

**INSTITUTO TECNOLÓGICO DE COSTA RICA
ESCUELA DE BIOLOGÍA
INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

**Informe de
Trabajo Final de Graduación**

**ESTABLECIMIENTO DE UN SISTEMA DE PROPAGACION
VEGETATIVA DE GENOTIPOS SUPERIORES DE CACAO
(*Theobroma cacao* L.) POR MEDIO DE RAMILLAS EN EL CATIE**

Allan Mata Quirós

Cartago, 2006

**ESTABLECIMIENTO DE UN SISTEMA DE PROPAGACION
VEGETATIVA DE GENOTIPOS SUPERIORES DE CACAO
(*Theobroma cacao* L.) POR MEDIO DE RAMILLAS EN EL CATIE**

Allan Mata Quirós*

RESUMEN

El cultivo de cacao (*Theobroma cacao* L.), a pesar de su importancia en la economía de distintos países en el mundo, se ha visto limitado por el bajo potencial de los materiales, la poca adaptación a las condiciones ambientales y la alta incidencia de enfermedades como la moniliasis. Por esta razón, se desarrolla en el CATIE desde 1996, el Programa de Mejoramiento Genético de Cacao con el objetivo de seleccionar genotipos superiores de alta producción, calidad y resistencia a enfermedades.

Se requiere, por lo tanto, contar con un método de propagación rápido y eficiente que permita conservar las características genéticas del material; y el método de ramillas constituye una interesante opción.

Los objetivos de la investigación fueron establecer un sistema de propagación vegetativa mediante ramillas de genotipos superiores de cacao y determinar los sustratos, condiciones de sombreado y tipos de explante con mayor efectividad en el enraizamiento de las ramillas.

Para la obtención de las ramillas, se utilizó material vegetativo de clones sembrados en macetas y en el campo. Se colectaron fragmentos de ramas con crecimiento plagiotrópico, se prepararon explantes apicales y segmentos intermedios con cuatro y dos hojas cortadas respectivamente y se aplicó AIB (6 000 ppm) en la base. Luego se sembraron en tubetes con sustrato estéril, los cuales se colocaron en un propagador de cemento. Se probaron diferentes clones, tipos de explante, niveles de sombra, aplicación de la hormona y sustratos. Se evaluaron algunas variables como área de hoja afectada, severidad del daño de la hoja, sobrevivencia de hojas y explantes

vivos entre otras, siguiendo un diseño experimental de bloques completos al azar.

Se observó que las condiciones de alta exposición solar, junto con una deficiencia en la disponibilidad de agua dificultan la sobrevivencia, al igual que los altos niveles de sombra, pues favorecen el daño de las hojas y la defoliación, lo cual es determinante de la sobrevivencia de los explantes en condiciones de vivero. Por tanto, se determinó que las condiciones que más favorecen la propagación del cacao mediante ramillas son: un nivel de sombra cercano al 50% complementado con un régimen de riego de poca intensidad y de alta frecuencia. Por su parte, el sustrato no tuvo ningún efecto en la efectividad del método, mientras que la concentración de AIB utilizada fue efectiva para favorecer la formación de raíces adventicias.

Se determinó que existe diferencia entre los clones de acuerdo a su facilidad de propagación, siendo unos más sencillos como CCN 51, PMCT 58 e ICS 95 y otros de mayor dificultad como CATIE R6, UF 273 Tipo 1 y CC 137.

Los resultados prueban que la propagación vegetativa por medio de ramillas es un método confiable y efectivo para la obtención de plantas de cacao, además brinda la posibilidad de conservar los caracteres de interés de los genotipos seleccionados.

*MATA, A. 2006. Establecimiento de un sistema de propagación vegetativa de genotipos superiores de cacao (*Theobroma cacao* L.) por medio de ramillas en el CATIE. Informe de Trabajo Final de Graduación. Escuela de Biología. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Cartago, CR. 104 p.

**ESTABLECIMIENTO DE UN SISTEMA DE PROPAGACION
VEGETATIVA DE GENOTIPOS SUPERIORES DE CACAO
(*Theobroma cacao* L.) POR MEDIO DE RAMILLAS EN EL CATIE**

**Informe presentado a la Escuela de Biología del
Instituto Tecnológico de Costa Rica como requisito parcial
para optar al título de Bachiller en Ingeniería en Biotecnología**

Miembros del Tribunal

**Ana Abdelnour Esquivel, Ph.D.
Profesora Asesora ITCR**

**Wilbert Phillips Mora, Ph.D.
Asesor CATIE**

**MAP. Jaime Brenes Madriz
Lector**

DEDICATORIA

A mis padres y a mis hermanos por su amor,
paciencia y apoyo durante mis estudios.

A Feli, por su dedicación y entrega,
y porque desde el cielo seguirá siendo
una luz que me guiará eternamente.

Allan

AGRADECIMIENTOS

Agradezco eternamente a Dios por darme la oportunidad de alcanzar esta gran meta y guiarme para hacer las cosas de la mejor manera.

A mis padres, mis hermanos y toda mi familia por darme la vida, por su constante apoyo, por darme tanto amor y por enseñarme a luchar para alcanzar el éxito, pues sin ellos no hubiese podido llegar hasta aquí.

A mi tía Feli, por ser parte de mi vida y por quererme como una madre, por su amor y entrega. Por ser mi ángel que me acompaña en todo momento e impulsarme para la realización de mis sueños.

Mi más sincero agradecimiento a mis profesores asesores Wilbert Phillips Mora, Ph.D. y Ana Abdelnour Esquivel, Ph.D., por su ayuda y sus consejos para la realización de esta investigación, por su colaboración y por dedicarme parte de su valioso tiempo guiándome en la preparación del manuscrito y al MAP. Jaime Brenes Madriz por la revisión del mismo.

Al personal de la Unidad de Biotecnología del CATIE, especialmente a los compañeros del Programa de Mejoramiento Genético de Cacao: Antonio Mora, Adriana Arciniegas, Carlos Astorga, Aldo Sánchez, Maritza Loaiza, José Castillo y Mariela Leandro por su colaboración y por compartir conmigo esta bonita experiencia en el CATIE.

A los compañeros obreros de la Finca La Montaña, por su aprecio, amabilidad y atenta colaboración durante mi pasantía en el CATIE.

A la Escuela de Biología del ITCR, a mis compañeros y amigos, por ser parte importante de mi vida de estudiante universitario.

A todas las personas que de una u otra forma me brindaron su ayuda, muchas gracias!.

“Unirse es un comienzo; seguir unidos es progresar y trabajar unidos es tener éxito”

Henry Ford

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN.....	i
DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTOS.....	v
ÍNDICE GENERAL.....	vi
ÍNDICE DE CUADROS.....	viii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	x
ÍNDICE DE ANEXOS.....	xi
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. REVISIÓN DE LITERATURA	4
2.1 Aspectos generales del cacao	4
2.1.1 Descripción botánica.....	4
2.1.2 Principales enfermedades	6
2.2 Propagación del cacao	9
2.2.1 Propagación sexual	9
2.2.2 Propagación asexual	10
a. Propagación asexual in vitro.....	11
b. Propagación asexual ex vitro.....	12
2.3 Propagación asexual por ramillas.....	13
2.4 Factores que afectan la propagación por ramillas	15
a. Sombra	15
b. Humedad relativa	16
c. Temperatura	16
d. Sustrato	17
e. Reguladores de crecimiento.....	18
f. Riego	18
g. Material vegetal	19
OBJETIVOS.....	21
Objetivo general.....	21
Objetivos específicos.....	21
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
3.1 Ubicación del ensayo.....	22
3.2 Material vegetal experimental.....	22
3.2.1 Manejo del material vegetal.....	23
3.2.2 Preparación y siembra del material.....	23
3.3 Descripción del propagador.....	25
a. Estructura de cemento.....	27
b. Estructura aérea	28
c. Sistema de riego.....	28
d. Cobertura de sombra.....	28
3.4 Metodología	29
3.4.1 Primera fase: Ensayos previos	30
Prueba N°1. Evaluación de sombra y clones.....	30
Prueba N°2. Evaluación de sombra y aplicación de riego	30

Prueba N°3. Evaluación de sombra y aplicación de hormona	31
Prueba N°4. Evaluación de sombra y riego	31
Prueba N°5. Evaluación de clones	32
Prueba N°6. Evaluación de clones y sustratos	32
3.4.2 Segunda fase: Experimentos formales	33
Ensayo N°1. Evaluación de clones y sustratos.....	33
Ensayo N°2. Evaluación de sombra y clones	34
Ensayo N°3. Evaluación de sombra, clones y tipo de explante	34
3.4.3 Diseño estadístico	35
3.5 Variables evaluadas.....	35
a. Área de hoja afectada.....	35
b. Severidad del daño de la hoja	36
c. Sobrevivencia de hojas.....	38
d. Explantes vivos.....	38
e. Incidencia según daño en hoja	38
3.6 Análisis de resultados	38
4. RESULTADOS	39
4.1 Ensayos previos	39
Prueba N°1. Evaluación de sombra y clones.....	39
Prueba N°2. Evaluación de sombra y aplicación de riego	39
Prueba N°3. Evaluación de sombra y aplicación de hormona	41
Prueba N°4. Evaluación de sombra y riego	42
Prueba N°5. Evaluación de clones	43
Prueba N°6. Evaluación de clones y sustratos	45
4.2 Experimentos formales	47
Ensayo N°1. Evaluación de clones y sustratos.....	47
Ensayo N°2. Evaluación de sombra y clones	51
Ensayo N°3. Evaluación de sombra, clones y tipo de explante	55
5. DISCUSIÓN.....	64
6. CONCLUSIONES	72
7. RECOMENDACIONES.....	75
8. BIBLIOGRAFÍA.....	77
ANEXOS	83

