comunidades a nivel local y en muchas se comercializan para la elaboración de productos derivados [3]. La especie con mayor uso y comercio es *Theobroma cacao* L. Los mayores exportadores de cacao en grano se encuentran en África y América del sur, mientras que los principales importadores son Europa y Estados Unidos, que elaboran productos de confitería o cosméticos [6]. *Theobroma angustifolium* Sessé & Moc. ex DC., que se produce exclusivamente en Centroamérica, es consumida en Guatemala en pulpa fresca y en una bebida llamada “panecito” elaborado a partir de las semillas [7]. *Theobroma grandiflorum* (Willd. ex Spreng.) K. Schum. conocida como copoazú es importante comercialmente en la Amazonía brasileña y colombiana. Utilizada para la fabricación de varios productos como chocoazú parecido al chocolate, caramelos, bebidas y helados [8]. Otra especie amazónica es *Theobroma speciosum* Willd. ex Spreng., cuya pulpa se consume y con las semillas se produce un cacao de menor calidad [3]. Similar a la anterior esta *Theobroma subincanum* Mart., cuyo fruto es consumido por varias comunidades en la Amazonía, así como por muchos otros mamíferos [9]. Las semillas de esta especie se han utilizado para la fabricación de manteca de cacao [10].

Por último, la especie de interés en este estudio es *Theobroma bicolor* Humb. & Bonpl., una especie de amplia distribución, desde el sur de México hasta la Amazonía peruana y brasileña [5], con reportes de árboles en Ghana [5] y Nigeria [11]. La especie es conocida con varios nombres y tiene diversos usos. En México, es renombrado *patashte* y es utilizada en bebidas tradicionales [12,13]. En Guatemala, se conoce como *balamte* (árbol jaguar), *pataxte*, cacao blanco, cacao malacayo, cacao salvaje o solamente cacao [12]. Allí las semillas son adicionadas a mezclas de “pinole” (harina de maíz con varias especias como vainilla, canela, azúcar y semillas de cacao (*T. cacao*)) [14], la pulpa ha sido utilizada para bebidas y su cáscara para la elaboración de artesanías [12]. En Colombia, se conoce como macambo o maraco [15] donde se consume la pulpa del fruto para jugos, la semilla tostada como pasaboca y el análogo al chocolate el bacalate [16]. En Perú, se conoce como macambo, donde se utiliza la pulpa para la fabricación de mermeladas, las semillas se tuestan para servir como pasabocas [17]. En Ecuador, el nombre común es cacao blanco y las comunidades kichwa de la Amazonia la denominan, al árbol *patas* y a las semillas *patas muyo* [18]. Los kichwa consumen la pulpa del fruto y las semillas tostadas, estas últimas también son comercializadas frescas en mercados locales o asadas en pincho en sitios turísticos.

Tabla 1. Composición nutricional de semillas (secas) de *Theobroma bicolor* comparadas con nueces secas comercializadas.

	Cacao blanco (<i>Theobroma bicolor</i>) [19]	Almendra (<i>Prunus dulcis</i>)[20]	Anacardo (<i>Anacardium occidentale</i>)[20]	Nuez (<i>Juglans Regia</i>)[20]	Requerimien to diario [21]
Humedad	2.5	2.41	1.7	4.07	
Proteína	23.22	20.96	15.31	15.23	50
Grasas	34.75	52.54	46.35	65.21	78
Carbohidratos	17.97	21.01	32.69	13.71	275
Fibra	17.99	10.9	3	6.7	28

Nota: Los datos están expresados en g/100g.

Las semillas de *T. bicolor* poseen un valor nutricional similar a los frutos secos que se comercializan en el mercado internacional [22]. Los nutrientes de la semilla tienen un alto valor de proteína, grasas, cobre, magnesio, manganeso, potasio y zinc, parecido a los frutos

secos comunes (Tablas 1 y 2). Cabe resaltar que en los últimos cinco años el consumo de frutos secos ha aumentado a nivel internacional [23]. Por lo que esta especie puede ser una alternativa económica para los habitantes del oriente del país. Sin embargo, se requiere profundizar en el conocimiento biológico y ecológico de la especie que permita una producción manejada sosteniblemente.

Tabla 2. Composición mineral de semillas (secas) de *Theobroma bicolor* comparadas con nueces secas comercializadas.

	Cacao blanco (<i>Theobroma bicolor</i>) [22]	Almendra (<i>Prunus dulcis</i>) [20]	Anacardo (<i>Anacardium occidentale</i>) [20]	Nuez (<i>Juglans Regia</i>) [20]	Requerimientos diarios [21]
Calcio	57.62	268	45	98	1300
Cobre	2.94	1.10	2.22	1.59	0.9
Hierro	4.54	3.73	6	2.91	18
Magnesio	246.08	279	260	158	420
Manganeso	2.37	-	-	-	2.3
Potasio	6642.95	713	565	441	4700
Sodio	119.91	3	16	2	2300
Zinc	7.60	3.31	5.6	3.09	11

Nota: Los datos están expresados en mg/100g.

Por los datos presentados acerca del valor cultural y nutricional de *T. bicolor* y con el objetivo de establecer un adecuado manejo y conservación de la especie es necesario entender los procesos que pueden afectar la producción de frutos y semillas [24]. Varios de estos se estudian bajo la biología reproductiva como: la biología floral, edad de floración, número de flores y frutos, la fenología reproductiva, la fertilización, la descendencia [25], dispersión de semillas, capacidad de germinación, y las restricciones de la reproducción [24].

Biología floral

La biología floral estudia la vida de la flor, incluida la morfología, la maduración de los órganos reproductivos, como el estambre o el estigma cuya duración culmina cuando todo el polen ha sido emitido o cuando el estigma deja de ser receptivo [26]. La morfología floral

se refiere a varios parámetros, como el número, tamaño y forma de pétalos, número de sépalos, número de estambres, número y arreglo de estilos y ovarios [27]. En la biología floral se investiga las diferentes etapas florales, es decir la dinámica de la flor a lo largo del día [28,29]. Específicamente, en el género *Theobroma* las etapas florales se clasifican según la disposición de apertura que tienen los sépalos, pétalos y estaminodios a lo largo del día [30–32]. La biología floral también estudia el sistema de crianza (“breeding system”), que indica si la flor necesita polinización cruzada (xenogamia) o autopolinización (cleistogamia o autogamia). El sistema de crianza se correlaciona con la proporción entre el número de granos de polen y el número de óvulos de la flor [33]. Dependiendo de esta proporción, la planta se clasifica como cleistogama (proporción = 4.7 ± 0.7), autógena obligada (27.7 ± 3.1), autógena facultativa (168.5 ± 22.1), xenogama facultativa (796.6 ± 87.7) o xenogama (5859.2 ± 936.5) [33]. Dicha proporción puede ser relevante, ya que se ha observado que individuos autógenos de *T. cacao* son más productivos [34] que aquellos que requieren polinización cruzada, lo cual podría ocurrir en individuos de otras especies relacionadas. Otro aspecto es el estudio de la receptividad del estigma que determina la capacidad de éste para permitir que el polen compatible fertilice y el embrión crezca [35]. Básicamente estudia las horas y la duración en que el estigma es receptivo. Estos datos permiten concentrar las horas de observación de polinizadores e identificarlos, así como generar estrategias para la polinización artificial.

Fenología reproductiva

La fenología reproductiva estudia el periodo o la estación de aparición de las flores, así como el tiempo que toma la formación y maduración del fruto, además la relación entre la intensidad de la floración y la fructificación con los factores climáticos [11,36]. Esta información es relevante para tomar decisiones de manejo y fitomejoramiento, dado que al identificar los meses en los que existe mayor intensidad de floración y fructificación se puede decidir los periodos para aplicar fertilizantes, controlar malezas, plagas o enfermedades, organizar la cosecha o cosechas [37]. Permite, igualmente, definir las fechas adecuadas para la hibridación de especies [32] y para el mejoramiento de hábitat de polinizadores [38]. Por otro lado, el modelamiento de la fenología con variables climáticas puede generar predicciones sobre fechas de floración y fructificación, así como el

comportamiento de la especie en un lugar, ante diferentes escenarios relacionados al cambio climático [11].

Restricciones de la reproducción

Las restricciones de la reproducción pueden ser bióticas y abióticas. Las restricciones bióticas de la reproducción son identificadas como malezas (plantas), plagas (animales), enfermedades (hongos y bacterias) e interacciones biológicas que reducen la producción de las partes de interés de la planta, sea hojas, flores, frutos [39].

En el caso de especies del género *Theobroma*, se ven afectadas por las restricciones bióticas [40]. Por ejemplo, hongos como *Moniliophthora* perniciosa (Stahel) Aime, *Moniliophthora roreri* H.C. Evans *et al.*, *Phytophthora megakarya* (Ppal) que afectan el desarrollo frutal, pues destruyen los tejidos internos y externos del fruto [41,42], disminuyendo la productividad de frutos de *T. cacao* [34]. Las plantaciones de Latinoamérica se ven afectadas principalmente por *M. roreri*, mientras que *P. megakarya* afecta a cultivos de África [43].

Otra restricción biótica que afecta a la reproducción son las malezas. Las malezas son plantas que compiten con un cultivo por agua, luz, nutrientes y pueden ser hierbas, arbustos, hemiepífitas o epífitas. Epífito se refiere a plantas que crecen sobre las copas o ramas de otros árboles, es decir obtienen soporte mecánico del huésped. Por esta razón, su crecimiento excesivo puede afectar al árbol [44]. Si la maleza además obtiene nutrientes de la otra planta se denomina parásita, si obtiene esos recursos durante todo el ciclo de vida o hemiparásita, si el uso de estos es temporal o una fase del ciclo de vida de [44].

Aunque existen muchas especies de plantas consideradas malezas, varias especies de la familia Loranthaceae son las principales plantas hemiparásitas de la flora tropical de especies de interés económico como cítricos, café, cacao, guamos, guayabos, aguacate (46). Las especies de la familia Loranthaceae desarrollan haustorios, que son raíces modificadas, que penetran en la planta huésped para sujetarse y extraer nutrientes[45]. En Ecuador se ha identificado variedad de malezas que ocasionan grandes pérdidas económicas en cultivos de arroz, cacao, banano o maíz [44].

En este contexto, aspectos de la biología reproductiva ha permitido generar estrategias para aumentar la producción de frutos y semillas en especies del género *Theobroma*. En árboles de *T. grandiflorum* en Pará, Brasil se ha identificado deficiencia de polinización natural, por lo cual se aplicó polinización artificial para mejorar la producción de frutos [36]. En plantaciones de *T. cacao*, ubicadas en Mosman, Australia, se logró incrementar la producción de frutos mejorando el hábitat de los polinizadores, antes de las fechas de floración [38]. En otro estudio, realizado en Brasil, con plantas autógamas de *T. cacao* se encontró que polinizar artificialmente con atomizadores, aumenta la cantidad de flores fertilizadas [46].

Planteamiento del problema

Biología floral

Se ha descrito la morfología floral de *T. bicolor* en Brasil [47], Venezuela [48] y en prensados de diversas colecciones botánicas provenientes de varios países [3]. La estructura y colores de la flor son similares en las tres descripciones, pero los tamaños de sus partes difieren entre los estudios, siendo más grandes las de Venezuela y las más pequeñas las de Brasil. En general, se la describe como flor pentámera: cinco sépalos de 5 - 6.8mm de largo y 2 - 2.45mm de ancho, color rojo; pétalos en forma de saco, color rojo de 3 - 4mm de largo. Lígulas, de color rojo oscuro de 1.24 - 3mm de largo y 1 - 1.5mm de ancho. Cinco estaminodios rojo oscuro de 3.72 - 6.5mm de largo. Cinco estambres con filamento curvo y dos anteras ditecas. El pistilo es de color verde claro. El ovario mide 1.68 - 4mm de largo y 1 - 4mm de ancho. El estilo tiene un largo de 1.47 - 1.7mm.