ÍNDICE DE CUADROS

Número	Título	Página
1	Adaptaciones realizadas en el sistema de propagación en la Finca La Montaña, Turrialba, durante el desarrollo del experimento en los meses de junio a diciembre.	27
2	Porcentaje de explantes con hojas sanas de dos clones de cacao propagados por ramillas en dos tratamientos diferentes a los 5, 18 y 30 días después de la siembra.	43
3	Área de hoja dañada, sobrevivencia de hojas y explantes vivos de cuatro clones de cacao propagados por ramillas en cuatro sustratos 15 días después de la siembra.	48
4	Área de hoja dañada, sobrevivencia de hojas y explantes vivos de cuatro clones de cacao propagados por ramillas en cuatro sustratos 30 días después de la siembra.	49
5	Promedios de área de hoja dañada de cuatro clones de cacao propagados por ramillas desde los 5 hasta los 30 días después de la siembra.	50
6	Área de hoja dañada, incidencia según daño en hoja, sobrevivencia de hojas y explantes vivos de dos clones de cacao propagados por ramillas en cuatro niveles de sombra 15 días después de la siembra.	52
7	Área de hoja dañada, incidencia según daño en hoja, sobrevivencia de hojas y explantes vivos de dos clones de cacao propagados por ramillas en cuatro niveles de sombra 30 días después de la siembra.	53
8	Promedios de severidad del daño de la hoja de dos clones de cacao propagados por ramillas en cuatro niveles de sombra 30 días después de la siembra.	55
9	Promedios de área de hoja dañada de dos clones de cacao propagados por ramillas desde los 5 hasta los 30 días después de la siembra.	55

10	Área de hoja dañada, severidad del daño de la hoja, incidencia según daño de hoja, sobrevivencia de hojas y explantes vivos de cinco clones de cacao propagados por ramillas en cuatro niveles de sombra 15 días después de la siembra.	57
11	Promedios de severidad del daño de la hoja de cinco clones de cacao propagados por ramillas en cuatro niveles de sombra 15 días después de la siembra.	59
12	Área de hoja dañada, severidad del daño de la hoja, incidencia según daño de hoja, sobrevivencia de hojas y explantes vivos de cinco clones de cacao propagados por ramillas en cuatro niveles de sombra 30 días después de la siembra.	61
13	Promedios de área de hoja dañada de cinco clones de cacao propagados por ramillas desde los 5 hasta los 30 días después de la siembra.	63

ÍNDICE DE FIGURAS

Número	Título	Página
1	Rama de cacao con crecimiento plagiotrópico utilizada en la propagación	23
2	Tipos de explantes utilizados para la propagación de cacao.	24
3	Aplicación de la hormona AIB 6 000 ppm en la base del explante.	24
4	Bandeja plástica con tubetes utilizada para la siembra de ramillas.	25
5	Diseño del propagador de cacao ubicado en la Finca La Montaña, Turrialba.	26
6	Coberturas de sombra utilizadas en el área experimental para los ensayos en la Finca La Montaña, Turrialba.	29
7	Escala de evaluación de acuerdo al porcentaje de área de las hojas afectado.	36
8	Escala de evaluación de acuerdo al grado de daño de las hojas.	37
9	Formación de raíces en las ramillas dos meses después de su siembra en el propagador.	40
10	Desarrollo de plántulas de cacao obtenidas mediante el método de ramillas, dos meses después de su trasplante a condiciones de vivero.	46
11	Porcentajes de sobrevivencia a los 30 días de cuatro clones de cacao propagados por ramillas en cuatro sustratos diferentes.	50
12	Porcentajes de sobrevivencia de explantes de cacao a los 30 días de acuerdo al nivel de sombra utilizado.	54
13	Porcentajes de sobrevivencia a los 30 días de cinco clones de cacao propagados por ramillas en un sistema abierto bajo la sombra del sarán del vivero al 50%.	60

ÍNDICE DE ANEXOS

Número	Título	Página
1	Resultado del análisis químico de la composición del abono orgánico Juan Viñas utilizado en la preparación de sustrato.	84
2	Resultados del análisis de varianza de los experimentos formales para la variable área de hoja afectada desde los cinco hasta los 30 días de siembra.	85
3	Resultados de la prueba no paramétrica Friedman de los experimentos formales para la variable severidad del daño de la hoja afectada a los 15 y 30 días de la siembra.	101

1. INTRODUCCIÓN

El cacao (*Theobroma cacao* L.) es un cultivo de gran importancia económica en distintos países del mundo. La producción mundial de cacao en grano para el período 2004-2005 fue de 3 289 000 toneladas, siendo Costa de Marfil el principal productor con 1 273 000 toneladas (ICCO 2006). En América se concentra el 13,5% de la producción mundial, siendo Brasil el mayor productor con 171 000 toneladas.

El cultivo del cacao se ha visto limitado por el bajo potencial de los materiales sembrados, la poca adaptación a las condiciones ambientales de las zonas cacaoteras y la alta incidencia de enfermedades fungosas, por lo que la producción mundial se ha caracterizado por períodos de contracción, seguidos de períodos de estabilización y luego de rápida expansión. En los países productores de América, las enfermedades con mayor presencia son la moniliasis (*Moniliophthora roreri*), la escoba de bruja (*Moniliophthora perniciosa*) y la mazorca negra (*Phytophthora palmivora*), las cuales han provocado pérdidas de entre un 45% y 100% durante todo el ciclo productivo (CCI 2001).

Motivados por la necesidad de minimizar la magnitud del problema y por la trascendencia del cultivo en la economía mundial, en varios centros de investigación en el mundo se han hecho esfuerzos para seleccionar material resistente a estas enfermedades. Tal es el caso del CATIE, donde con el apoyo de WFC (World Cocoa Foundation) y USDA (United States Department of Agricultura) se está desarrollando desde 1996 un Programa de Mejoramiento Genético tendiente a seleccionar genotipos superiores con características de alta producción y calidad industrial, así como de resistencia a enfermedades principalmente la moniliasis, la cual constituye una de las mayores limitantes en los países de Centro y Sudamérica.

Mediante este programa, se han seleccionado materiales superiores por su resistencia, producción, precocidad y vigor; además se han identificado

algunos materiales que en condiciones de alta presión de inóculo, superan en gran medida la producción de genotipos internacionales (Phillips-Mora 2003).

Generalmente, los programas de mejoramiento genético involucran varios pasos, tales como el manejo del germoplasma, su caracterización y evaluación, el desarrollo de herramientas de mejoramiento genético, estudios genéticos, la creación y selección de variedades y la multiplicación y distribución del material mejorado (Eskes 2001). No obstante, los programas tradicionales de multiplicación se basan en la reproducción sexual, lo cual trae como consecuencia la segregación de los caracteres y por ende la pérdida de las características deseadas (Paredes *et al.* 2003). De realizarse la propagación de los materiales de manera sexual, las plantas obtenidas serían altamente heterocigotas debido a que las semillas son producidas por polinización cruzada entre padres muy heterocigotos.

En ningún material vegetal es posible fijar indefinidamente los caracteres por métodos de reproducción sexual, ya que resulta muy difícil repetir la combinación de gametos que dan origen al genotipo, por lo que la propagación asexual o vegetativa es el único procedimiento que ofrece la posibilidad de conservar genotipos superiores mediante la obtención de clones con las mismas características que la planta madre, no obstante, los diferentes procedimientos presentan variaciones a nivel de eficiencia, rendimientos, costos y requerimiento de condiciones (Chanatásig 2004).

En síntesis, una vez que se detecta un genotipo valioso, se debe contar con un método que garantice su propagación eficiente, conservando las características genéticas del material en toda su descendencia. La injertación, la propagación por estacas y los acodos son los métodos que han sido más usados en cacao. Además, para la conservación de las colecciones de germoplasma, también es fundamental contar con un método de propagación asexual eficiente, dado que en la mayoría de los casos, los materiales se conservan de forma clonal.

El método de propagación más usado son los injertos de parche, el cual presenta algunos inconvenientes como una efectividad a veces muy baja, altos costos de producción debido a la cantidad de sustrato usado, los costos de mantenimiento en el vivero y del transporte de las plantas del vivero al sitio de siembra, por lo que surge la necesidad de contar con una metodología más rápida, barata y eficiente para la multiplicación de las plantas.

El sistema de ramillas ha mostrado en países como Brasil (Palacios y Monteiro 2001; Faria y Sacramento 2003) y en menor escala en Ecuador (SICA s.f.) ser más eficiente y barato, por lo que constituiría una interesante opción en Costa Rica que amerita ser probada de acuerdo a las condiciones presentes.

Además de todos los alcances prácticos que el desarrollo de una biotecnología como esta podría tener al permitir multiplicar genotipos superiores de cacao en forma más veloz y eficiente, desde el punto de vista experimental, su desarrollo también es de importancia, pues permitiría valorar mejor la frecuencia e impacto de la variación somaclonal que se ha observado en algunos países en plantas propagadas mediante embriogénesis somática, una técnica que actualmente está en desarrollo en CATIE pero de la cual aún se desconocen muchos aspectos (Chanatásig 2004).

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Aspectos generales del cacao

El género *Theobroma* es originario de la cuenca alta del río Amazonas que comprende países como Colombia, Ecuador, Perú, Bolivia y Brasil, siendo en esta región donde la especie *Theobroma cacao* presenta la mayor variación. No obstante, su cultivo se dio en tiempos precolombinos desde México hasta Costa Rica, aunque no está claro si su expansión se dio de manera natural o con la ayuda del hombre. Gracias a un importante movimiento transoceánico de germoplasma, en la actualidad es cultivado en las regiones húmedas de ambos hemisferios. En estado natural, se encuentra en los pisos inferiores de las selvas húmedas de los trópicos, desde los 20° latitud norte hasta los 20° latitud sur y a una altitud por debajo de los 1 250 m.s.n.m. El género *Theobroma* pertenece al orden Malvales y a la familia Malvaceae, posee algunas especies de gran importancia económica como *T. cacao*, así como *T. grandiflorum* y *T. bicolor* en un menor grado. El cacao era considerado por las culturas nativas de la región azteca como el “alimento de los dioses” y además de utilizar sus granos como moneda lo consumían como bebida. A pesar de ser un cultivo estrictamente tropical, se elabora y se consume más en regiones templadas como bebida estimulante y alimento energético; además, su grasa es un subproducto importante en la preparación de cosméticos y productos farmacéuticos (León 2000).

De acuerdo con datos de la World Cocoa Foundation (2006), en la actualidad existen el mundo entre cinco y seis millones de productores de cacao, cuya producción supera las tres millones de toneladas por año mientras demanda ha presentado un 3% de crecimiento anual durante los últimos 100 años.

2.1.1 Descripción botánica

El árbol de cacao alcanza generalmente alturas de 4 a 7 m, aunque en condiciones de crecimiento óptimas de temperatura, viento, agua y suelos

puede crecer aún más. Bajo la sombra de altos árboles forestales alcanza hasta 10 m, mientras en forma silvestre bajo la intensa sombra del bosque primario puede llegar a medir unos 20 m de altura (CCI 2001).