Aunque las diferencias entre el tamaño de las flores no se ha explicado, en otras especies como la granada, *Punica granatum* L., se ha encontrado una relación positiva entre el tamaño de los flores y el tamaño de los frutos [49]. Ahora, el tamaño de los frutos de *T. bicolor* si se ha asociado a diferentes morfotipos y eco tipos [13,17]. Si se siguiera la misma lógica que la granada, se puede pensar que frutos más grandes provienen de flores más grandes. Sin embargo, el estudio de poblaciones debe estar apoyado por técnicas moleculares. El único estudio que se conoce para el estudio de poblaciones con este tipo de técnicas se realizó en Colombia, comparando poblaciones de *T. bicolor* de Leticia, al sur de la Amazonia y el Guaviare, al nororiente. El estudio no reporta diferencias entre

poblaciones, aunque considera que la técnica utilizada (RAPD) puede no ser la apropiada para esta especie [49]. En Ecuador, no se han realizado estudios de la morfología floral que puedan posteriormente asociarse a algún morfotipo, en el caso que existiera. Tampoco se han desarrollado estudios entre poblaciones de *T. bicolor* para caracterizar y establecer si existen diferencias entre estas.

Aspectos de la biología floral de *T. bicolor* han sido estudiados en diversas condiciones climáticas, pluviométricas y de altitud. En San José de Guaviare, Colombia, a una altitud de 185 m.s.n.m, precipitación media anual 2487 mm y temperatura promedio anual de 28.1°C [50], se observó que el tiempo de desarrollo de la flor desde yema floral hasta la caída de la flor es de aproximadamente 46 días, y el tiempo durante el cual la flor permanece abierta es de cinco días [15]. En Heredia, Costa Rica, departamento Sarapiquí a una altitud de 225 m.s.n.m., temperatura media de 20.6°C y precipitación media anual de 2131 mm [50], se describió que las flores están completamente abiertas a las 9:00 y la apertura de los botones florales maduros comienza a las 20:00 del día anterior [30]. En Ecuador, no existen estudios acerca de la biología floral de la especie, que permitan establecer cuál es el periodo de apertura de las flores y la receptividad del estigma, datos necesarios para establecer estrategias de manejo en la polinización.

En cuanto a estudios acerca de los visitantes florales de la especie, un solo estudio realizado en San José de Guaviare, Colombia, reporta la visita de diversos mosquitos (Díptera) del género *Forcipomya* sp., escarabajos (Coleóptera) del género *Ciclophala* sp. y hormigas (Himenóptera) del género *Atta* sp. [15].

Sobre la fenología reproductiva de la especie existen pocos estudios, uno en África y dos en Sudamérica. En Ibadan, Nigeria, se observaron dos picos de floración: el más alto entre diciembre y marzo, periodo con mayor radiación solar y temperatura, y un pico más débil entre mayo y julio, meses en los cuales la temperatura disminuye [11,50]. Sin embargo, el estudio no encontró una correlación entre la producción de flores y frutos con ninguna variable climática en los diferentes meses de estudio. En San José de Guaviare, Colombia, se observó una oferta constante de flores sin picos de floración [15]. En el mismo estudio, registraron dos periodos de cosecha: entre febrero y marzo y de septiembre a octubre [15], los meses con menor precipitación [50]. En Iquitos, Perú, se registró floración entre septiembre y diciembre [17], época de mayor radiación solar y temperatura [50],

mientras que la fructificación ocurrió entre enero y abril [17] los meses con mayor precipitación [50]. En estos dos estudios no realizaron correlaciones entre la fenología y factores climáticos. En Ecuador, no existen informes o publicaciones que indiquen las épocas de floración o fructificación de la especie, que puedan ayudar a establecer períodos claros de polinización o de cosecha, ni que permitan determinar si existe una correlación entre las variables climáticas y estos procesos. Estas relaciones podrían ayudar a predecir la producción ante diferentes escenarios de cambios en lluvias o precipitación.

Acerca de las restricciones bióticas sobre las plantas de *T. bicolor* es escueta. Un estudio realizado en Perú, reportó ocho distintos organismos que afectan negativamente a las plantas [17], cuatro pertenecen al orden Lepidoptera, dos al orden Coleoptera, y las dos restantes pertenecen a los órdenes Diptera y Orthoptera. En el orden Lepidoptera, se encontró: larvas de *Stenoma*, que dañan hojas y frutos; larvas de Tortricidae, que pegan las hojas para esconderse y alimentarse, reduciendo la capacidad fotosintética de la planta; larvas de Sessidae, que afectan al tronco del árbol y de Pshichidae que ocasionan orificios en las hojas. Del orden Diptera, se registró una especie del género *Dasineura sp.* que afecta a las hojas, produce agallas. Del orden Coleóptera, registraron dos especies una de la familia Curculionidae y la otra de Cerambicidae, cuyas larvas afectan al fruto y al tronco respectivamente. Por último, está un Orthoptera de la familia Acrididae que se alimenta de los brotes de hojas [17].

Se han registrado dos hongos que atacan a *T. bicolor*. En Ecuador se logró inocular con éxito a *M. pernicioso* (antes *C. pernicioso*), sobre plantas de *T. cacao* y *T. bicolor* lo que ocasionó malformaciones en las ramas y 14 de 50 plantas murieron [51]. En Colombia, *M. roreri* fue inculado con éxito a dos de siete árboles de *T. bicolor* [52]. Los frutos de *T. bicolor* que fueron inculados presentaron necrosis en el exterior e interior de los frutos [52]. En Napo, Ecuador, no existen estudios relacionados a las restricciones bióticas de esta especie, que puedan contribuir a hacer un adecuado manejo de las restricciones bióticas que afectan la reproducción de la especie.

Justificación de la investigación

Las semillas de *T. bicolor* demuestran tener un potencial para la comercialización. Recientemente, se ha observado que las semillas tostadas de *T. bicolor* tienen una buena

aceptación en mercados internacionales [23] y nacionales [47]. Específicamente en Estados Unidos la empresa Imlak'esh [53] comercializa las semillas compradas a una cooperativa de mujeres de la selva tropical de Perú [53] y la empresa Canopy Sur [54] compra semillas de esta especie en comunidades Kichwa de Napo y las comercializa en mercados de Quito.

Considerando que los estudios de la biología reproductiva de *T. bicolor* son inexistentes en Ecuador y que la demanda de las semillas crece a nivel nacional e internacional; es indispensable desarrollar investigación alrededor de aspectos de la biología reproductiva de *T. bicolor* en el país y específicamente en Napo que es uno de los lugares de donde se extraen semillas. Aspectos como la biología floral, la fenología reproductiva, y las restricciones a la reproducción pueden servir de base para iniciar nuevas investigaciones y estrategias para polinización artificial [55], hibridación de especies [31], planear tiempos de cosecha [37] y manejar árboles para evitar la pérdida de frutos [42].

Objetivos de la investigación

General

Examinar aspectos de la biología reproductiva del cacao blanco (*Theobroma bicolor* Humb. & Bonpl.) en Napo, Ecuador.

Específicos

Conocer aspectos de la biología floral (morfología floral, proporción de polen y óvulos, etapas florales y receptividad de estigma) de *T. bicolor* en Tena, Napo.

Determinar la relación entre la fenología reproductiva de *T. bicolor* y las variables climáticas como precipitación, humedad, temperatura y radiación solar.

Determinar las restricciones bióticas que afectan la reproducción *T. bicolor* en Tena, Napo.

Capítulo II: Marco metodológico

Área de estudio

El estudio fue realizado en el cantón Tena, provincia de Napo. Se seleccionaron 60 árboles ubicados en patios de casas y fincas de la parroquia de Muyuna (Figura 1). Las fincas comprenden áreas donde se encuentran chagras (zonas de policultivo) y bosques secundarios. El *sitio 1* se sitúa dentro de una finca privada kichwa cercana al Cerro Chiuta ($0^{\circ}57'50.374''S$ y $77^{\circ}52'55.539''O$) entre 530 - 630 msnm, en donde se ubican 37 árboles. El *sitio 2* se sitúa en patios de casas y fincas de la comunidad San Vicente ($0^{\circ}58'37.081''S$ y $77^{\circ}50'30.397''O$) a 540 msnm, donde se ubican 18 árboles. Además, se muestreó en cinco árboles adicionales que se ubican en diferentes fincas y patios de casa sobre la vía Tena-Ikiam y un árbol en la vía hacia el *sitio 1* (puntos blancos adyacentes a la carretera en la Figura 1).

El área presenta una precipitación promedio de 3800 mm, temperatura mínima de 9°C, máxima de 28°C y media anual de 25°C y, humedad relativa media mensual de 89.15% [35].

Biología Floral

Morfología de la flor

La morfología floral de *T. bicolor* se realizó en 80 flores colectadas de ocho árboles (10 flores por árbol): cinco árboles ubicados en el *sitio 2* y en los árboles 1, 4 y 5 (Figura 1). Se recolectó flores abiertas, entre el horario de 13:00 a 17:00 y se las fijó inmediatamente en campo en solución Carnoy [56]. Este fijador está compuesto por 60 ml de alcohol al 99%, 30 ml de cloroformo, y 10 ml de ácido acético [56].

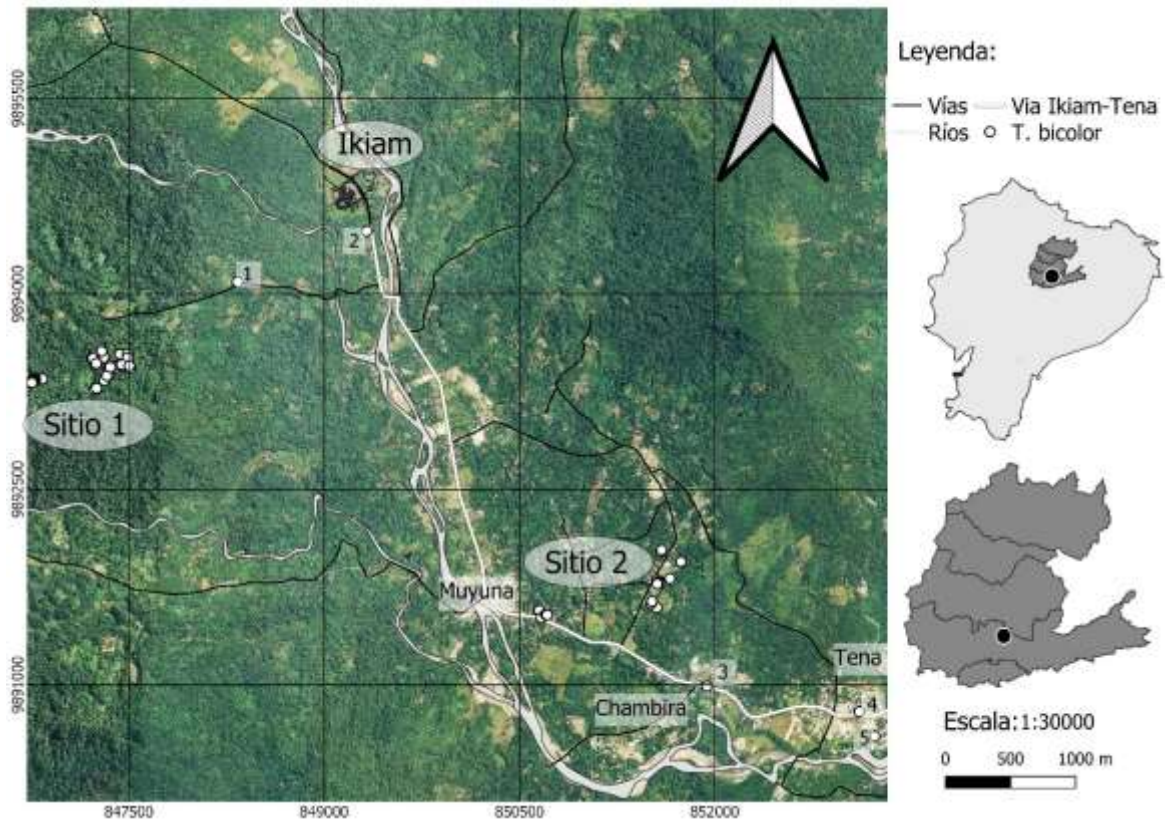


Figura 1. Mapa de sitios de muestreo y ubicación de los árboles de *Theobroma bicolor* estudiados.

Sitio 1: finca vía al Cerro Chiuta, *sitio 2*: San Vicente y sus alrededores. Sobre la vía Tena-Ikiam se ubican cinco árboles en los que también se realizaron observaciones (puntos blancos con números).

Las muestras fijadas fueron transportadas al laboratorio de biología de la Universidad Regional Amazónica Ikiam. Las flores fueron observadas en microscopio digital (Wireless Digital Microscope Inskam) y digitalizadas con su respectiva escala. Las fotos fueron analizadas con el programa Image J, para medir cada parte [57]. Se registró: largo del sépalo, ancho del sépalo, largo de lígula, ancho de lígula, largo de ovario, ancho de ovario, largo de estaminodio y largo del estilo (Figura 2).

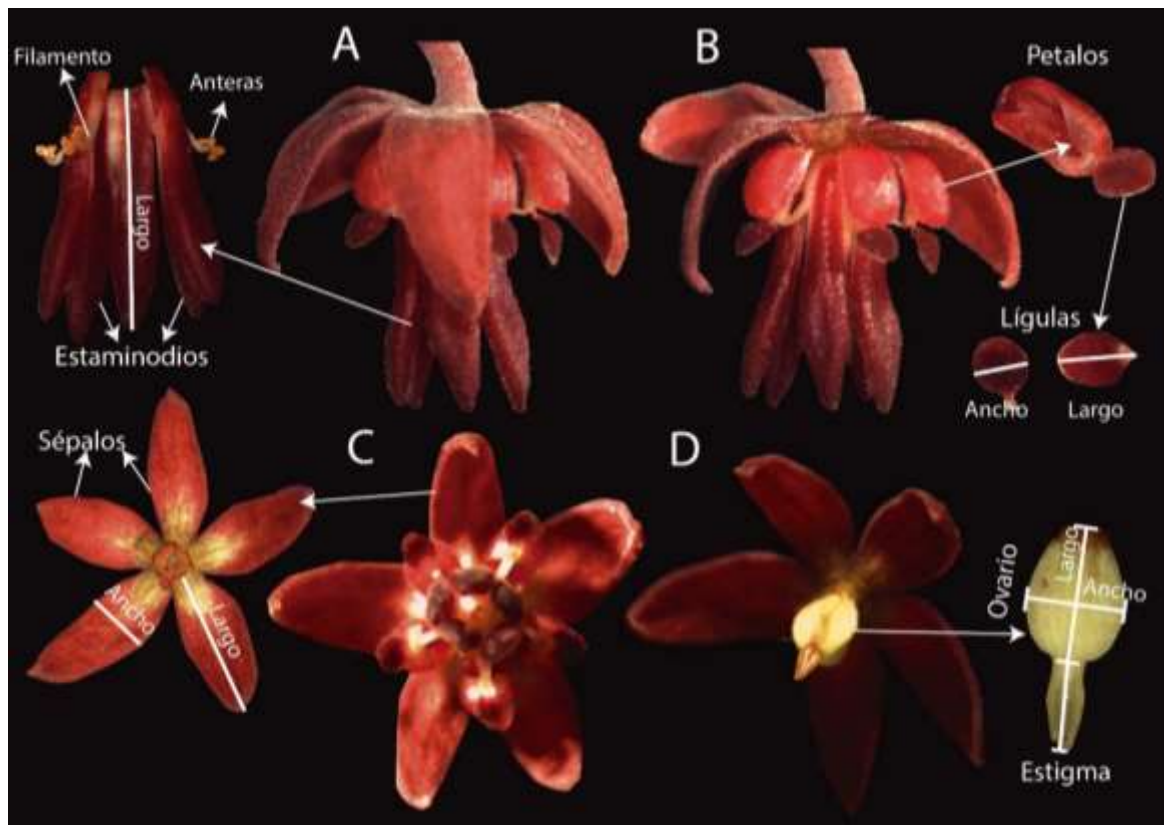


Figura 2. Partes de la flor de *Theobroma bicolor* con sus respectivas mediciones.

A: flor completa, vista de perfil, B: disposición de los pétalos y estaminodios C: flor completa, vista desde arriba y D: disposición del ovario.

Proporción de polen y óvulos.

Se colectaron 35 botones florales de siete árboles (cinco botones florales por árbol). Cinco árboles ubicados en el *sitio 2* y dos en el *sitio 1*. Los botones florales se transportaron al laboratorio, cada botón floral se abrió para registrar el número de estambres, granos de polen de anteras cerradas y el número de óvulos.

Para contar el polen de cada flor se siguió la metodología de Arenas de Souza, 2016 [31]. Se diseccionó un saco polínico de la antera. El saco polínico se colocó sobre un portaobjetos al que se adicionó una gota de Lugol. Con la ayuda de las pinzas se reventó el saco polínico para facilitar la dispersión del polen sobre el portaobjetos. Se cubrió con un cubreobjetos y se observó la muestra en el microscopio (Motic BA210E). Los granos de polen se contaron mediante el método de barrido descrito por Jones, 2012 [58]. La técnica consiste en: dibujar una cuadrícula en el portaobjetos, colocar el objetivo 40 X enfocando la línea superior e inferior de una fila y recorrer todas las filas contando el polen en el área.

El valor encontrado se multiplicó por 20, que es el número de sacos polínicos de la flor, considerando que una flor de *T. bicolor* posee cinco anteras con cuatro sacos polínicos.

Para el conteo de óvulos se usó el estereoscopio (Motic SMZ-161), se diseccionó el ovario y se contó la cantidad de óvulos que poseía, finalmente se realizó la proporción entre el número de granos de polen y número de óvulos de la flor [33].

Etapas florales y receptividad del estigma

A partir de los estudios de etapas florales en especies del género *Theobroma* [28-30] se determinó cuatro etapas florales, etapa a: sépalos totalmente cerrados o en botón floral; etapa b: los sépalos no están totalmente abiertos y los estaminodios cubren al estilo; etapa c: los sépalos están totalmente abiertos y los estaminodios aún cubren al estilo; etapa d: los sépalos están totalmente abiertos al igual que los estaminodios.

Para determinar las etapas florales a lo largo del día se siguió la metodología utilizada por De Souza y Venturieri, 2010 [32]. Se seleccionaron 260 flores de tres árboles. Se marcaron 100 flores en el árbol 2 ubicado cerca de la Universidad Regional Amazónica Ikiám. En el *sitio 2* se seleccionaron dos árboles, y se marcaron 80 flores en cada uno. En cada árbol se registró el número de flores que presentaba cada etapa en los siguientes horarios 6:00, 10:00, 14:00 y 18:00 entre el 27 al 30 de noviembre de 2019.

Se estudió la receptividad del estigma en 150 flores, de seis árboles y en cinco horarios distintos. Dos de los árboles se encontraban en el *sitio 1*, dos en el *sitio 2*, dos en la vía Tena-Ikiám (árbol 1 y árbol 3 Figura 1). Las flores fueron colectadas, entre el 15 al 31 de enero de 2020, a las 18:00, cuando las flores se encuentran en botón floral, y al día siguiente a las 6:00, 10:00, 14:00 y 18:00. La prueba de receptividad [59] se realizó en campo, entre 10 y 60 minutos posterior a la colecta. Para esto se procedió a: diseccionar el gineceo de cada flor, aplicar el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) al 30% sobre el estigma (modificado de Dafni, 1992) [59] y observar con una lupa (40X) detenidamente. El estigma, al tener contacto con el peróxido de hidrógeno, produce un burbujeo que se clasificó de la siguiente manera, dependiendo de su intensidad [53]: cero (0) cuando no tiene ningún burbujeo, uno (1) en caso de que solo exista burbujeo alrededor del estigma, dos (2) si el burbujeo es menor a la mitad del ovario, tres (3) en el caso de que el burbujeo sea mayor a la mitad del ovario y menor al ovario, cuatro (4) si la intensidad de burbujeo es igual o

superior al tamaño del ovario. Por lo tanto, mientras mayor sea el burbujeo mejor será la receptividad del estigma [60].

Fenología reproductiva

Para conocer la época de floración y de fructificación de *T. bicolor* se seleccionaron 55 árboles: 37 árboles del *sitio 1* y 17 árboles del *sitio 2* (Figura 1), que se monitorearon mensualmente entre junio de 2019 y febrero de 2020. De los 55 árboles, 26 se ubicaban en chagras, 18 en bosque secundario y 11 en patios de casas. Estos individuos fueron seleccionados porque en su alrededor se encontraban frutos en estado de putrefacción, lo que indicaba que los árboles ya produjeron frutos. Cada árbol fue marcado con piola y placa para poder realizar el monitoreo.

Con base en el monitoreo floral y frutal se calculó el porcentaje de árboles en flor y fruto. Siguiendo la clasificación de Venturieri [36] en *T. grandiflorum*, se contó el número de flores y para graficarlo se clasificó la floración en cuatro categorías: cero (0) = sin flores abiertas, uno (1) = hasta 10 flores abiertas, dos (2) = 11-50 flores abiertas y tres (3) = más de 50 flores [36]. En la fructificación se contó el número de frutos en la copa y para graficar la intensidad de fructificación se clasificó en cuatro categorías: cero (0) = sin frutos en la copa, uno (1) = uno a cinco frutos, dos (2) = seis a quince frutos y tres (3) = más de 15 frutos [36]. Además, se contó el número de frutos maduros en el suelo (frutos de coloración amarilla).

Restricciones de la reproducción

Con el fin de conocer las restricciones bióticas en la producción de frutos de *T. bicolor*, se estudió el daño ocasionado por una enfermedad y una maleza que los pobladores locales reconocen en el área: el hongo *Moniliophthora roreri*, que crece en los frutos que están madurando en el árbol y la maleza *Oryctanthus cf. alveolatus* (Kunth) Kuijt (llamada en kichwa *lumbitzi*).

Para conocer el daño que produce la maleza en la producción de frutos de *T. bicolor*, se seleccionaron 10 árboles (5 infestados y 5 sanos) en el *sitio 1* y ocho árboles (4 infestados y 4 sanos) en el *sitio 2*, para un total de 18 árboles. Para seleccionar los árboles se establecieron ciertos criterios como que los árboles tuvieran altura, diámetro y edad similares. La edad de los árboles se estimó con base en la información de los dueños de las

fincas. Los árboles se monitorearon mensualmente entre septiembre de 2019 a febrero de 2020. De cada árbol se contó el número total de flores y de frutos producidos. Se consideraron árboles infestados los que poseían más del 50% de la copa del árbol con *lumbitzi*, y árboles sanos los que tenían menos del 40% de la copa cubierto por *lumbitzi*.

La afectación del *M. royeri* se vio en paralelo con la fenología reproductiva, se monitorearon los mismos 55 árboles en las mismas fechas. En cada observación, se registró la presencia de frutos infectados por *M. royeri* en la copa de los árboles y se contó el número de frutos maduros que cayeron infectados por el hongo (frutos con mancha oliva y presencia de esporas color blanco).

Clima

Los datos de las variables climáticas de los sitios de muestreo: promedios mensuales de precipitación (mm), temperatura (°C), humedad relativa (%), radiación solar (kJ/(m²)), radiación solar difusa [W/m²] y global [W/m²] se obtuvieron de las bases de datos WorldClim versión 2.0 a escala de 1km² [50] y de la estación climática de la Universidad Regional Amazónica Ikiám. Utilizando las coordenadas de los 55 árboles, monitoreados en fenología reproductiva, con el programa QGIS se obtuvo las variables climáticas mensuales de las capas de WorldClim 2.0 [50] para cada árbol. Para cada variable climática se realizó un promedio con los datos obtenidos para cada árbol por mes.

Análisis de datos

Los análisis estadísticos fueron realizados en el software libre R [61]. Para probar si existen correlaciones entre los datos cuantitativos discretos fenológicos reproductivos (porcentaje de árboles con flores y frutos) de *T. bicolor* con los datos cuantitativos continuos climáticos (precipitación, temperatura, radiación solar y humedad relativa) se realizaron correlaciones de Pearson [62].

Para determinar si existen diferencias significativas en los niveles de receptividad del estigma a lo largo del día (horas), se realizó la prueba de Kruskal-Wallis, considerando que los datos son categóricos. En caso de encontrar diferencias significativas se aplicará la prueba de Dunn, que sirve para agrupar las horas con datos similares.

Para determinar si existe diferencia significativa en los niveles de receptividad del estigma a lo largo del día (horas), se realizó la prueba de Kruskal-Wallis, considerando que

los datos son categóricos. En caso de encontrar diferencias significativas se aplicará la prueba de Dunn, que sirve para agrupar las horas con datos similares.