Las plantas provenientes de semilla presentan un hábito de crecimiento dimórfico con brotes ortotrópicos o chupones y ramas plagiotrópicas en abanico que se forman en verticilos terminales con 3 a 6 ramillas, y cuya diferencia es observada principalmente en la filotaxia o disposición de las hojas. El tronco vertical posee una horqueta a una altura de 1 a 1,5 m con la emisión de 3 a 5 ramas laterales, sin embargo, el desarrollo varía dependiendo de las condiciones ambientales.

Por su parte, los árboles de origen vegetativo producidos mediante injertos o estacas tienen una conformación diferente, pues no muestran un eje principal, sino que predomina el crecimiento de ramas laterales en abanico y con varias ramas primarias que crecen en ángulo agudo. El sistema radical está formado por una raíz principal pivotante de varios metros de longitud y un extenso sistema de raíces laterales que se ramifican superficialmente y forman una masa compacta. En el caso de plantas de propagación clonal no existe una raíz pivotante, sino varias principales y gran cantidad de raicillas alimentadoras cerca de la superficie (León 2000).

Las hojas son simples, con un pecíolo corto, enteras de forma oblonga a lanceolada-oblonga, miden de 10 a 12 cm de largo y tienen el ápice muy acuminado, margen entero y ondulado. La superficie de ambas caras es lisa y brillante y de colores variables que van desde morado hasta verde pálido (CONABIO 2004, León 2000).

El cacao es una especie cauliflora, es decir, con sus flores insertadas sobre el tronco o en las viejas ramificaciones sostenidas por un pedicelo de 1 a 3 cm. Las flores son pequeñas, hermafroditas, con coloraciones rosadas, púrpuras o blancas de 0,5 a 1 cm de diámetro y de 2 a 2,5 cm de largo en forma de estrella con 5 pétalos de 6 mm alternos con 5 sépalos angostos y ampliamente extendidos (CONABIO 2004).

El fruto es una baya grande llamado mazorca de 15 a 25 cm de largo y 10 cm de diámetro dentro del cual se encuentran las semillas de color blanco o violetas embebidas en una pulpa mucilaginoso blanca y de sabor dulce y acidulado. Poseen un mesocarpo liso o arrugado con 5 carpelos y de diversos colores al madurar (rojo, amarillo, morado y café). La forma es generalmente elipsoidal, sin embargo varía considerablemente, por lo que ha sido el carácter más utilizado para agrupar poblaciones dentro de la especie. (León 2000; Arciniegas 2005).

El cacao es una planta alógama de ciclo vegetativo perenne y diploide ($2n=20$), generalmente la polinización es entomófila llevada a cabo por individuos del género *Forcipomya*. Por año, una planta produce de 100 000 a 150 000 flores, de las cuales sólo se fecundan entre el 0,1 y 0,3% cuyos frutos maduran de 5 a 6 meses después de la polinización (León 2000; Enríquez 2004).

2.1.2 Principales enfermedades

El trópico húmedo, donde se concentran la mayor cantidad de campos cacaoteros, se caracteriza por presentar condiciones que favorecen el ataque, establecimiento e impacto de los patógenos, principalmente los hongos. Las condiciones que predominan en estas regiones son las tierras de baja altitud y generalmente sombreadas, cálidas (temperatura media anual superior a los 15°C) y de alta humedad (precipitación anual entre 1400-2000 mm) (Enríquez 2004).

A nivel mundial, las enfermedades son el principal factor biótico que limita la producción cacaotera al causar pérdidas entre un 30-40%. En América tropical, la aparición y diseminación de enfermedades fungosas ha sido uno de los factores que más ha desestabilizado la actividad, provocando con frecuencia la destrucción total de la cosecha y el abandono de muchas plantaciones por parte de los agricultores (Phillips-Mora 2003a).

La monilia del cacao es causada por el hongo *Moniliophthora roreri* (Cif) Evans *et al.*, el cual es nativo del trópico de América, donde ha invadido once países, constituyendo uno de los principales obstáculos para la producción de cacao (Phillips-Mora 2003b). En condiciones naturales, el hongo ataca solamente los frutos de cacao y otras especies de los géneros *Theobroma* y *Herrania* de cualquier edad y cuya severidad varía de acuerdo a la zona y época del año según las condiciones climáticas.

Los síntomas de la monilia se presentan generalmente a nivel externo y pueden ser tanto necrosis, caracterizada por la degeneración del protoplasma, seguida por la muerte de las células y los tejidos, como hiperplasia, causada por el aumento en el número de células de los tejidos y que comúnmente es llamado abultamiento o giba, sin embargo, mazorcas entre 60 y 80 días pueden completar su desarrollo sin síntomas externos y mostrar todo el tejido interno necrosado (Reuck 1997; Argüello 2000, Phillips-Mora 2003b).

La mazorca negra del cacao, causada por el hongo *Phytophthora palmivora* y otros hongos del mismo género, es la enfermedad responsable de más pérdidas en las cosechas en todas las áreas cacaoteras del mundo, pues ha causado pérdidas hasta de un 50-60%. Su incidencia varía según las condiciones de precipitación, humedad y temperatura; ataca principalmente el fruto, aunque también destruye hojas, chupones, yemas, raíces, cojines florales y en menos casos los tallos (Enríquez, 2004).

La infección en el fruto puede aparecer como manchas pardas oscuras circulares y se va extendiendo por toda la superficie hasta podrir totalmente la mazorca en unos 10 ó 15 días. Además puede ocasionar cáncer de tronco, necrosis en las hojas y pecíolo y pobredumbre en los botones florales (Arciniegas 2005).

La escoba de bruja, cuyo agente causal es el hongo *Moniliophthora perniciosa* (Aime y Phillips-Mora 2005), es originaria del norte de Sudamérica, donde ha provocado la muerte de muchos cultivos

principalmente en Surinam y Guyana. Esta enfermedad puede ser transmitida tanto por semillas como por las partes vegetativas de las plantas e incluso por la mazorca, ya que el patógeno se establece en tejidos maduros por largos períodos hasta su desarrollo (Aranzazu *et al.* 2000; Aime y Phillips-Mora 2005).

Los síntomas más característicos de esta enfermedad se producen en los terminales de las ramas nuevas, los cuales presentan forma de escoba cuando se desarrollan, aunque éstos varían según el órgano que ataque, ya que puede afectar los brotes vegetativos y cojinetes florales, causando la formación de brotes vegetativos, flores y mazorcas anormales, además de los frutos, donde ataca tejidos meristemáticos en crecimiento activo ocasionando hipertrofia, manchas necróticas en la corteza y endurecimiento de las semillas (Stahel 1915; Purdy y Schmidt 1996).

Otra de las enfermedades ampliamente distribuida en el mundo es el mal del machete, la cual es provocada por el hongo *Ceratocystis fimbriata* y constituye una amenaza para los cultivos de cacao, principalmente en los árboles que atraviesan condiciones de estrés y que presentan lesiones en tronco y ramas por donde penetra el hongo (Enríquez 2004).

De acuerdo con Lass, citado por Chantásig (2004), el hongo puede diseminarse por insectos del género *Xyleborus* que atacan las plantas enfermas y por medio de herramientas contaminadas durante la poda y la cosecha. Los principales síntomas son la marchitez y amarillamiento de las hojas, las cuales se tornan rojizas hasta secarse completamente.

El combate de las enfermedades del cacao puede realizarse mediante la aplicación de productos químicos, no obstante, este método es costoso, ineficaz y puede ocasionar daños en el ambiente. Además se puede recurrir al control biológico con el uso de micoparásitos o bacterias antagonistas, sin embargo estas alternativas requieren de más investigación (Argüello 2000).

Las prácticas culturales como los cultivos mixtos, los sistemas agroforestales, el control de saneamiento dentro del cacaotal y la remoción de frutos

enfermos son también una de las estrategias más utilizadas para el ataque de patógenos del cacao, así como la inclusión a las fincas de material genético tolerante y resistente a diversas enfermedades y a la vez con características de alto rendimiento, calidad y producción (Argüello 2000; FHIA 2003).

2.2 Propagación del cacao

La planta de cacao puede propagarse por vía sexual mediante semillas y de forma asexual, de la cual los métodos más utilizados son las estacas, ramillas, injertos, acodos aéreos y utilizando las técnicas de cultivo *in vitro* por medio de la embriogénesis somática (Paredes 2003, Chanasig 2004) o del microinjerto (Aguilar 1990).

2.2.1 Propagación sexual

La propagación sexual es la forma más utilizada y fácil de reproducir el cacao, la cual puede hacerse plantando la semilla directamente en el campo o sembrándola en un semillero temporal en bolsas plásticas en condiciones de vivero. La siembra directa en el campo, aunque disminuye los costos de transporte de material, dificulta el control de enfermedades, pestes y plagas, mientras que los semilleros son más económicos y fáciles de irrigar durante períodos secos y además es más fácil eliminar plantas pobres o débiles (Paredes 2003).

A pesar de ser la forma más simple de reproducir el cacao, la reproducción sexual tiene la desventaja de presentar una mayor variabilidad en la producción, pues, además de tratarse de una planta alógama, su flor posee una compleja estructura y presenta incompatibilidad entre ciertos tipos, por lo que es posible encontrar variaciones aún entre la descendencia de un mismo fruto, aunque estas limitantes pueden reducirse mediante el uso de semillas mejoradas obtenidas por cruzamientos entre clones seleccionados, que

permiten la obtención de una mayor producción y cierto grado de resistencia a plagas y enfermedades (Paredes 2003; Chanatásig 2004).

Sin embargo, es de suma importancia conocer las relaciones de compatibilidad e incompatibilidad en los distintos genotipos de cacao para el establecimiento de plantaciones comerciales y los trabajos de los programas de mejoramiento genético, ya que el rendimiento y la productividad dependen en muchos casos de los agentes polinizadores, autopolinización y polinización cruzada, los cuales a su vez se ven afectados por factores ambientales como luz, calor y humedad y de la formación del tubo polínico (Arciniegas 2003, Enríquez 2004).