Por último, se determinó la restricción reproductiva ocasionada por la planta *O.cf. alveolatus*. Comparando el número de inflorescencia y frutos, de *T. bicolor* con y sin *O.cf. alveolatus*, mediante la prueba de Wilcoxon, ya que los datos no poseían una distribución normal.

Capítulo III: Presentación de datos y resultados

Biología floral

Morfología floral

Se encontró en promedio 23 ± 7 flores en cada inflorescencia de *T. bicolor*. Las flores poseen cinco sépalos lanceolados de color rojo claro y cinco pétalos en forma de sacos color rojos claros brillosos. Las lígulas que están conectadas al extremo de cada pétalo, tienen forma redonda alargada y son de color rojo oscuro al igual que los estaminodios. Los ovarios y el estilo tienen color verde claro. Los datos de las medidas se presentan en la Tabla 3 y su morfología se puede observar en la Figura 2.

Tabla 3. Datos de las mediciones de las partes de la flor de *Theobroma bicolor*

Variables	# Flores	No Árboles	Promedio	σ
# de Inflorescencias por árbol	-	55	34.67	24.73
# de flores por Inflorescencia	-	15	23.37	7.36
Largo de sépalo (mm)	80	8	6.44	0.677
Ancho de sépalo (mm)	80	8	2.38	0.379
Largo de lígula (mm)	80	8	1.11	0.177
Ancho de lígula (mm)	80	8	0.921	0.186
Largo de estaminodio (mm)	80	8	5.50	0.338
Largo de estilo (mm)	80	8	1.49	0.166
Largo de ovario (mm)	80	8	1.91	0.215
Ancho de ovario (mm)	80	8	1.45	0.147
# de óvulos	35	7	43.88	5.44
# de granos de Polen	35	7	6819.82	1177.21

Nota: Se presenta el número flores y árboles para cada variable con su respectivo promedio y desviación estándar.

Proporción de polen y óvulos

En 35 flores de siete árboles de *T. bicolor* se contaron en promedio 6819 ± 1177 granos de polen y 44 ± 5 óvulos por flor, teniendo una proporción de polen/óvulos igual a 158 ± 33 , por lo tanto, se sugiere que las plantas son autógamias facultativas.

Etapas florales

A partir de la observación de 260 flores, se registraron las diferentes etapas florales durante el transcurso del día. A las 18:00 del primer día todas las flores se encontraban en botón floral (etapa a) (Figura 3.A y figura 4). A las 6:00 del siguiente día, el 96% de las flores se encontraron en etapa b, cuando los sépalos se empiezan abrir y los estaminodios se encuentran protegiendo al estilo de la flor (Figuras 3.B - 3.C). A las 10:00, 90% de las flores estaban en etapa c, cuando los sépalos se abren totalmente y los estaminodios permanecen cerrados (Figuras 3.D). A las 14:00, el 86% de las flores se encontraban en la etapa d, cuando los sépalos y estaminodios de la flor se encuentran totalmente abiertos (Figura 3.E). A las 18:00, aumenta al 95% el número de flores están en etapa d. Las flores permanecen en etapa d por uno o dos días mientras van cayendo. Las flores polinizadas pierden los pétalos que caen, los estaminodios se secan y el ovario empieza a crecer (Figura 3.F).

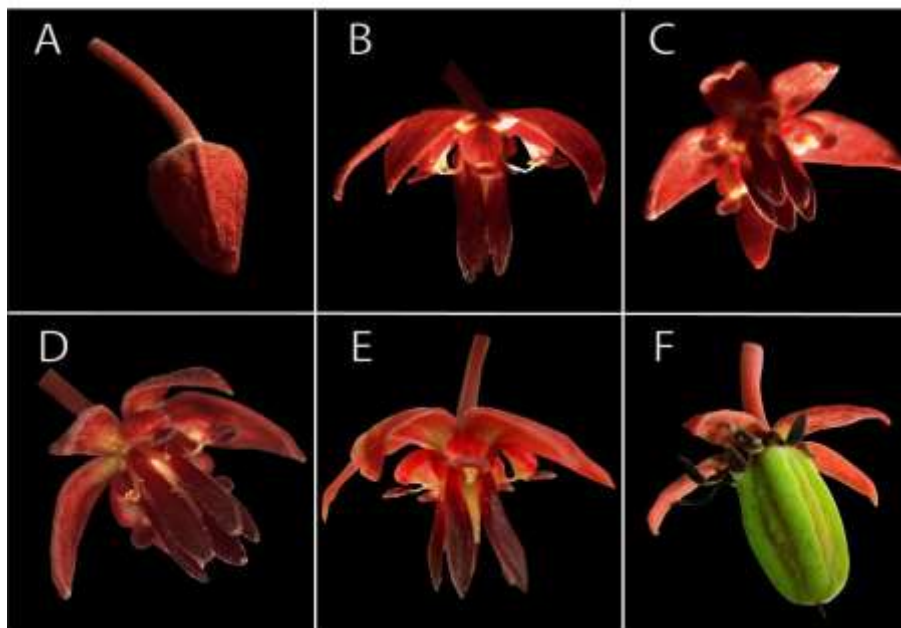


Figura 3. Etapas florales de *Theobroma bicolor*.

A. Etapa a = botón floral, sépalos cerrados, B y C. etapa b = sépalos semi abiertos y estaminodios cerrados, D. etapa c = sépalos abiertos y estaminodios cerrados, E. etapa d = sépalos y estaminodios totalmente abiertos y F. flor polinizada.

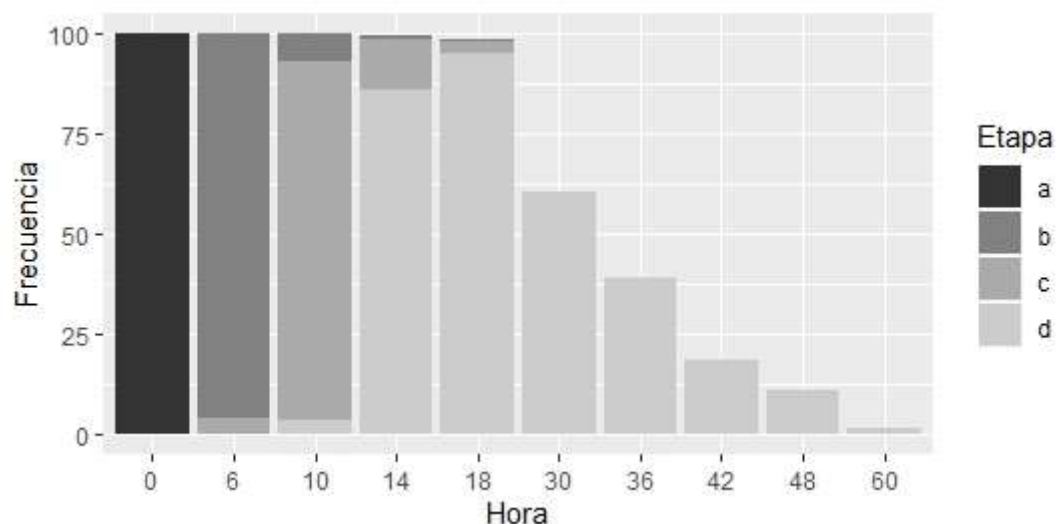


Figura 4. Porcentaje de flores de *Theobroma bicolor*, en cada etapa floral a lo largo de tres días.

En negro etapa a=botón floral, en gris oscuro etapa b= sépalos semiabiertos, gris medio etapa c = sépalos abiertos y estaminodios cerrados, y en gris claro etapa d = sépalos y estaminodios totalmente abiertos. Hora de inicio 18:00

Receptividad del estigma

Las horas con mayor intensidad de burbujeo y, por tanto, de receptividad de estigma se registraron a las 6:00 y 10:00 (b y bc), con media intensidad (cd y d) a las 14:00 y 18:00. La menor intensidad de burbujeo (a), se registró a las 18:00 del día anterior, cuando la flor se encontraba en botón floral. Mediante la prueba de Kruskal Wallis se encontraron diferencias significativas en la receptividad del estigma ($\chi^2=84.192$, $df=4$, $p<0.05$), determinada por la intensidad de burbujeo con peróxido de hidrógeno a lo largo del día. La prueba de Dunn corroboró que la receptividad del estigma es diferente a lo largo del día (Figura 5).

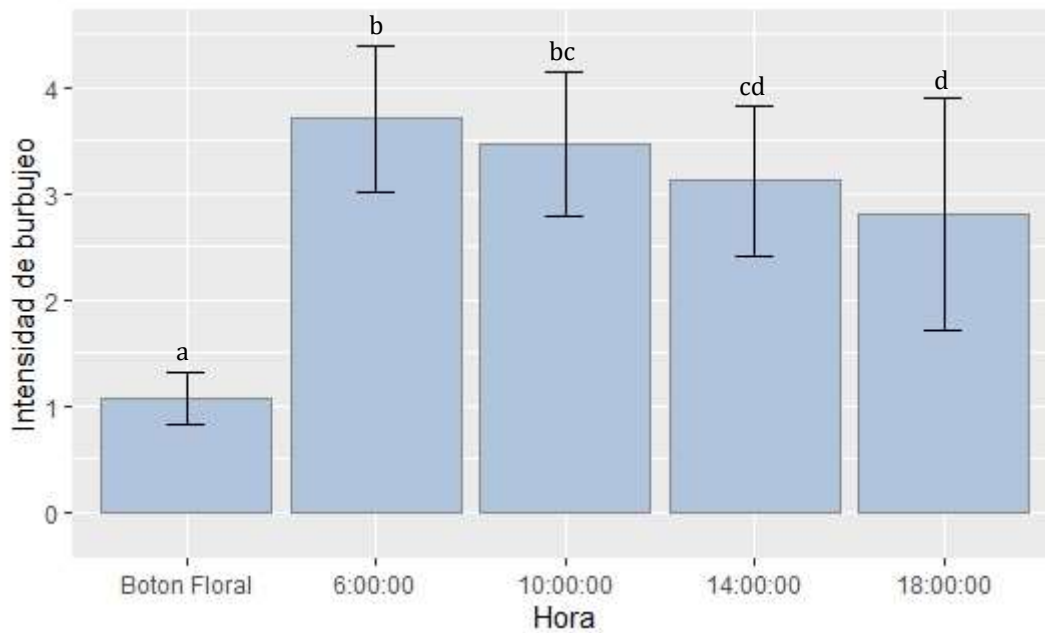


Figura 5. Intensidad de burbujeo en el estigma de flores de *Theobroma bicolor* a diferentes horas del día.

Las letras indican las agrupaciones realizadas con la prueba de Dunn y las barras indican desviación estándar.

Fenología reproductiva

De los 55 árboles monitoreados se observaron varias correlaciones entre los datos de fenología reproductiva y datos meteorológicos. En los meses con mayor temperatura y radiación solar se observó mayor floración. El análisis de Pearson indicó que el porcentaje de árboles en flor de los *sitios 1* y *2* posee una correlación alta y positiva ($r > 0.7$) con las variables climáticas de radiación solar, temperatura promedio, temperatura mínima y temperatura máxima reportadas en WorldClim 2.0 (Figura 5), y con la radiación solar global máxima registrada por la estación meteorológica de Ikiam (Figura 6). Así mismo, el porcentaje de árboles con frutos mostró una correlación positiva con la temperatura promedio de la estación de Ikiam, una correlación negativa con la precipitación del WorldClim 2.0. y una correlación positiva con la temperatura mínima de ambas fuentes de datos.

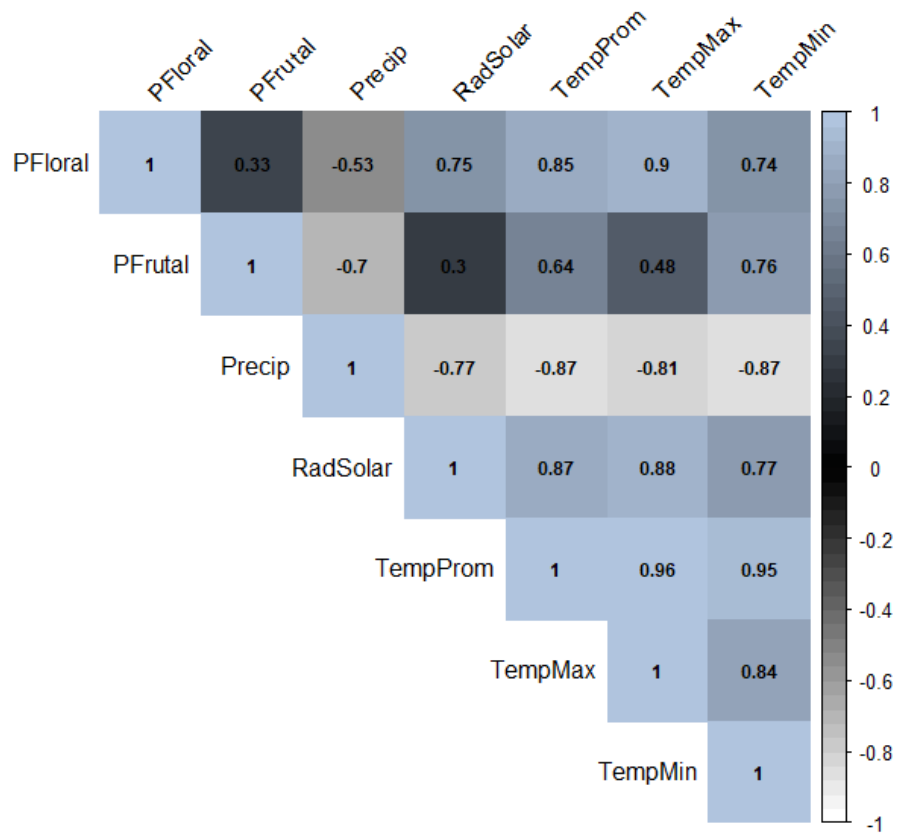


Figura 6. Correlaciones entre las variables climáticas de Worldclim 2.0. con floración y fructificación de *Theobroma bicolor*.

Precipitación [mm](Precip), radiación solar [kJ/(m²*día1)] (RadSolar), temperatura promedio [°C](TempProm), máxima [°C](TempMax) y mínima [°C](TempMin) con el porcentaje de árboles de *T. bicolor* en flor (PFloral) y fruto (PFrutal).

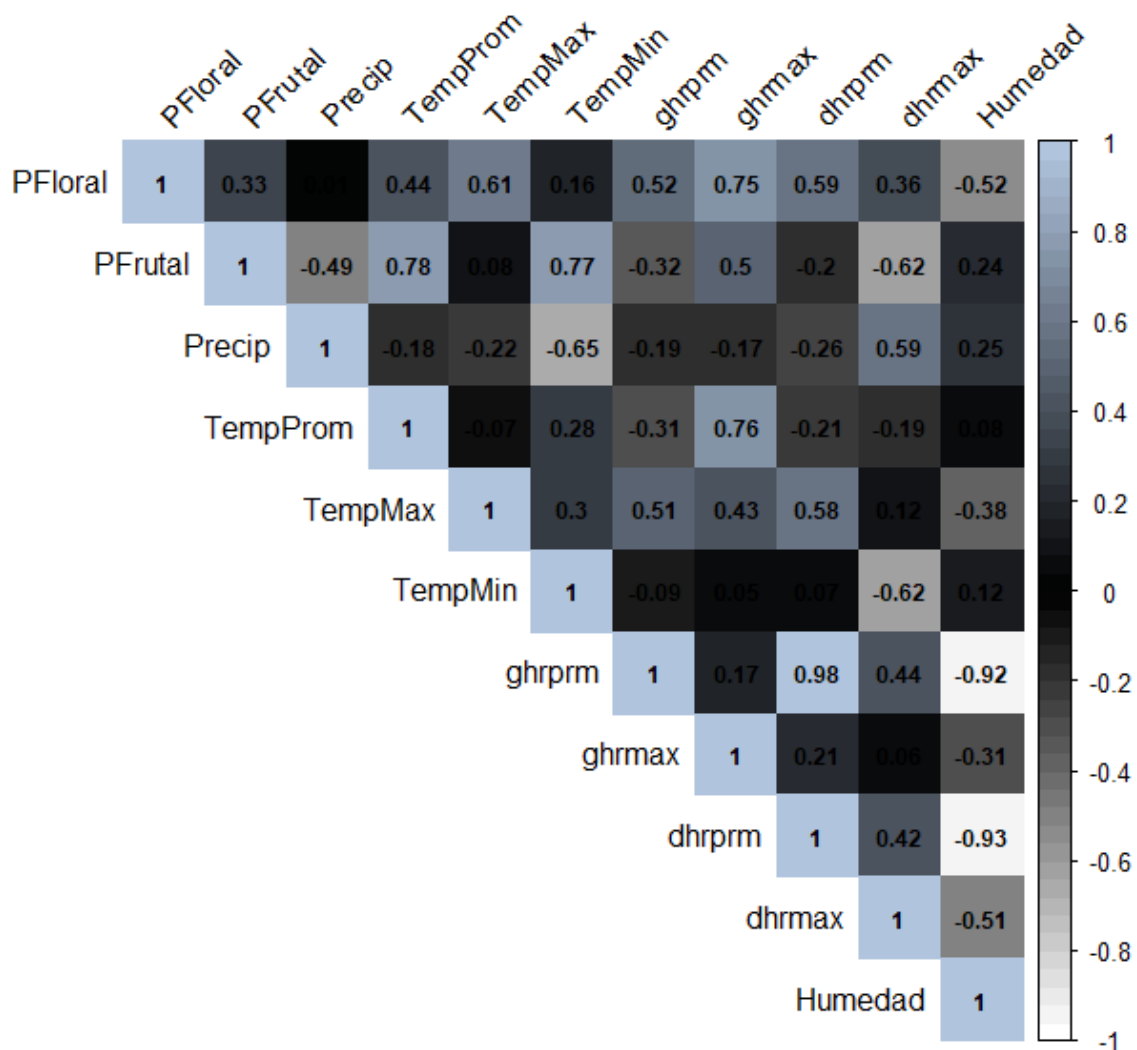


Figura 7. Correlaciones entre las variables climáticas de la estación meteorológica Ikiam con floración y fructificación de *Theobroma bicolor*.

Precipitación [mm](Precip), temperatura promedio [°C](TempProm), máxima [°C](TempMax) y mínima [°C](TempMin), radiación solar global promedio [W/m²](ghrprm), radiación solar global máxima [W/m²](ghrmax), radiación solar difusa promedio [W/m²](dhrprm), radiación solar difusa máxima [W/m²](dhrmax) y humedad relativa [%](Humedad) con el porcentaje de árboles de *T. bicolor* en flor (PFloral) y fruto (PFrutal).

El pico de floración de *T. bicolor*, es decir de mayor producción de flores, ocurrió entre los meses de septiembre a diciembre (Figura 7), cuando la radiación solar y temperatura fue mayor. La floración disminuyó entre los meses de junio a agosto, cuando existe menor temperatura y menor radiación solar global.

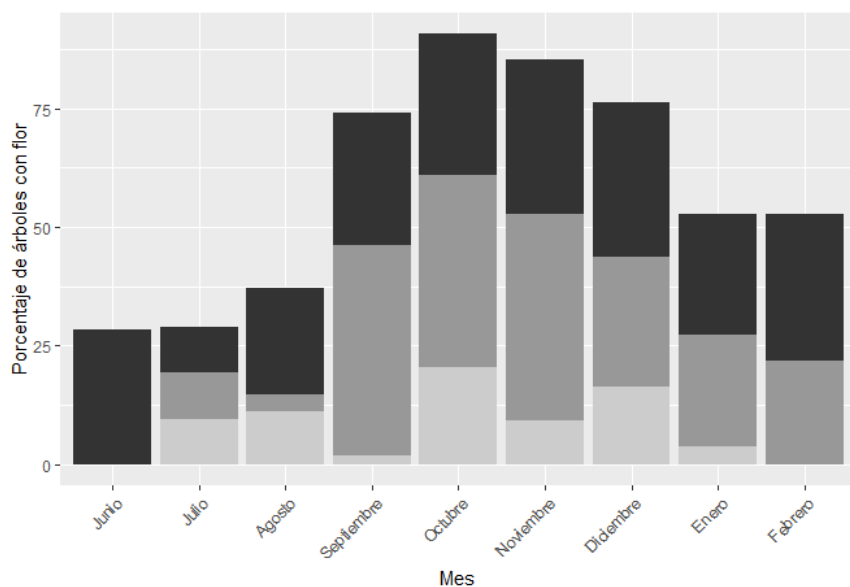


Figura 8. Fenología floral de *Theobroma bicolor* de junio de 2019 a febrero de 2020.

Los diferentes colores muestran la intensidad de floración: negro son árboles con 1 a 10 flores, gris oscuro de 10 a 50 flores y gris claro más de 50 flores.

La fructificación aumentó dos meses después del pico de floración (Figura 9). Entre noviembre y febrero se registró el mayor número de árboles con frutos. De los 55 árboles estudiados, 46 árboles tuvieron en total 310 frutos inmaduros, con un promedio por árbol de 7 ± 5 frutos y maduraron 130 frutos de 29 árboles. La producción promedio de frutos maduros por árbol fue de 4 ± 6 frutos durante los 9 meses de estudio.

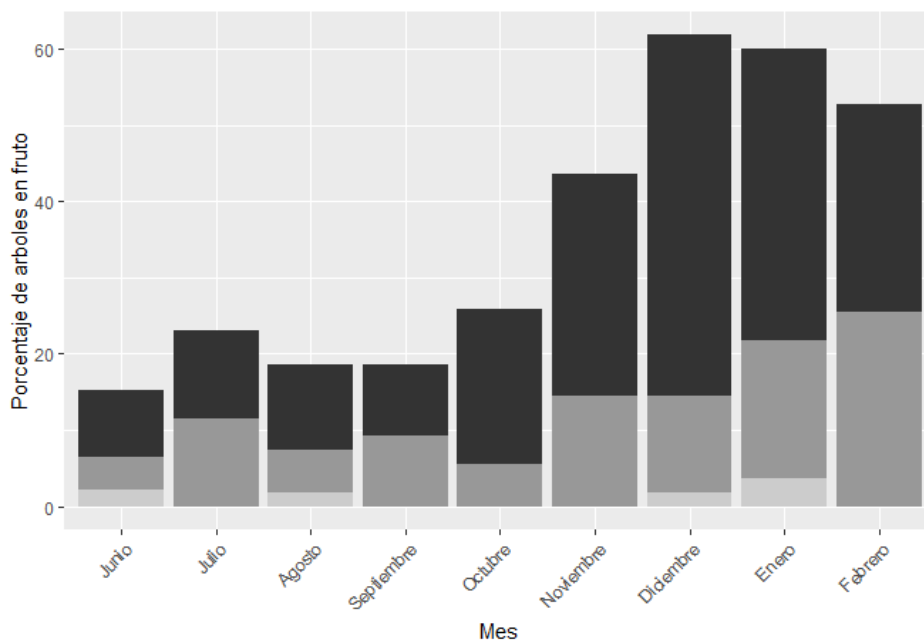


Figura 9. Fenología frutal de *Theobroma bicolor* de junio de 2019 a febrero de 2020.

Los distintos colores significan diferentes rangos de producción de frutos: negro son árboles de 1 a 5 frutos, gris oscuro de 6 a 15 frutos, gris claro más de 15 frutos.

Restricciones de la reproducción

Se observó diferencias significativas en el número de flores y frutos producidos, al comparar árboles sanos con árboles infestados por *lumbitzi* (*O. cf. alveolatus*). Los nueve árboles sanos produjeron en promedio 48 ± 31.71 flores y 9.78 ± 7.87 frutos, mientras que los nueve árboles infestados produjeron 17.78 ± 6.91 flores y 1.56 ± 1.94 frutos. De acuerdo a la prueba de Wilcoxon, los árboles infestados presentaron menor cantidad de flores ($W=64$, $p=0.042$) y de frutos ($W=74.5$, $p=0.003$), comparado con los árboles que se encontraban sanos (Figura 10).