2.2.2 Propagación asexual

Desde que se iniciaron los trabajos de investigación en cacao a finales del siglo XIX, los distintos sistemas de propagación vegetativa han sido una importante herramienta en la multiplicación de genotipos silvestres y cultivados y han permitido la distribución del material, el mantenimiento de colecciones de germoplasma y el establecimiento de ensayos de investigación en campo (Pennsylvania State University 2003). No obstante, desde un punto de vista agronómico, el cacao es reconocido como una especie difícil de propagar vegetativamente, por lo que la clonación del cacao es considerada como una limitante a nivel mundial; razón por la cual se han desarrollado en diferentes centros de investigación diversos estudios para ir perfeccionando las técnicas de reproducción vegetativa disponibles (López-Baez *et al.* 2001).

Como resultado de programas de mejoramiento genético, con la fijación de características de interés en un cultivo determinado, se han producido una cantidad importante de genotipos mejorados, por lo que es de trascendental importancia el mantenimiento del acervo genético constitutivo de los nuevos materiales, de manera que las nuevas plantas producidas posean también los caracteres de la planta madre. Esto es posible mediante métodos de

propagación de partes vegetativas, que al no generar cambios en la constitución genética del material, facilita la producción de clones; sin embargo, una de las mayores limitantes es la falta de métodos de clonación masiva de los mismos (López-Baez *et al.* 2001).

Sin embargo, numerosos factores ambientales tales como el tipo de suelo, drenaje, aireación, contenido de materia orgánica, humedad, temperatura, intensidad de luz, densidad de siembra, reguladores de crecimiento, así como la morfología y el estado del explante utilizado pueden modificar la apariencia y la sobrevivencia de la planta aún sin que ocurran cambios en su constitución genética, por lo que se considera de gran importancia la determinación de estos factores antes de proceder a la propagación y desarrollo de material seleccionado por mejoramiento genético (Paredes 2003).

a. Propagación asexual in vitro

Se han realizado varios ensayos para el establecimiento de métodos no convencionales de propagación vegetativa en cacao por medio de cultivo *in vitro* de tejidos, como el cultivo de ápices, microestacas, yemas axilares, embriones cigóticos, microinjertos y más ampliamente de embriogénesis somática; no obstante, esta tecnología no es aplicada para la multiplicación de material a escala comercial debido a los altos costos de producción, una eficiencia relativamente baja y a la necesidad de perfeccionamiento de la técnica (López-Báez *et al.* 2001, Chantásig 2004).

La embriogénesis somática, una de las más utilizadas, es el procedimiento por medio del cual se obtienen embriones sin la intervención de células gaméticas y presentan una morfología y un desarrollo similares a los embriones sexuales obtenidos por la fecundación, pero a diferencia de éstos, presentan una constitución genética idéntica a la de la planta de origen (López-Báez *et al.* 2001). La necesidad de obtener grandes cantidades de propágulos y materiales de alto rendimiento, ha conducido al desarrollo de

numerosos estudios para determinar la capacidad de formación de embriones de cacao a partir de tejido somático.

Las primeras investigaciones reportan el uso de embriones cigóticos inmaduros como explantes para la obtención de embriones cigóticos, sin embargo, estos no eran capaces de dar origen a una planta completa. Mientras tanto, explantes somáticos como las hojas, las nucelas, el tegumento interno del ovario, los pétalos, los filamentos de las anteras y los estaminodios han permitido mostrar la posibilidad de inducción de tejido con aptitud embriogénica, así como el desarrollo de los embriones somáticos y de plantas con buen desarrollo después del cultivo (López-Báez *et al.* 2001, Chantásig 2004).

b. Propagación asexual ex vitro

Los métodos convencionales más utilizados para la propagación de cacao en forma vegetativa son injerto, acodo, estaca y ramilla.

Injertos: El método de injertación consiste en unir una rama o una yema (injerto) a un patrón o porta injerto que es reproducido por semilla o enraizado, con el objetivo de que el cambium del injerto y del patrón queden en íntimo contacto; de esta manera, los nuevos tejidos provenientes de la división celular de ambos, quedan justamente unidos y permiten el transporte de agua y nutrientes a través de la unión (Palencia y Mejía 2000).

Existen varios tipos de injerto para la propagación de material superior, sin embargo el más recomendado es el de yema, en el que se hace un corte en U en el patrón donde se coloca la yema de forma que los bordes queden unidos lo más exacto posible para evitar oxidaciones de los tejidos. Luego de la unión, se debe proteger con una cinta plástica con una pequeña amarra que sostenga el injerto e impedir que se llene de agua o se dañe y tres semanas más tarde retirarla para determinar si éste está prendido y estimular su desarrollo. Este método de reproducción requiere además de un laborioso trabajo, un cuidado especial, ya que generalmente el crecimiento

es lateral y no terminal, por lo que para obtener una planta lo más erecta posible, se debe contar con un tutor o hacer podas de mantenimiento hasta que la nueva planta esté lista para sembrarse en campo (Palencia y Mejía 2000; Enríquez 2004).

Acodos: Para emplear el sistema de acodos, se seleccionan ramas de abanico, saludables y de mayor edad dentro del árbol o clon seleccionado, donde se hace una pequeña lastimadura o corte alrededor de la rama para remover un anillo de corteza de 0,5 ó 1 cm con el fin de raspar el cambium y exponer el tejido, el cual se cubre con un medio enraizante limpio y húmedo donde se aplican las hormonas para estimular la formación de raíces y luego es recubierto firmemente con plástico amarrado en cada extremo para formar un bulto. Al hacer el corte se presenta una interrupción de la savia elaborada por las hojas, de manera que los nutrientes se acumulan cerca de esta zona y estimula la formación de callo, y por consiguiente, de raíces (Palencia 2000, Enríquez 2004).

El acodo debe permanecer hasta que se observen las raíces por el plástico, lo cual requiere de entre 30 y 40 días, momento en que se debe separar la rama con sumo cuidado para ser trasplantada en una bolsa de polietileno con suelo (CONABIO 2004, Enríquez 2004).

A pesar de que el acodo es un método sencillo, es poco usual para cacao, además no se recomienda practicarlo en forma extensiva ni en fincas productoras grandes, sino solamente en casos especiales debido a que es un método costoso de propagación (Palencia 2000, Enríquez 2004).

2.3 Propagación asexual por ramillas

El método de propagación asexual por medio de estacas o ramillas consiste en la utilización de ramas con hojas adultas sanas y sin flores y cuyas yemas se observen claramente, las cuales son cortadas en el extremo de forma perpendicular y tratadas con fitorreguladores inductores de raíces para la formación de una planta nueva idéntica a la original (Enríquez 2004). Esta

metodología es ampliamente utilizada en Brasil, donde el cacao constituye una de las principales plantas cultivadas, ocupando un área cercana a las 600 000 hectáreas. En este país, la propagación masiva de cacao usando ramillas fue desarrollada en el Estado de Bahia como una estrategia de multiplicación clonal para la recuperación de plantaciones de cacao mediante la sustitución de plantas susceptibles de origen seminal por variedades resistentes a la enfermedad escoba de bruja identificada en la región en 1989 y cuya expansión alcanzó rápidamente proporciones epidémicas en la mayoría de los campos cacaoteros, causando el debilitamiento de las plantas, una significativa disminución en la producción e incluso la muerte de muchos de los árboles (Palacios y Monteiro 2001, Faria y Sacramento 2003). El método de enraizamiento de estacas o ramillas es uno de los métodos más importantes para propagar arbustos ornamentales, especies perennifolias de hoja ancha o de hoja angosta y además es usado ampliamente en la multiplicación comercial de muchas plantas en vivero. El éxito del enraizamiento es posible sólo cuando se selecciona cuidadosamente el material y se prepara en forma adecuada, por lo tanto, requiere de tres pasos principales:

- Selección y manejo de la plantación madre.
- Corte y tratamiento de las estacas o ramillas.
- Siembra de los explantes.

El uso de este sistema de propagación vegetativa representa múltiples ventajas para los productores que se ven en la necesidad de garantizar una alta producción de plantas a escala comercial, de manera que le permite satisfacer la demanda y al mismo tiempo, el establecimiento de nuevas plantaciones. Lima *et al.* (2001) señalan algunas de las ventajas que presenta el sistema sobre otros métodos:

- Las plantas son producidas en menor tiempo que las plantas injertadas.
- Se prescinde del uso de portainjertos, y por tanto los problemas de incompatibilidad entre el injerto y el patrón.

- Es considerado como el método más adecuado para la producción masal e industrial de plantas de cacao en la actualidad.

2.4 Factores que afectan la propagación por ramillas

Existen numerosos factores ecológicos y agronómicos que pueden inducir al éxito o al fracaso en la multiplicación de los nuevos clones, entre los que se encuentran:

a. Sombra

Debido a su comportamiento en el campo, el cacao es considerado como umbrófilo por su preferencia por la sombra; además, estudios realizados demuestran que las plantas tanto de semilla como de reproducción vegetativa crecidas a plena exposición al sol son sensiblemente más pequeñas y presentan una rápida disminución de la producción (Enríquez 2004).

Para la propagación vegetativa mediante ramillas, es recomendable el establecimiento de condiciones de sombra de un 85-95% para estimular la formación de los primordios radiculares que posteriormente crecen para formar las raíces (Palencia 2000). Enríquez (2004) considera necesario contar con una sombra de al menos 60% y cuya intensidad debe ir decreciendo paulatinamente, mientras que Palacios y Monteiro (2001), han obtenido buenos resultados utilizando condiciones de sombra de un 70% durante el período de enraizamiento.

Los requerimientos de sombra durante el proceso de enraizamiento se fundamentan en la necesidad de lograr una tasa adecuada de fotosíntesis en las estacas, ya que la irradiación excesiva provoca el cierre de los estomas, la reducción en el intercambio gaseoso, pérdida de turgencia y la muerte de los explantes. Además, los niveles excesivos de radiación solar favorecen la concentración de carbohidratos, fotodestrucción de las auxinas, cambios en

las relaciones de agua y la concentración de sustancias promotoras o inhibidoras del crecimiento (Mesén 1998, Gutiérrez 2003).

b. Humedad relativa

El ambiente donde se desarrollan las ramillas debe poseer una humedad saturada de un 99% o 100% para evitar la evapotranspiración y a la vez mantener la turgencia de las células de los tejidos foliares (Hernández y Leal 1997, July 2002), condiciones que se logran mediante el uso de sistemas de riego de nebulización, dependiendo de las condiciones climáticas de la zona. Mesén (1998) y Enríquez (2004) consideran suficiente el uso de una cobertura de plástico ajustada para el mantenimiento de la humedad en el interior del propagador, pues de esta forma, el aire se satura en horas de la noche, resultando en la condensación del agua de las hojas y el humedecimiento de las mismas. En otros casos se ha cultivado cacao bajo condiciones de una humedad ambiental cercana al 70% en sistemas abiertos, pero con aplicaciones frecuentes de riego durante los primeros 60 días, que luego va disminuyendo progresivamente durante la aclimatación (Palacios y Monteiro 2001).

c. Temperatura

La temperatura está relacionada tanto con el desarrollo vegetal de la planta como con la floración y la fructificación del cultivo. Asimismo, ejerce un efecto sobre la actividad de las raíces y de los brotes, de manera que las bajas temperaturas disminuyen su actividad y las altas limitan la capacidad de absorción (Paredes 2003).