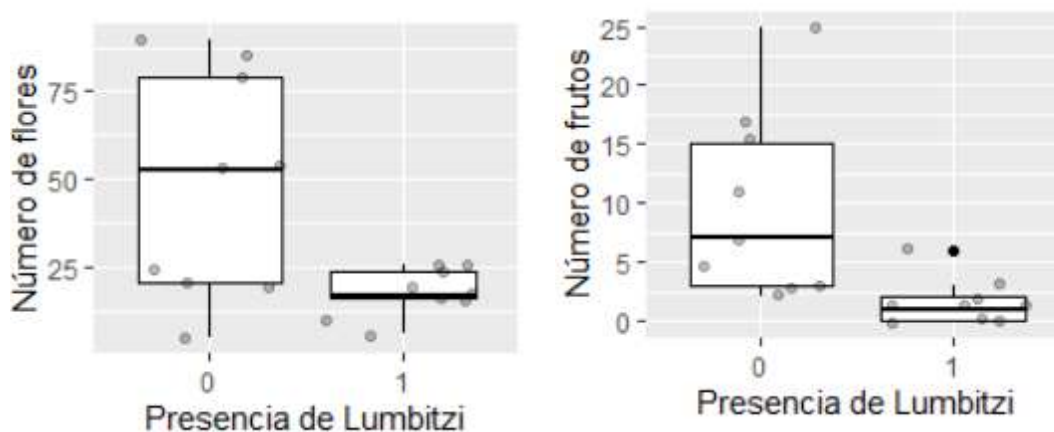


Figura 10. Efecto de la infestación de árboles de *Theobroma bicolor* por *lumbitzi* (*O. cf. alveolatus*).

Árboles infestados = 1 y sanos = 0.

A partir del conteo de frutos infectados por *M. roleri* en 55 árboles, se calculó el porcentaje de árboles enfermos.

Existe una gran pérdida de frutos debido a la contaminación con este hongo, en las poblaciones estudiadas se encontró que 54 frutos inmaduros y maduros cayeron contaminados. Es decir que sin la presencia del hongo se hubieran producido 184 frutos, con lo cual el hongo *M. roleri* ha disminuido el 29% de la producción frutal. Los frutos infectados toman una coloración café y al paso del tiempo se generan esporas de color blanco alrededor del fruto. Durante el estudio se observó que en todos los meses se encuentran frutos infectados con *M. roleri* (Figura 11), y que siete de los árboles estudiados presentaron frutos infectados en la copa, que perduraron los ocho meses de este estudio (Figura 11).

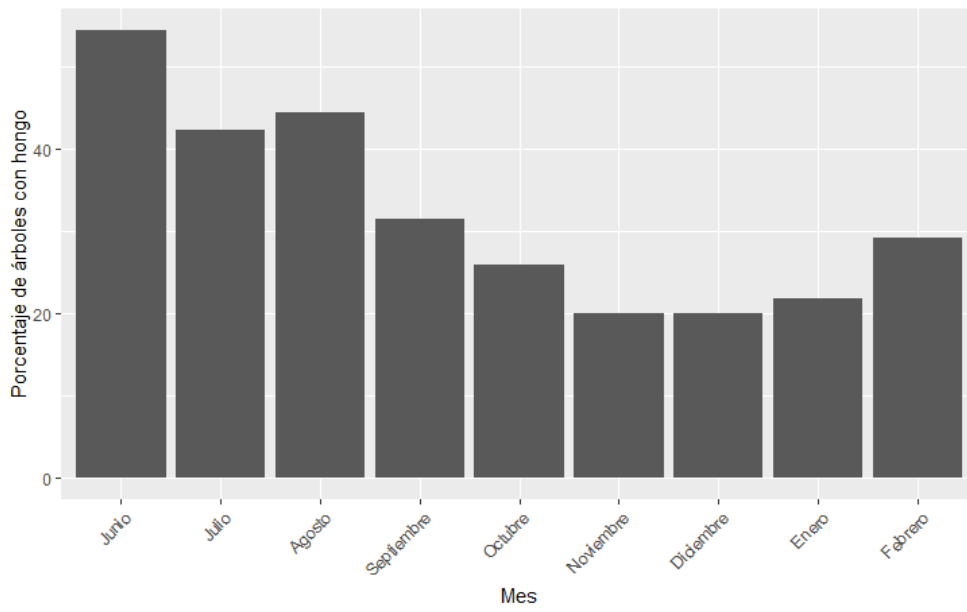


Figura 11. Porcentaje de árboles de *Theobroma bicolor*, infectados con *Moniliophthora roreri*. Monitoreo entre junio de 2019 a febrero de 2020.

Capítulo IV: Interpretación y discusión

Biología floral

Morfología floral

Existen diferencias entre las flores de *T. bicolor* de Napo con las reportadas en otros lugares [63]. Se encontraron diferencias entre el número de óvulos promedio, diámetro de ovario y largo de estaminodios de la población estudiada con la descrita en Brasil [47]. Diferencias en largo de sépalos, ancho y largo de lígula, estaminodios y ovario con lo reportado en Venezuela [48] y entre el tamaño de sépalos, lígula, estilo y ancho de ovario con lo reportado por Cuatrecasas de varias exsiccatas de la especie [3]. (Tabla 4.)

Tabla 4. Comparación entre flores de *Theobroma bicolor*, medidas en Napo (este estudio) y en otros estudios [3,47,48].

Partes florales	Promedio este estudio	Promedio Brasil	Rango Venezuela	Rango Cuatrecasas
Largo de sépalo (mm)	6.44±0.68	6.43	6.2-6.8	5-6
Ancho de sépalo (mm)	2.38±0.38	2.46	-	2-2.5
Largo de lígula (mm)	1.11±0.18	1.24	2.8-3	2-2.5
Ancho de lígula (mm)	0.921±0.19	1.02	1.3-1.5	1-1.2
Largo de estaminodio (mm)	5.50±0.34	3.72	6.2-6.5	5
Largo de estilo (mm)	1.49±0.17	1.47	-	1.7
Largo de ovario (mm)	1.91±0.21	1.68	3-4	1.8-2
Ancho de ovario (mm)	1.45±0.15	2.51	-	1-4
# de óvulos	43.88±5.44	55.17	-	-

Las diferencias entre ovarios y tamaño de las flores entre ambos sitios pueden atribuirse a diferencia entre morfotipos de la especie. Se han reportado diversos morfotipos de *T. bicolor*, de acuerdo a las características del fruto como el tamaño, dureza de cáscara, número de semillas y rugosidad de los frutos [13,17,22]. Con base en características moleculares un estudio desarrollado en Colombia comparando poblaciones de Leticia y Guaviare a través de la técnica RAPD (Random Amplified Poly-morphic DNA) no encontró diferencias entre las poblaciones [64]. Sin embargo, atribuyen el hecho a la

técnica molecular utilizada. Se requiere realizar estudios moleculares de esta especie en Ecuador que permitan determinar si hay morfotipos relacionados a las poblaciones de esta especie en el país. Si además se realizan mediciones morfológicas podríamos corroborar la hipótesis de diferencias entre los tipos de flores por morfotipos.

La diferencia entre el tamaño de los estaminodios (Tabla 4) podría estar asociada a los visitantes florales de cada sitio. Aunque no era un objetivo de este estudio, se observó que los estaminodios protegían al ovario de la flor; ya que se registraron escarabajos y saltamontes alimentándose solamente de los estaminodios, y en pocos casos de toda la flor. Un estudio de *T. cacao* en Hawai [65], describió que la posible función de los estaminodios es impedir la entrada a la flor de insectos no polinizadores. Otro estudio en *T. cacao* describe que los estaminodios sirven para atraer a los polinizadores (*Forcipomyia* spp.) y como un camino para que el insecto toque con el torso al estigma de la flor [66]. Para probar el papel de los estaminodios en *T. bicolor*, es necesario continuar observando el papel que juegan estos organismos, así como otros visitantes en la flor. Así mismo, con los escarabajos y saltamontes que se observaron hay que continuar realizando observaciones con el fin de calcular el daño que causan a la flor y determinar que tanto afectan la producción de las plantas en cada lugar.

Proporción de polen y óvulos

Los resultados sugieren que *T. bicolor* en Tena es autógamo facultativo, es decir que puede ser autopolinizado, o puede recibir polinización cruzada. Sin embargo, es necesario realizar experimentos de compatibilidad entre las flores de *T. bicolor* para corroborar si la autocompatibilidad si se cumple. Dado que en *T. cacao* se ha encontrado que algunos árboles autógamos facultativos según la clasificación de Cruden 1976, no logran autofecundarse [67]. Saber que la *T. bicolor* es importante, ya que plantas autógamas en cultivos presentan una ventaja frente a plantas xenogamas. En *T. cacao* se ha reportado que los individuos autógamos son más productivos [46].

Etapas florales y Receptividad de estigma

Como se indicó, entre los aspectos de la biología floral necesarios para el manejo de las especies, se encuentra el estudio de las etapas de la flor y el momento en el que están receptivas para recibir polen. Las horas de apertura floral y etapas florales concuerdan con otras especies del mismo género. En Costa Rica, se reportó que los botones

florales de *T. bicolor*, *T. mammosum*, *T. simiarum* y *T. speciosum* están cerrados a las 20:00 y se abren totalmente a las 9:00 del día siguiente [30]. En Tena, Napo se observó que a las 6:00 las flores ya habían empezado abrir y a las 10:00 los sépalos estaban totalmente abiertos, pero los estaminodios aún estaban cubriendo al estigma. Solamente transcurridas cuatro horas, los estaminodios se abrieron completamente, alrededor de las 14:00. El comportamiento floral de *T. bicolor* se asemeja al de *T. speciosum* ubicado en Para, Brasil, porque en ambos, los sépalos abren, pero los estaminodios permanecen cerrados alrededor de las 10:00, similar a *T. bicolor*. Sin embargo, se diferencia por el periodo de apertura, en *T. speciosum* abren totalmente a las 18:00 [32]. Estas relaciones de comportamiento pueden estar asociadas a su cercanía filogenética [4].

La receptividad del estigma de *T. bicolor*, se comporta de forma similar a *T. subincanum* [31] y que en *T. speciosum* [32] ya que es alta en las primeras horas de la mañana (6:00) y va decreciendo hasta las 18:00 [53]. En otros árboles del género *Theobroma* también se reporta mayor receptividad del estigma durante el día [31]. Por lo cual parece una característica del género. Esta información es útil para generar estrategias de polinización artificial, hibridación o para identificar los posibles polinizadores.

Fenología de la reproducción

La floración de árboles de *T. bicolor* está relacionada a variables climáticas, como en otras especies del género *Theobroma*. La floración de *T. bicolor* en Tena, Napo, tuvo un pico de floración en los meses de septiembre a diciembre, meses de mayor radiación solar y temperatura promedio. De manera similar, en Iquitos Perú [17] y en Ibadan Nigeria [11], los picos de floración coinciden con los meses de mayor temperatura. De igual manera, *T. grandiflorum* presenta mayor floración los meses más secos y con mayor radiación solar [36]. Los datos contrastan con *T. cacao* en el cual se ha encontrado que el pico de floración [62] y la reproducción de sus polinizadores [38] aumenta en los meses con mayor precipitación. Esta información ha ayudado a generar estrategias que incrementen la población de polinizadores, con el objetivo de aumentar la producción de frutos de *T. cacao* [38]. Ahora bien, esto demuestra la necesidad de identificar los polinizadores de *T. bicolor*, estudiar su ciclo de vida y generar estrategias que logren incrementar su población en los meses de mayor floración de *T. bicolor*.

En relación a la producción de frutos por árbol es diversa entre árboles de la misma especie y de especies cercanas. Se registró una gran diferencia de producción entre los árboles estudiados, ya que unos produjeron más de 20 frutos mientras que otros ni uno. Además, se determinó que el promedio de frutos inmaduros fue de 7 ± 5 por árbol y de frutos maduros fue 4 ± 6 por árbol durante los 9 meses de estudio. En Iquitos, Perú, se registró en promedio 7 frutos por árbol, en un monocultivo de *T. bicolor* de 7 años de edad y con densidad de 400 árboles por hectárea [17]. En Pará, Brasil, en árboles de *T. grandiflorum* se reportó una producción de 4.5 - 6 frutos por árbol [36], y en un cultivo bien manejado se llegó a 12 frutos por árbol [68]. Aunque los datos, sin duda, contribuyen a la información de la especie a nivel local, es necesario contemplar un monitoreo a más largo plazo para determinar la variabilidad interanual de producción de frutos.