El control de la temperatura dentro del propagador permite que la tasa fotosintética exceda la tasa de respiración para evitar el marchitamiento de las hojas (Hernández y Leal 1997). La temperatura considerada como la más óptima para la multiplicación por ramillas puede variar en un rango entre 25°C y 30°C (Palencia 2000).

d. Sustrato

Los sustratos se utilizan para el cultivo de plantas en recipientes y cumplen la función de proveer soporte y regular la disponibilidad de agua y nutrientes al sistema radicular de las plantas. La dinámica del agua en éstos es distinta a la del suelo debido a las condiciones presentes por la relación masa-volumen en el interior del recipiente, por lo que las limitaciones de espacio para la formación de raíces exige que el sustrato sea capaz de mantener agua disponible sin comprometer la presencia de oxígeno en el medio (Siqueira y Almeida 2003).

De acuerdo con Braudeau, citado por Paredes *et al.* (2003), cuando el medio de enraizamiento es muy aireado y de insuficiente retención de humedad se forma una costra o cicatriz que recubre la base de la estaca, retardando o impidiendo la rizogénesis, mientras que si la aireación es insuficiente y con excesiva humedad se forman pequeños callos que también afectan el enraizado.

Se han utilizado distintos materiales como vermiculita, aserrín de madera descompuesta, fibra de coco, pulpa de café, cáscara de arroz carbonizada y combinaciones entre éstas, y se ha observado que los resultados varían tanto en enraizamiento como en número de brotes, desarrollo y elongación de las ramillas. Paredes *et al.* (2003) recomiendan el uso de una combinación suelo + aserrín para obtener un mayor enraizamiento y prendimiento de las estacas, así como un mayor desarrollo generalizado de las plántulas.

Se ha encontrado que el cacao tiene un buen enraizamiento en sustratos de origen orgánico como cascarilla de arroz o de café y aserrín fresco o descompuesto, sin embargo, la tendencia es a preferir medios inertes que conservan su estructura con el tiempo (Gutiérrez 2003); pues de acuerdo con Mesén (1998) la iniciación de las raíces es un proceso interno controlado hormonalmente y no es afectado por el nivel nutricional del medio.

e. Reguladores de crecimiento

Las hormonas aplicadas en las ramillas actúan acortando el período de formación de raíces, incrementando los porcentajes de enraizamiento, el número y la calidad de las raíces y promoviendo la uniformidad del sistema radical (Gutiérrez 2003). De acuerdo con Hernández y Leal (1997) las auxinas son esenciales para la formación de raíces adventicias aún en especies fáciles de enraizar sobre todo en la fase juvenil, ya que mejoran el transporte y la producción de sacarosa en las hojas que actúa como fuente de carbono para la rizogénesis.

El ácido indolbutírico (AIB) es uno de los más utilizados por sus características, pues aunque es químicamente similar al AIA se ha comprobado que es más efectivo, y no es tóxico en un amplio rango de concentraciones, no es fácilmente degradada por la luz o por microorganismos y no es hidrosoluble, por lo que permanece más tiempo en el sitio de aplicación ejerciendo un mayor efecto (Mesén 1998).

La concentración óptima de aplicación de los reguladores de crecimiento puede variar para cada especie e incluso entre clones, no obstante numerosos estudios han demostrado que una concentración de AIB de 6 000 ppm es la más efectiva para el éxito en la formación de raíces adventicias en ramillas de cacao (Hernández y Leal 1997, Palacios y Monteiro 2001, Faria y Sacramento 2003).

f. Riego

Enríquez (2004) señala que la planta de cacao es sumamente sensible a la escasez de agua, debido a que los estomas de las hojas se cierran aún con pequeños cambios en su contenido, induciendo una rápida disminución de su capacidad fotosintética. De igual forma, las condiciones de estrés hídrico provocan en la planta una disminución significativa de la materia seca total, un crecimiento lento y una baja tasa de asimilación de nutrientes (Reyes y María 2003). Sin embargo, una atmósfera de suelo saturada, principalmente

si hay deficiencia de oxígeno favorece la presencia de pudriciones que impiden el desarrollo radical (Hernández y Leal 1997).

En los sistemas de producción de ramillas en que se reportan altos porcentajes de enraizamiento y sobrevivencia, se han utilizado períodos de aspersión de 30 segundos cada 5 minutos durante los primeros 60 días y posteriormente un régimen de 30 segundos cada 10 minutos seguido de 20 segundos cada 20 minutos en la fase final de aclimatación (Faria y Sacramento 2003).

g. Material vegetal

Algunos estudios realizados han demostrado que el uso de estacas herbáceas, semileñosas y leñosas y con hojas presentes o ausentes, así como la época de colecta del material tienen una considerable influencia en el enraizamiento. Ehlert *et al.* (2004) señalan que las estacas semileñosas poseen mejores condiciones de sobrevivencia que las herbáceas debido a las cantidades de asimilados en los tejidos del tallo y las ramas que le permiten la producción de raíces en condiciones de baja luminosidad, no obstante, reconocen que éstas son más susceptibles a la pérdida de agua por la presencia de hojas.

Por esta razón, Hernández y Leal (1997) recomiendan la reducción del área de las hojas para disminuir la transpiración, evitar el autosombreamiento y facilitar el manejo del explante, pero garantizando una suficiente área foliar que asegure la producción de carbohidratos mediante la fotosíntesis para satisfacer las necesidades de la estaca para seguir viviendo, además del uso de un material que no presente lesiones ni síntomas de enfermedades (July 2002).

Para minimizar los efectos de la desecación, se recomienda recolectar el material en horas de la mañana (entre las 6:00 am y 9:00 am) y mantenerlo protegido con periódico húmedo así como hacer aspersiones para evitar la deshidratación.

En cuanto al estado fenológico, se ha comprobado que las plantas que rinden mejores resultados son las que poseen mayor número de hojas caídas, una escasa floración y reposo vegetativo y reproductivo, lo cual ocasiona la acumulación de sustancias nutritivas en los tallos y ramas que favorecen el enraizado (Flores y Vera 1995).

OBJETIVOS

Objetivo general

- Establecer un sistema de propagación vegetativa, mediante el método de ramillas, de genotipos superiores de cacao (*Theobroma cacao* L.) seleccionados por el Programa de Mejoramiento Genético del CATIE.

Objetivos específicos

- Evaluar la efectividad de un propagador basado en la experiencia de otros países.
- Evaluar diferentes sustratos en el enraizamiento de las ramillas de cacao.
- Determinar las condiciones de sombreado más apropiadas para el desarrollo de raíces de las ramillas de cacao.
- Definir el tipo de explante más efectivo, de acuerdo a su posición en la planta madre, para ser utilizado en la propagación asexual de árboles de cacao.
- Comprobar la eficiencia de los sistemas evaluados mediante la medición de la sobrevivencia de las plántulas sembradas en condiciones de vivero.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Ubicación del ensayo

La investigación se realizó desde junio hasta diciembre del 2006 en la Finca Experimental La Montaña, propiedad del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE) ubicada en Turrialba, Provincia de Cartago, Costa Rica. Turrialba está localizado entre los 9° 53' latitud norte y 83° 38' longitud oeste a una altitud de 602 m.s.n.m. Tiene una temperatura promedio anual de 22,5°C, la precipitación media anual es de 2 645 mm, la humedad relativa de 87,7% y la radiación solar de 18,8 horas.

3.2 Material vegetal experimental

Se utilizó material vegetativo de distintos clones tomados tanto de macetas sembradas en el vivero como plantas en el campo de la Colección Internacional de Cacao del CATIE (IC3) y de los ensayos de campo T5, T6 y T7 del Programa de Mejoramiento Genético de Cacao. Se colectaron fragmentos de ramas laterales con crecimiento plagiotrópico en estado semileñoso, siguiendo las recomendaciones de Enríquez (2004) y Palencia (2000) de utilizar ramillas con hojas bien maduras, verdes y brillantes y con yemas que se observen claramente y cuya parte superior sea de color café y la parte inferior de color verde (Figura 1). Además se seleccionó material en buen estado, sin presencia de enfermedades ni lesiones y protegidas de la exposición directa al sol.



Figura 1. Rama de cacao con crecimiento plagiotrópico utilizada en la propagación. A, B y C indican los sitios de corte para la obtención de las ramillas.

3.2.1 Manejo del material vegetal

En todos los ensayos, el material se colectó entre las 7:00 y las 9:00 de la mañana del mismo día de la siembra. Las ramas se cortaron con una tijera de poda esterilizada por calor con un mechero con alcohol, asegurándose de hacer el corte hasta que ésta estuviera fría.

Luego del corte, las ramas se colocaron bajo la sombra en bandejas con agua y se cubrieron con papel periódico húmedo para evitar la deshidratación durante el período de transporte hasta el lugar de preparación y siembra del material. Luego se hizo un lavado del material con agua limpia para eliminar la suciedad presente sobre la superficie.

3.2.2 Preparación y siembra del material

Desde su colecta, las ramillas fueron mantenidas cubiertas con papel periódico húmedo para evitar su desecación. Los explantes se prepararon cortando segmentos de las ramillas de 10-12 cm con dos hojas, que fueron reducidas a un tercio de su superficie haciendo un corte cuidadoso con un bisturí así como la parte apical de las ramas, dejando cuatro hojas recortadas a un tercio de su superficie (Figura 2). En ambos casos, se hizo un corte en bisel en la base del explante y se aplicó ácido indolbutírico (AIB) en polvo a

una concentración de 6 000 ppm haciendo contacto suavemente entre la base del tallo y la hormona (Figura 3).