Las varianzas de producción de frutos entre árboles, se debe a una variedad de factores abióticos y bióticos. Entre los factores bióticos está la actividad de los polinizadores [36] y restricciones bióticas. Mientras que, los factores abióticos están la humedad relativa, precipitación, sombra, composición del suelo y factores genético como se ha evidenciado en *T. cacao* [40]. Sin embargo, en este estudio se pudo evidenciar que las restricciones bióticas como la presencia del hongo y la maleza, influyeron en la producción de frutos maduros de *T. bicolor*. En futuros estudios se debería investigar cual es el efecto de otros factores abióticos y bióticos en la reproducción de *T. bicolor*.

Restricciones de la reproducción

La interacción de la planta *O. cf. alveolatus* causó un efecto negativo en la producción de flores y frutos de *T. bicolor*. La producción de flores en árboles sanos fue de 48 ± 31.71 y de los infestados 17.78 ± 6.91 . De igual manera la producción de frutos fue mayor en árboles sanos con 9.78 ± 7.87 y de infestados 1.56 ± 1.94 . Las especies del género *Oryctanthus* poseen haustorios que extraen savia de su planta huésped [69] y además cubre la copa del árbol al igual que una liana. En otras plantas la biomasa y reproducción de la planta huésped disminuye como consecuencia de la presencia de parásitas [70]. En Panamá, se ha demostrado que las lianas al cubrir las copas de los árboles ocasionan una reducción en la reproducción de árboles y en algunos casos puede provocar su muerte [71]. Además, se ha reportado que las plantas epífitas que se desarrollan por la copa provocan una disminución en la cantidad de luz que la planta huésped recibe [44]. A menos luz menos

actividad fotosintética y se ha probado que las plantas establecen la relación de costo-beneficio, donde prima la sobrevivencia [72] sobre la reproducción de tal manera disminuyen producción de flores y de frutos.

La enfermedad causada por *M. royeri* también afecta a la reproducción del árbol de *T. bicolor* en Napo, Ecuador. Se observó que el 29% de frutos que cayeron estaban contaminados por *M. royeri*. El daño ocasionado por *M. royeri* a los frutos de *T. bicolor* son similares a los ya reportados en Colombia [52], donde esta enfermedad genera necrosis interna y externa en los frutos de *T. bicolor* contaminados [52]. Las observaciones de campo indicaron que el daño generado depende del momento de contaminación del fruto. Cuando la contaminación del fruto ocurrió al inicio del crecimiento, este se daña en su totalidad y queda en la copa del árbol. Cuando el fruto fue contaminado cerca de su maduración (a los 3 meses del inicio del desarrollo) el fruto cae, y si es cosechado pronto se pierde solamente entre el 20% - 50% del fruto. Estos resultados difieren de aquellos reportados en Colombia, el daño sobre los árboles depende de la resistencia que tienen estos frente al hongo [52]. En futuros estudios se podría medir de forma más detallada el daño que ocasiona *M. royeri* a los frutos en distintos tiempos de desarrollo. En estudios de *T. cacao* se ha visto que la varianza de daño entre frutos de distintos árboles está asociado a la genética de la planta, condiciones ambientales, edad de la mazorca y momento de la infección [73].

Capítulo V: Conclusiones y recomendaciones

El presente estudio es el primero en Ecuador que describe aspectos de la biología reproductiva de *T. bicolor* en Ecuador. Se describe la morfología de la flor, etapas florales, la receptividad del estigma, fenología reproductiva y dos restricciones bióticas en la reproducción.

El tamaño de los ovarios se encuentra dentro del rango reportado por Cuatrecasas para varias exsiccatas de la especie [3]. Sin embargo, el largo es mayor en las flores de Napo comparados a los de Ilheus, Bahía, Brasil, pero menores a las de Venezuela. Esto puede estar relacionado con las poblaciones de origen o bien con variedades de morfotipos existentes. Mientras que la diferencia entre estaminodios puede estar vinculado a los polinizadores y su tamaño. *T. bicolor* en Ecuador debe ser caracterizado molecular y morfológicamente, para definir si existen variedades de *T. bicolor* y de esta manera determinar si estas tienen relación con diferencias en la productividad.

Las flores de *T. bicolor* comienzan a abrir a primeras horas de la mañana (6:00) y se abren completamente a las 14:00, así mismo son las horas en que el estigma está más receptivo. Por lo anterior, se sugieren estas horas entre las 6:00 a 14:00 para realizar estudios de polinizadores y polinización artificial.

Los resultados de este estudio pueden aportar en experimentos de polinización, de polinización asistida o incluso de hibridación, con otras especies del género *Theobroma*. Estos experimentos deben tener en cuenta el tiempo de apertura de las flores, de máxima receptividad del estigma y de viabilidad del polen [31]. Los resultados muestran la importancia de realizar trabajos locales acerca de la biología de especies de importancia comercial.

Se encontró que la temperatura y radiación solar tienen una correlación positiva con el porcentaje de árboles en floración. Se observó, la mayor parte de flores de *T. bicolor* se encuentra en la copa donde más luz recibe. Al momento de la siembra se debe considerar la disposición de los árboles. Las especies aledañas no deben cubrir las copas de *T. bicolor*, con el objetivo de incrementar la exposición de luz de *T. bicolor* y aumentar producción de flores. En futuras investigaciones se podría estudiar cómo la radiación solar interviene en la inducción floral de la especie. Los resultados son importantes para

determinar los meses donde debe ocurrir la polinización y la cosecha. Estos datos también son útiles para determinar el comportamiento de la especie frente a escenarios de cambio climático en el futuro.

Se registró que entre las restricciones bióticas a la reproducción de *T. bicolor* se encuentran la maleza *O. cf. alveolatus* y el hongo *M. roreri* y que las dos afectan negativamente la producción de frutos. Es importante reducir la presencia de esta planta por medio de métodos manuales o conocer características de esta planta de manera a combatir esta competencia con el cacao blanco. Se recomienda eliminar esta maleza antes de que ocupe más del 60% de la copa del árbol, de lo contrario puede suprimir significativamente la producción de frutos. En relación a la presencia de *M. roreri*, se recomienda controlar este hongo en *T. bicolor*, ya que ocasionó una pérdida del 29% de frutos y a que este también afecta a *T. cacao* [52]. Asimismo, se recomienda considerar el lugar de siembra de *T. bicolor*, alejándolo en lo posible de otras especies del género *Theobroma* para reducir el riesgo de contaminación. La dispersión de las esporas de *M. roreri* ocurre principalmente por viento y lluvia [41], árboles de *T. bicolor* ubicados cerca de cultivos de *T. cacao* dispersan fácilmente la spora de *M. roreri*, pues la mayoría de árboles se encuentran en cultivos (52%).

Para futuras investigaciones se recomienda estudiar otras variables que pueden afectarla productividad, como la edad, la genética, la luminosidad, la humedad, el tipo de suelo entre otros, y calcular cuales son las que afectan más severamente la productividad.

Los resultados muestran la importancia de realizar trabajos locales y a largo plazo, acerca de la biología de especies de importancia comercial.

Referencias

1. TPL. Malvaceae. 2013. Disponible en: <http://www.theplantlist.org/1.1/browse/A/Malvaceae/>
2. Chanco M, Montúfar R, Tye A. Malvaceae. In: Libro Rojo de Plantas Endémicas del Ecuador. Publicaciones del Herbario QCA, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito. [Internet]. 2017 [cited 12 Feb 2020]. Disponible en: <https://bioweb.bio/floraweb/librorojo/ListaEspeciesPorFamilia/500283>
3. Cuatrecasas J. Cacao and its Allies A taxonomic revision of the genus Theobroma. Natl Herb. 1964;35: 379–607. Disponible en: <https://repository.si.edu/handle/10088/27110?show=full>
4. Richardson JE, Whitlock BA, Meerow AW, Madriñán S. The age of chocolate: a diversification history of Theobroma and Malvaceae. Front Ecol Evol. 2015;3: 1–14. doi:10.3389/fevo.2015.00120
5. GBIF. GBIF.org. 2020. Disponible en: [https://doi.org/10.15468/dl.vjk22s%0ALicense Unspecified](https://doi.org/10.15468/dl.vjk22s%0ALicense%20Unspecified)
6. Quintero M, Morales K. El mercado mundial de cacao. Rev Agroaliment. 2004;10: 48–60. doi:10.1242/jeb.020073
7. Otzoy Mynor. Evaluación de la variabilidad y preservación de parientes silvestres de cacao (*Theobroma bicolor*) y (*Theobroma angustifolium*) provenientes de la región suroccidental de Guatemala. Guatemala; 2012.
8. Pugliese AG, Tomas-Barberan FA, Truchado P, Genovese MI. Flavonoids, proanthocyanidins, vitamin C, and antioxidant activity of theobroma grandiflorum (Cupuassu) pulp and seeds. J Agric Food Chem. 2013;61: 2720–2728. doi:10.1021/jf304349u
9. Muñoz G-V, 1. Muñoz G-V, Garwood N, Bass M, Navarrete H. Árboles comunes de yasuni. Quito, Ecuador: Pontificia Universidad Católica del Ecuador; 2016. Garwood N, Bass M, Navarrete H. Árboles comunes de yasuni. Quito, Ecuador: Pontificia Universidad Católica del Ecuador; 2016.
10. Bruni R, Bianchini E, Bettarello L, Sacchetti G. Lipid composition of wild Ecuadorian *Theobroma subincanum* Mart. seeds and comparison with two varieties of *Theobroma cacao* L. J Agric Food Chem. 2000;48: 691–694. doi:10.1021/jf991015n
11. Aikpokpodion P. Phenology of flowering in cacao (*Theobroma cacao*) and its related species in Nigeria. African J Agric Reseach. 2012;7: 3395–3402. doi:10.5897/ajar11.1608
12. Kufer J, McNeil C. The jaguar tree (*Theobroma bicolor* Bompl.) A Cultural History of Cacao. Cameron Mc. Chocolate in Mesoamerica. Cameron Mc. Gainesville: University Press of Florida; 2006. pp. 90–104.
13. Gálvez-Marroquín L, Reyes-Reyes A, Avendaño-Arrazate C, Hernández-Gómez E, Mendoza-Lopez A, Díaz-Fuentes V. Pataxte (*Theobroma bicolor* Humb. & Bonpl.): Especie subutilizada en México. Agroproductividad. 2016;9: 41–47. Disponible en: <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=fap&AN=113010064&site=ehost-live>
14. Sandoval C. Conocimiento ecológico tradicional asociado a la elaboración del Siaab g'ez, bebida tradicional de la comunidad zapoteca de Teotitlán del Valle, Oaxaca, México. Universidad Politécnica de Cataluña Barcelonatech. 2017. Disponible en: <http://uoc.summon.serialssolutions.com/2.0.0/link/0/eLvHCXMwY2AwNtlz0EUrE5Itk5MtTJIMkoDN>

B2PjNLNEE2C9Z2GaamJulmxgnJwMHv4w8faxCHSyCEOcMARstEHiQS-
5TK80H3LvV0piZnGlvi9MSj_A0yUeflyLmZGRfkZJbo6pPvikQT0QmxnYHbOwYGFgdXf08vABH_OI21sPK
ifdBbn4QJfDFacqQBetCzEwpRaLMEi