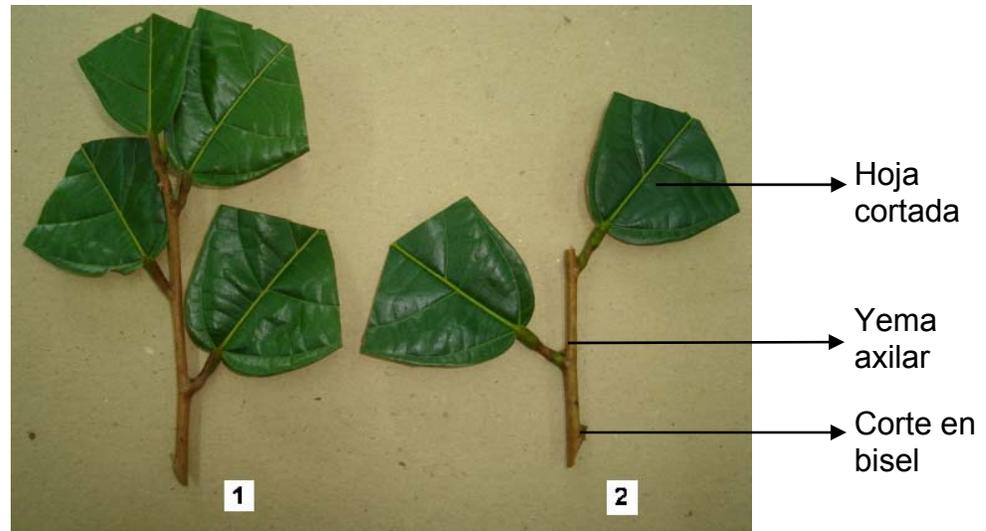


Figura 2. Tipos de explantes utilizados para la propagación de cacao: 1. Explante apical con cuatro hojas, 2. Segmento intermedio de ramilla con dos hojas.



Figura 3. Aplicación de la hormona AIB 6 000 ppm en la base del explante.

Los explantes fueron sembrados en bandejas de plástico de 40 x 27 cm formadas por 24 tubetes fijos de forma cónica de 15 cm de alto y 6 cm de diámetro (Figura 4). Cada tubete se llenó con 220 g de sustrato esterilizado cuya composición se describirá más adelante en cada ensayo. Las ramillas

se introdujeron en el sustrato a unos 2-3 cm de profundidad en un hueco pequeño hecho en el centro del tubete. Seguido de la siembra, inmediatamente las bandejas fueron colocadas dentro de los propagadores.



Figura 4. Bandeja plástica con tubetes utilizada para la siembra de ramillas.

3.3 Descripción del propagador

Se utilizaron dos propagadores de cemento idénticos, los cuales se diseñaron y se construyeron combinando diferentes tecnologías empleadas en otros países y experiencias con otras especies con las cuales se han obtenido resultados satisfactorios en la propagación de plantas (Leakey *et al.* 1990, Palacios y Monteiro 2001, July 2002, Faria y Sacramento 2003, Paredes *et al.* 2003, Ehlert *et al.* 2004), tomando en cuenta las condiciones locales de experimentación (Figura 5). Las adaptaciones necesarias para ajustar el sistema, principalmente en lo referente a riego y cobertura de sombra se realizaron durante el período de experimentación, de manera que las condiciones fueron cambiando en forma paralela al desarrollo de los ensayos, tal como se describe en el Cuadro 1.

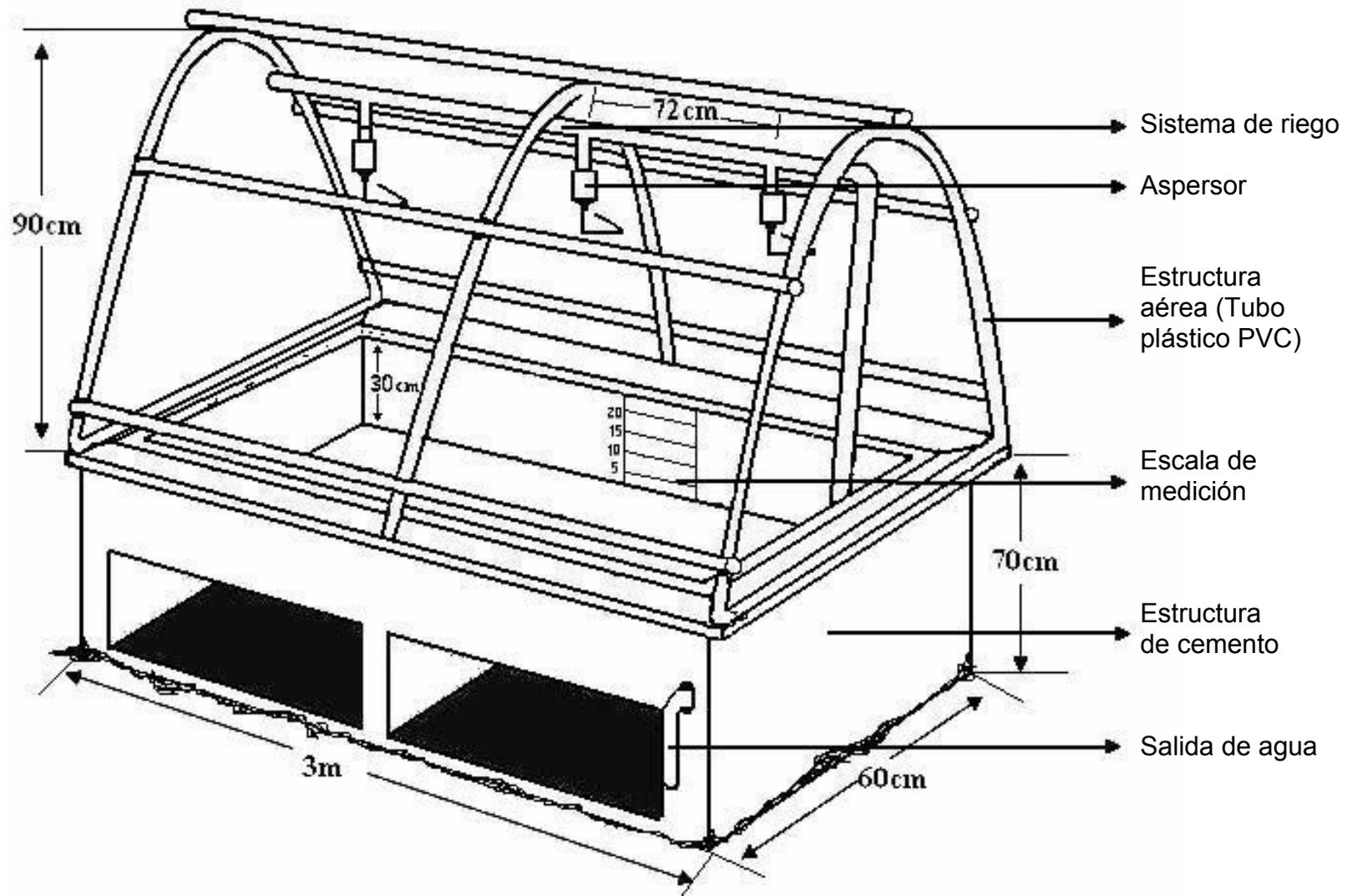


Figura 5. Diseño del propagador de cacao ubicado en la Finca La Montaña, Turrialba.

Cuadro 1. Adaptaciones realizadas en el sistema de propagación en la Finca La Montaña, Turrialba, durante el desarrollo del experimento en los meses de junio a diciembre.

Fecha	Actividad	Descripción
Jun 2006	Construcción	Se construyeron dos propagadores, tanto la estructura de cemento como la aérea.
11 jul 2006	Instalación del sistema de riego	Se colocó un sistema de riego con función manual
4 ago 2006	Instalación de controlador automático	El sistema de riego se conectó a un controlador automático con capacidad de tres riegos diarios
10 ago 2006	Cobertura de sombra con sarán al 50%	Se colocó una cobertura de sombra con sarán al 50% sobre los propagadores a 2,5 m de altura
1 set 2006	Cobertura de sombra con tablas de madera	Se colocó una cobertura formada con tablas de madera y doble cobertura de sarán al 50% sobre los propagadores a 2,5 m de altura
29 set 2006	Instalación de controlador automático	Se cambió el control automático de riego para aumentar la capacidad a 24 riegos diarios
16 nov 2006	Remoción de cobertura de sombra con tablas de madera	Se removieron las tablas de madera y se dejó una doble cobertura de sarán al 50% sobre los propagadores a 2,5 m de altura
16 nov 2006	Remoción de plástico de polietileno	Se removió la cubierta de plástico transparente a uno de los propagadores y se dejó descubierto
2 dic 2006	Remoción de plástico de polietileno	Se removió la cubierta de plástico transparente al segundo propagador, el cual quedó descubierto
2 dic 2006	Remoción de doble cobertura de sarán	Se removieron las dos coberturas de sarán al 50% colocadas sobre los propagadores a 2,5 m de altura

a. Estructura de cemento

La estructura de cemento consiste en una pila de concreto de 3 m de largo por 0,6 m de ancho y 0,7 m de altura. En el fondo de esta pila, se colocó agua a un nivel de 8 cm con el fin de facilitar la saturación de humedad en el ambiente interno, tal como lo describen Leakey *et al.* (1990) para el

propagador de sub-irrigación, el cual no cuenta con ningún sistema de riego. La pila tiene una profundidad de 30 cm, está cubierta en su interior con pintura impermeabilizante color celeste, cuenta con una escala de medición para el nivel del agua y un desagüe en cada extremo para la salida del agua.

b. Estructura aérea

Sobre la pila de cemento, el propagador posee una estructura de tubo de PVC de una pulgada en forma de arco de 90 cm de alto, cubierta con plástico de polietileno fijado totalmente en uno de sus lados y con el otro suelto para permitir su apertura, el cual se sujetó con dos amarres para asegurar un cierre hermético.

c. Sistema de riego

Inicialmente no se contó con un sistema de riego, por lo que los mismos se hicieron con manguera y/o regadera en forma manual. Posteriormente fue posible establecer el sistema por aspersión formado por un tubo de PVC de ½ pulgada colocado horizontalmente en la parte superior del propagador con tres aspersores separados entre sí 72 cm, el cual funcionó manualmente. Más adelante, este sistema se conectó a un controlador automático con capacidad de realizar tres riegos durante el día y finalmente el sistema se ajustó a 24 riegos diarios.

d. Cobertura de sombra

Los propagadores se encuentran ubicados dentro del vivero, bajo una sombra base compuesta por un sarán al 50% que cubre toda el área experimental. Inicialmente, esta sombra dificultó la sobrevivencia de las plantas, por lo que el nivel de sombra se incrementó a diferentes grados según se describe en cada ensayo (Figura 6).



Figura 6. Coberturas de sombra utilizadas en el área experimental para los ensayos en la Finca La Montaña, Turrialba. 1. Sarán del vivero al 50%. 2. Cobertura de dos capas de sarán al 50%. 3. Estructura de madera y sarán al 50% con 1,5 m de largo. 4. Cobertura de dos capas de sarán al 50% con 1,5 m de largo.

3.4 Metodología

La investigación se desarrolló en dos fases para facilitar la evaluación de los diferentes factores en estudio. La primera fase consistió en pruebas para adaptar las condiciones de acuerdo a las observaciones realizadas en las mismas, de manera que no se aplicó diseños estadísticos. En la segunda fase se realizó la evaluación de los factores que de acuerdo con las observaciones realizadas en la primera fase, ejercen mayor influencia en la sobrevivencia de las ramillas; siguiendo además un modelo de bloques completos al azar para el análisis de los resultados.

3.4.1 Primera fase: Ensayos previos

Se hicieron experimentos previos que consistieron en probar diferentes coberturas de sombra, aplicaciones de riego, sustratos y clones con el fin de optimizar las condiciones que garantizaran una mayor sobrevivencia de las ramillas en los siguientes ensayos (experimentos formales). Se realizaron observaciones periódicas del estado de las plantas según el daño de las hojas durante los primeros 30 días, por lo que se evaluó el número de explantes con hojas sanas y con hojas afectadas por clorosis o necrosis durante el período de establecimiento. La metodología seguida en estas pruebas se describe a continuación:

Prueba N°1. *Evaluación de sombra y clones*

Esta prueba se realizó en condiciones de alta exposición solar, con una sombra dada únicamente por la cobertura del sarán del vivero al 50% (Figura 6.1) y con riego al momento de siembra y luego una vez cada tres días con una manguera. Este se llevó a cabo en un sistema cerrado mediante la cobertura total del propagador con plástico transparente, tal como se muestra en la figura 5. Se evaluaron dos tipos de explantes: apical y segmentos de rama (Figura 2) de cuatro clones: 1) EET 183, 2) CC 137, 3) CCN 51 y 4) UF 273 Tipo 1 provenientes de plantas sembradas en las colecciones IC3 Montaña y Cabiria. Se aplicó AIB a 6 000 ppm disuelto en alcohol y agua destilada (1:9) por inmersión durante 40 segundos en la base del explante y se sembraron en un sustrato de tierra + aserrín (1:1) de acuerdo a los resultados sustentados en la literatura (Sodré *et al.* 2005, Paredes *et al.* 2003).

Prueba N°2. *Evaluación de sombra y aplicación de riego*

Bajo la cubierta de sombra base, se evaluaron dos tratamientos de acuerdo a la sombra utilizada: 1) el sarán del vivero al 50% y 2) plástico negro cubriendo directamente el propagador. A los seis días se levantaron los

extremos del plástico dejando descubierta la mitad inferior de la estructura. Se aplicó riego por aspersion durante 10 minutos a las 6:00 a.m., 10:00 a.m. y 2:00 p.m.

Se sembraron los dos tipos de explante (Figura 2) de los clones CCN 51 y CC 137 provenientes de plantas sembradas en el campo (T5), se aplicó AIB a 6 000 ppm disuelto en alcohol y agua destilada (1:9) por inmersión durante 40 segundos en la base del explante y se sembraron en un sustrato de tierra + aserrín (1:1).

Prueba N°3. *Evaluación de sombra y aplicación de hormona*

Dado el efecto positivo del plástico negro en el ensayo anterior, se pensó que el incremento de la sombra podría mejorar la propagación. Por esta razón se estudió el efecto de colocar una cobertura adicional de sarán al 50% a una altura de 2,5 m del suelo sobre los propagadores (Figura 6.2). Se aumentó la frecuencia de riego a 10 minutos cada dos horas desde las 6:00 a.m. hasta las 2:00 p.m. Se emplearon dos tipos de explante (Figura 2) de los clones CCN 51 y CC 137 provenientes de árboles sembrados en campo (T5). Se probaron dos formas de aplicación de la hormona: 1) AIB a 6 000 ppm disuelto en alcohol 95% por inmersión durante 10 segundos y 2) AIB a 6 000 ppm en polvo mezclado con talco neutro. Las ramillas se sembraron en un sustrato de tierra + aserrín (1:1).

Prueba N°4. *Evaluación de sombra y riego*

Se empleó un nivel de sombra mayor a los anteriores, dado por la adición de una estructura ubicada a 2 m de altura sobre los propagadores, compuesta por tablas de madera de 2,5 cm de espesor y 30 cm de ancho, separadas 12 cm entre sí y cubiertas con dos cubiertas de sarán al 50% tanto en la parte superior como en los costados a 1,5 m de largo (Figura 6.3). Se evaluó el efecto del riego en la sobrevivencia, por lo que se estableció un tratamiento con un riego de un minuto cada dos horas desde las 7:00 a.m. hasta las 5:00

p.m. y otro tratamiento en que no se aplicó riego. Se usaron dos tipos de explante (Figura 2) de los clones CCN 51 y CC 137 provenientes de plantas sembradas en campo (T5). Se aplicó AIB a 6 000 ppm en polvo disuelto en talco neutro y se sembraron en un sustrato de tierra + aserrín (1:1).

Prueba N°5. *Evaluación de clones*

Esta prueba se desarrolló bajo las mismas condiciones de sombra de la prueba N°4, con un riego de 30 segundos cada 30 minutos desde las 6:00 a.m. hasta las 6:00 p.m. utilizando dos tipos de explante (Figura 2). Se evaluaron seis clones distintos: 1) CC 137, 2) ICS 95, 3) EET 183, 4) PMCT 58, 5) Pound 7 y 6) UF 237 Tipo 1, todos procedentes de plantas sembradas en macetas del vivero de propagación. Se aplicó AIB a 6 000 ppm disuelto en talco neutro y se sembraron en un sustrato de tierra + aserrín (1:1).

Prueba N°6. *Evaluación de clones y sustratos*

Bajo las mismas condiciones de la prueba anterior, se evaluó el efecto de cuatro medios de enraizamiento con segmentos intermedios de seis clones distintos. Los clones utilizados fueron los siguientes: 1) CC 137, 2) CCN 51, 3) EET 183, 4) ICS 95, 5) PMCT 58 y 6) UF 273 Tipo 1 provenientes de plantas sembradas en macetas en el vivero de propagación. Se aplicó AIB a 6 000 ppm disuelto en talco neutro y seguidamente se sembraron en los siguientes cuatro sustratos: 1) tierra, 2) aserrín, 3) tierra + aserrín (1:1) y 4) tierra + aserrín + abono orgánico Juan Viñas (1:1:2) (Anexo 1).

Aproximadamente, entre 1,5 y dos meses después de su siembra, todas las plantas sobrevivientes de las pruebas anteriores se trasplantaron a bolsas de polietileno con tierra y granza de arroz y se colocaron fuera del sistema de propagación bajo una sombra con sarán al 50% y se aplicó un riego de tres veces por semana con el fin de estimular la brotación de las yemas y el desarrollo de los nuevos brotes.

En el caso de las pruebas N°5 y N°6, los explantes sobrevivientes tuvieron dos fases de aclimatación, ya que 20 días antes del trasplante, se colocaron en las mismas bandejas, en condiciones de sombra bajo techo y con un riego de una vez al día. Transcurrido este tiempo, se sembraron en bolsas y se colocaron en las condiciones descritas anteriormente.

3.4.2 Segunda fase: Experimentos formales

De acuerdo a las observaciones de los ensayos anteriores, se evaluaron distintas coberturas de sombra, sustratos y clones y se realizaron observaciones cada cinco días de las variables estudiadas. La metodología seguida fue la siguiente:

Ensayo N°1. Evaluación de clones y sustratos

Se prepararon ramillas de segmentos intermedios con dos hojas de los clones: 1) CC 137, 2) CCN 51, 3) ICS 95 y 4) PMCT 58 colectados de plantas sembradas en el campo (T6) y se sembraron de forma aleatoria cuatro repeticiones de cada tratamiento, utilizando los cuatro sustratos siguientes: 1) tierra + aserrín (1:1), 2) tierra + aserrín + abono orgánico Juan Viñas (1:1:2), 3) tierra + aserrín (1:1) complementado con 3,12 g de fertilizante (10-30-10) por cada kg de mezcla y 4) aserrín + abono orgánico Juan Viñas (1:1).

Seguidamente se colocaron las ramillas en el propagador bajo la cobertura de sombra con tablas de madera y serán descrito anteriormente (Figura 6.3), el cual a los 21 días se adecuó para aumentar el nivel de luz, por lo que se removieron las tablas de madera y se mantuvieron dos capas de sarán al 50% a una altura de 2 m del suelo con 1,5 m de largo a los costados (Figura 6.4). Se aplicó un riego durante 30 segundos cada 30 minutos desde las 6:00 a.m. hasta las 6:00 p.m.

Ensayo N°2. Evaluación de sombra y clones

Se utilizaron ramillas de segmentos de dos hojas de los clones: 1) PMCT 58 y 2) CATIE-R4 provenientes de árboles sembrados en el campo (T7) y se sembraron de forma aleatoria seis repeticiones de cada clon en un sustrato compuesto por una mezcla de tierra + aserrín (1:1) complementado con 13 g de fertilizante (18-5-15) por cada kg de tierra presente en la mezcla, basados en las observaciones del ensayo anterior.

Seguidamente se colocaron en el propagador cubierto por dos capas de sarán al 50% a 2 m de altura con 1,5 m de largo (Figura 6.4) y en cuatro ambientes distintos: 1) propagador sin plástico y sin sarán, 2) propagador sin plástico con una cubierta de sarán al 50%, 3) propagador con plástico transparente de polietileno y 4) propagador con plástico transparente de polietileno con una cubierta de sarán al 50%. Se aplicó un riego durante 30 segundos cada 30 minutos desde las 6:00 a.m. hasta las 6:00 p.m.