15. Melgarejo ML, Hernández MS, Barrera JA, Carrillo M. *Theobroma*. 2006.
16. Mantilla L, Piñeres R, Fonseca D. *Colombia Frutas de la amazonia*. Bogotá, Colombia: Instituto Sinchi; 2008. doi:10.1111/ajd.12044
17. González A, Torres G. *Manual Cultivo de Macambo*. 2010; 44.
18. Peñuela-Mora M, Schwarz A, Monteros A, Zurita-Benavides M, Cayapa R, Romero N. *Guía de la Agrobiodiversidad Tres comunidades kichwa: Atacapi, Alto Tena y Pumayacu*. Quito, Ecuador: Universidad Regional Amazónica Ikiam; 2016.
19. Sotelo A, Alvarez RG. Chemical Composition of Wild *Theobroma* Species and Their Comparison to the Cacao Bean. *J Agric Food Chem*. 1991;39: 1940–1943. doi:10.1021/jf00011a009
20. USDA. FoodData Central. 2020 [cited 10 Apr 2020]. Disponible en: <https://fdc.nal.usda.gov/fdc-app.html#/?query=>
21. FDA. Daily Value and Percent Daily Value : Changes on the New Nutrition and Supplement Facts Labels Daily Value Updates May Affect % Daily Value. 2020.
22. Sifuentes M. Evaluación físico-química de la pulpa y semilla de dos morfotipos del fruto de macambo "*Theobroma bicolor* (Humb. & Bompl.)" de la región Loreto, 2015. Universidad nacional de la Amazonia Peruana. 2017.
23. INC. Nuts & Dried Fruits, Global statistical review, 2015 / 2016. Int Nut Dried Fruit Counc Found. 2016; 1–179. Disponible en: <http://www.nutfruit.org/wp-content/uploads/2016/05/Global-Statistical-Review-2015-2016.pdf>
24. Moza MK, Bhatnagar AK. Plant reproductive biology studies crucial for conservation. *Curr Sci*. 2007;92: 1207.
25. Ayasse M, Arroyo J. Pollination and plant reproductive biology. *Plant Biol (Stuttg)*. 2011;13 Suppl 1: 1–6. doi:10.1111/j.1438-8677.2010.00414.x
26. Percival M. *Floral Biology*. Second. New York: Robert Maxwell; 1965.
27. Debener T. Inheritance of Characteristics ☆. *Ref Modul Life Sci*. 2017; 1–8. doi:10.1016/b978-0-12-809633-8.05047-0
28. Smitha GR, Thondaiman V. Reproductive biology and breeding system of *Saraca asoca* (Roxb.) De Wilde: a vulnerable medicinal plant. *Springerplus*. 2016;5. doi:10.1186/s40064-016-3709-9
29. Gan X, Cao L, Zhang X, Li H. Floral biology, breeding system and pollination ecology of an endangered tree *Tetracentron sinense* Oliv. (Trochodendraceae). *Bot Stud*. 2013;54: 1–9. doi:10.1186/1999-3110-54-50
30. Young AM, Erickson EH, Strand MA, Erickson BJ. Pollination biology of *Theobroma* and *Herrania* (Sterculiaceae)—I. *Floral Biology*. *Int J Trop Insect Sci*. 1987;8: 151–164. doi:10.1017/s1742758400007153
31. Arenas-De-souza MD, Rossi A, Varella T, Silveira G, Souza S. Receptividad estigmatica e viabilidad

- polínica em *Theobroma subincanum* Mart.: Especie frtífera da região amazônica. *Rev Bras Frutic.* 2016;38. doi:10.1590/0100-29452016757
32. de Souza MS, Venturieri GA. Floral biology of cacao (Theobroma speciosum, Malvaceae). *Brazilian Arch Biol Technol.* 2010;53: 861–872. doi:10.1590/s1516-89132010000400016
 33. Cruden R. Pollen-ovule ratios: A conservative indicator of breeding systems in flowering plants. *Evolution (N Y).* 2000; 32–46.
 34. Vera-Chang J, Cabrera-Verdezoto R, Morán-Morán J, Neira-Rengifo K, Haz-Burgos R, Vera-Barahona J, et al. Evaluación de tres métodos de polinización artificial en clones de cacao (*Theobroma cacao* L .) CCN-51 Evaluation of three methods of artificial pollination in clones. *Idesia.* 2016;34: 35–40. doi:10.4067/S0718-34292016005000033.36
 35. Shivanna K, Sawhney V. *Pollen Biotechnology for Crop Production and Improvement.* New York: Cambridge University Press; 1997.
 36. Venturieri GA. Flowering levels, harvest season and yields of cupuassu (*Theobroma grandiflorum*). *Acta Amaz.* 2011;41: 143–152. doi:10.1590/s0044-59672011000100017
 37. Chmielewski F. Phenology and agriculture. *Phenology: An Integrative Environmental Science.* Netherlands; 2003. pp. 505–522.
 38. Forbes S, Northfield T. Increased pollinator habitat enhance cacao fruit set and predator conservation. *Ecol Appl.* 2016;27: 887–899. doi:https://doi.org/10.1002/eap.1491
 39. Ghersa C. Agroecological Basis for Managing Biotic Constraints. In: Christou P, Savin R, Costa-Pierce BA, Misztal I, Whitelaw B, editors. *Sustainable Food Production.* New York; 2013. Disponible en: <https://link.springer.com/referencework/10.1007/978-1-4614-5797-8>
 40. Bridgemohan P, Mohammed M. *The Ecophysiology of Abiotic and Biotic Stress on the Pollination and Fertilization of Cacao (Theobroma cacao L.; formerly Sterculiaceae family).* IntechOpen. 2019. doi:http://dx.doi.org/10.5772/57353
 41. Rodríguez E, Vera A. Identificación y manejo de la pudrición parda de la mazorca (*Phytophthora* sp.) en cacao. Identificación y manejo de la pudrición parda de la mazorca (*Phytophthora* sp.) en cacao. Bogotá, Colombia; 2015. doi:10.21930/978-958-740-197-4
 42. Álvarez JC, Martínez SC, Coy J. Estado de la moniliasis del cacao causada por *Moniliophthora roreri* en Colombia. *Acta Agron.* 2014;63: 388–399. doi:10.15446/acag.v63n4.42747
 43. Ploetz R. Cacao Diseases: Important Threats to Chocolate Production Worldwide. *Phytopathology.* 2007; 1664–1669. doi:10.1094/PHP-2001-0709-01-RV
 44. Venegas F, Muñoz R. *Malezas tropicales del litoral ecuatoriano.* Quevedo, Ecuador; 1984. Disponible en: [http://repositorio.iniap.gob.ec/bitstream/41000/1599/1/Comunicación Técnica Nº 9.pdf](http://repositorio.iniap.gob.ec/bitstream/41000/1599/1/Comunicación_Técnica_Nº_9.pdf)
 45. Zamora N. Flora digital de la selva (Loranthaceae). 2006; 1–7.
 46. Soria D. Indução da produção em cacauzeiro com uso de atomizador motorizado portátil na Bahia, Brasil. *Rev Theobroma.* 1974;4: 3–13. doi:10.1017/CBO9781107415324.004
 47. Santos RC, Pires JL, Correa RX. Morphological characterization of leaf, flower, fruit and seed traits among Brazilian *Theobroma* L. species. *Genet Resour Crop Evol.* 2012;59: 327–345.

- doi:10.1007/s10722-011-9685-6
48. Rondón JB, Campos L. Revisión taxonómica del género *Theobroma* (Sterculiaceae) en Venezuela. *Acta Botánica Venez.* 2005;28. Disponible en: <http://www.redalyc.org/resumen.oa?id=86228107>
 49. Wetzstein HY, Yi W, Porter JA, Ravid N. Flower position and size impact ovule number per flower, fruit set, and fruit size in pomegranate. *J Am Soc Horticult Sci.* 2013;138: 159–166.
doi:10.21273/JASHS.138.3.159
 50. Fick SE, Hijmans RJ. WorldClim 2: new 1-km spatial resolution climate surfaces for global land areas. *Int J Climatol.* 2017;37: 4302–4315. doi:10.1002/joc.5086
 51. Evans HC. Witches' broom disease of cocoa (*Crinipellis perniciosa*) in Ecuador. *Ann Appl Biol.* 1978;89: 185–192. doi:10.1111/j.1744-7348.1978.tb07689.x
 52. Cuéllar AS, Daza MAH, León CHR, Tobón YMS, Guzmán MNN, Rodríguez DFC. Reacción a *Moniliophthora roreri* en *Theobroma* spp. en Caquetá, Colombia. *Summa Phytopathol.* 2015;41: 183–190. doi:10.1590/0100-5405/2026
 53. Imlakesh. Macambo. 2019. Disponible en: <https://imlakeshorganics.com/products/macambo/>
 54. Canopy Sur. Canopy Sur. 2018 [cited 2 Feb 2020]. Disponible en: <http://canopybridge.com/members/canopysur/profile/>
 55. Venturieri G, Ribeiro A. A Polinização Manual do Cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum*). *Acta Amaz.* 1995;25: 181–191. doi:10.1590/1809-43921995253192
 56. Peterson R, Slovin JP, Chen C. A simplified method for differential staining of aborted and non-aborted pollen grains. *Int J Plant Biol.* 2010;1: 66–69. doi:10.4081/pb.2010.e13
 57. Guerrero NR, Quintero MAO, Naranjo JCP. Determinación del Área Foliar en Fotografías Tomadas con una Cámara Web, un Teléfono Celular o una Cámara Semiprofesional. *Rev Fac Nac Agron.* 2012;65: 6399–6405. Disponible en: <http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/refame/article/view/30766/38180>
 58. Jones GD. Pollen analyses for pollination research, unacetolyzed pollen. *J Pollinat Ecol.* 2012;9: 96–107. doi:10.26786/1920-7603(2012)15
 59. Dafni A. Stigma receptivity. *Pollination Ecology A Practical Approach.* New York: Oxford University Press; 1992. pp. 78–82.
 60. Dafni A, Firmage D. Pollen viability and longevity: Practical, ecological and evolutionary implications. *Plant Syst Evol.* 2000;222: 113–132. doi:10.1007/BF00984098
 61. Team RC. R: A Language and Environment for Statistical Computing. Viena, Austria; 2019. Disponible en: <https://www.r-project.org/>
 62. Adjaloo MK, Oduro W, Banful BK. Floral Phenology of Upper Amazon Cocoa Trees: Implications for Reproduction and Productivity of Cocoa. *ISRN Agron.* 2012;2012: 1–8. doi:10.5402/2012/461674
 63. Santos RC, Pires JL, Correa RX. Morphological characterization of leaf, flower, fruit and seed traits among Brazilian *Theobroma* L. species. *Genet Resour Crop Evol.* 2012;59: 327–345.
doi:10.1007/s10722-011-9685-6
 64. Moreno Y, Melgarejo L, Hernández M, Quintero L, Vargas G. Caracterización molecular de un banco

- de germoplasma del género *Theobroma* mediante la técnica de RAPD. *Rev Colomb Biotecnol.* 2004;6: 15–24.
65. O’Doherty D, Zoll J. *Forcipomyia hardyi* (Diptera: Ceratopogonidae), a Potential Pollinator of Cacao (*Theobroma cacao*) Flowers in Hawaii. 2012.
 66. Alvarado A, Carrera M, Morante J. Importancia de la Mosquilla *Forcipomyia* Spp. en la Polinización y Producción de Cultivo de Cacao. *Rev DELOS Desarro Local Sosten.* 2018. Disponible en: <https://www.eumed.net/rev/delos/33/cultivo-cacao.html>
 67. Esteves PR, Magalhães M, Amaral F, Ramos P, Santos I, Ahnert D. Performance polínica em cacauzeiros (*Theobroma cacao* L.) autocompatíveis e autoincompatíveis. *Rev Bras Bot.* 2009;32: 617–620. doi:10.1590/s0100-84042009000300019
 68. Calzavara B, Müller C, Kahwage O. Tropical fruticulture: cupuassu. Cultivation, processing and fruit. Belen, Brazil; 1984.
 69. Dueñas-Gómez H. Sinopsis de las Loranthaceae de Colombia. *Caldasia.* 2001;23: 81–99.
 70. Press M, Scholes J, Watling J. Parasitic plants: physiological and ecological interactions with their hosts. *Physiological Plant Ecology: 39th Symposium of the British Ecological Society.* Cambridge University Press; 2002. p. 175.
 71. García León MM, Martínez Izquierdo L, Mello FNA, Powers JS, Schnitzer SA. Lianas reduce community-level canopy tree reproduction in a Panamanian forest. *J Ecol.* 2018;106: 737–745. doi:10.1111/1365-2745.12807
 72. Poorter H, Nagel O. The role of biomass allocation in the growth response of plants to different levels of light, CO₂, nutrients and water: a quantitative review. *Aust J Plan Physiology.* 200AD;27.
 73. Leandro M. Biology and epidemiology of *Moniliophthora roreri*, causal agent of *Moniliophthora* pod rot of cacao. Tropical agricultural research and higher education center. 2017.