Ensayo N°3. Evaluación de sombra, clones y tipo de explante

Se utilizaron dos tipos de explantes de cinco clones: 1) CATIE-R4, 2) CATIE-R6, 3) PA 169, 4) CCN 51 y 5) PMCT 58 (estos dos últimos como testigos), todos provenientes de árboles sembrados en el campo (T7). Se sembraron de forma aleatoria seis repeticiones de cada clon y tres de cada testigo en un sustrato compuesto por una mezcla de tierra + aserrín (1:1) complementado 13 g con fertilizante (18-5-15) por cada kg de tierra presente en la mezcla.

Seguidamente se colocaron en el propagador bajo la cobertura de sombra base y en cuatro ambientes diferentes: 1) propagador sin plástico y sin sarán, 2) propagador sin plástico con una cobertura de sarán al 50%, 3) propagador sin plástico con dos coberturas de sarán al 50% y 4) propagador sin plástico con tres coberturas de sarán al 50%. Cada siete días, se removió una cobertura de sarán a cada uno de los ambientes para aumentar el nivel de luz, de manera que a partir de los 21 días, los cuatro ambientes

estuvieron en iguales condiciones. Se aplicó un riego durante 30 segundos cada 30 minutos desde las 6:00 a.m. hasta las 6:00 p.m.

3.4.3 Diseño estadístico

En los ensayos formales se utilizó un diseño experimental de bloques completos al azar con cuatro o seis repeticiones, el cual corresponde al siguiente modelo:

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + B_j + E_{ij} + \delta_{ijk}$$

Donde:

Y_{ijk} = Variable de respuesta del tratamiento i , bloque j y muestra k .

μ = media poblacional

T_i = efecto del tratamiento

B_j = efecto de la repetición

E_{ij} = error experimental

δ_{ijk} = error de muestreo

Aunque los ensayos se realizaron en fechas diferentes y se estudiaron factores distintos, se evaluaron en todas las mismas variables y siguiendo este modelo estadístico.

3.5 Variables evaluadas

Después de la siembra, cada cinco días se realizaron evaluaciones de las siguientes variables:

a. Área de hoja afectada

Fue evaluada de acuerdo al área de las hojas que se encuentra afectada por clorosis o necrosis y medida de acuerdo a la siguiente escala (Figura 7):

Valor	Porcentaje de área afectada
0	0
1	1-20
2	21-40
3	41-60
4	61-80
5	80-100



Figura 7. Escala de evaluación de acuerdo al porcentaje de área de las hojas afectado. 1. 0% daño, 2. 1-20% daño, 3. 21-40% daño, 4. 41-60% daño, 5. 61-80% daño, 6. 81-100% daño.

b. Severidad del daño de la hoja

Se evaluó de acuerdo con el grado de daño presente en cada hoja de los explantes y se midió mediante la escala siguiente (Figura 8):

Valor	Grado de daño de la hoja
0	hoja sana
1	clorosis incipiente
2	clorosis intermedia
3	clorosis avanzada
4	clorosis total
5	necrosis incipiente
6	necrosis intermedia
7	necrosis avanzada
8	necrosis total

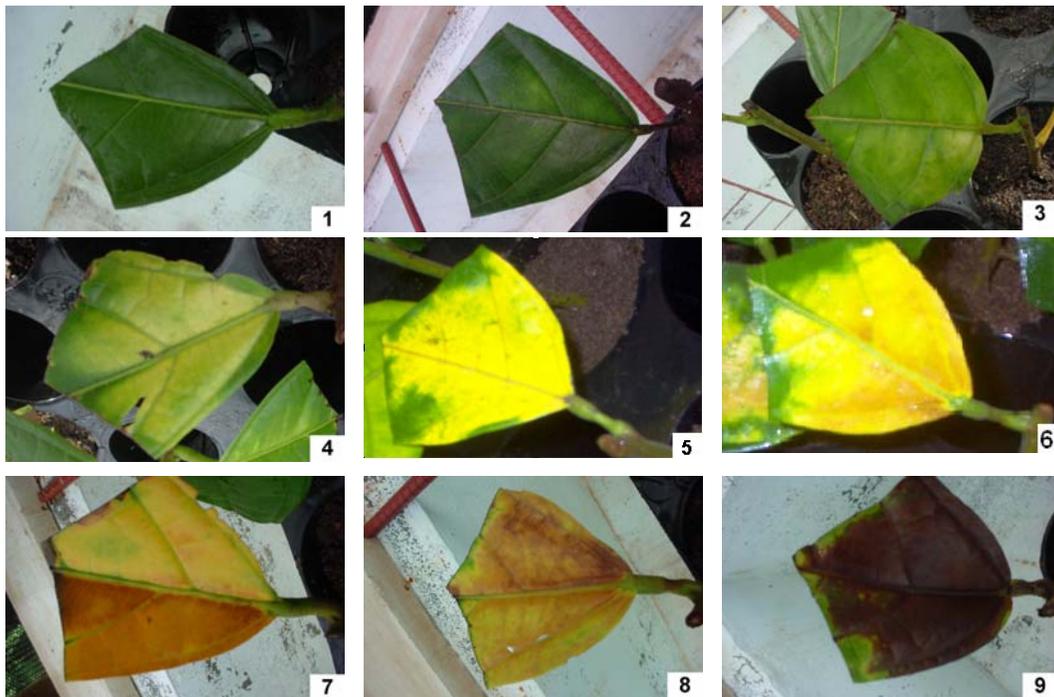


Figura 8. Escala de evaluación de acuerdo al grado de daño de las hojas. 1. hoja sana, 2. clorosis incipiente, 3. clorosis intermedia, 4. clorosis avanzada, 5. clorosis total, 6. necrosis incipiente, 7. necrosis intermedia, 8. necrosis avanzada, 9. necrosis total.

c. *Sobrevivencia de hojas*

Se contabilizó el número de hojas de cada ramilla y se calculó el porcentaje en relación con la totalidad de hojas al momento de la siembra de los explantes evaluados.

d. *Explantos vivos*

Esta variable evalúa la sobrevivencia de los explantes en porcentaje.

e. *Incidencia según daño en hoja*

Se calculó para cada tratamiento como el porcentaje de hojas afectadas por clorosis, necrosis o defoliación en relación con la totalidad de hojas presentes en los explantes evaluados.

3.6 Análisis de resultados

Para el análisis de daño de hoja, se utilizó el porcentaje correspondiente al punto medio del ámbito de porcentajes de cada valor de la escala. Estos porcentajes se transformaron por medio de la siguiente fórmula:

ARCOSENO $\sqrt{X/100}$, donde X representa la variable en porcentaje

Una vez transformados los datos, se sometieron en cada evaluación por separado a un análisis de varianza y luego a una prueba de amplitud múltiple de Duncan al 5% de significancia. La severidad del daño en la hoja fue medida con una escala cualitativa, por lo tanto no se transformaron sus datos ni se les aplicó los análisis propios de una distribución normal. Esta variable se analizó por medio de la prueba no paramétrica de Friedman.

Las pruebas estadísticas de cada uno de los ensayos se realizaron con los datos de todas las evaluaciones utilizando el programa InfoGen/P 2005 (versión 1.0) (Anexo 2), sin embargo se reportan y se discuten los resultados a los 15 y 30 días, pues estos muestran apropiadamente el comportamiento al inicio y al final del período de evaluación.

4. RESULTADOS

4.1 Ensayos previos

Prueba N°1. *Evaluación de sombra y clones*

No se observó ninguna diferencia entre la aparición de daño en las hojas entre los dos tipos de explante empleados, aunque sí entre los clones, ya que a los cuatro días, se observaron síntomas de clorosis en las venas de las hojas de los clones EET 183, CC 137 y UF 273 T1 y en menor grado en CCN 51. A los seis días, las hojas que estaban cloróticas mostraron una necrosis avanzada y a los 15 días, ésta fue general para todos los explantes.

El uso de este sistema cerrado, donde se suponía que habría un alto contenido de humedad por la evaporación del agua de la pila, no fue efectivo, pues hubo una rápida aparición de clorosis en los tejidos que condujeron a la muerte de los explantes.

No hubo sobrevivencia en ninguno de los casos, concluyéndose que las condiciones en que estuvieron las plantas (alta exposición solar, que produjo un sobrecalentamiento de las cámaras de propagación y riegos muy limitados) son inadecuadas para lograr la propagación de las ramillas.

Prueba N°2. *Evaluación de sombra y aplicación de riego*

Desde los tres días se presentaron síntomas de clorosis en algunos de los explantes colocados en el propagador cubierto solamente por el sarán del vivero al 50%, mientras que la mayoría de las ramillas cubiertas con plástico negro conservaron sus hojas verdes, sin que se presentara diferencia entre clones, sin embargo el daño se hizo más notorio después de permitir la entrada de luz a los seis días.

A los diez días, las hojas de ambos clones colocados bajo la sombra base se mostraron necróticas. Se presentó 100% de explantes afectados del clon CC 137 cubiertos por plástico negro, mientras que para CCN 51, la presencia de

hojas sanas fue de 83,3% para explantes apicales y 33,3% para segmentos de ramilla. Después de un mes, la sobrevivencia de hojas sanas final de CCN 51 fue de 66,6% y 16,6% para explante apical y segmento intermedio respectivamente.

Se observó por lo tanto que existe un efecto de los clones, encontrándose que el CCN 51 es de más fácil propagación que el CC 137. Por otra parte, aparentemente los explantes apicales favorecen la propagación mediante las ramillas.

Sobrevivencia a los dos meses

Al momento de trasplantar las ramillas a bolsas de polietileno, dos meses después de iniciado el ensayo, se observó una importante formación de raíces en cuatro de las seis ramillas vivas (Figura 9), lo que representó el 66,7%, mientras las demás presentaron la formación de callo en la base. Un mes después del trasplante, dos de las ramillas que tenían raíces se mantuvieron vivas y portaban brotes con hojas desarrolladas, mientras que solamente una de las que presentaban la formación del callo.



Figura 9. Formación de raíces en las ramillas dos meses después de su siembra en el propagador.

De esta manera, comparando estos resultados con los del ensayo anterior, se comprobó que con la frecuencia de riego utilizada de tres veces por día, a pesar de ser más intensa y menos frecuente que la reportada en la literatura (Palacios y Monteiro 2001, Faria y Sacramento 2003), el incremento en el nivel de sombra favorece la propagación.

Prueba N°3. *Evaluación de sombra y aplicación de hormona*

Desde los cinco días de iniciado el ensayo, se empezó a observar síntomas de clorosis en algunos de los explantes, siendo estos síntomas más evidentes en los segmentos intermedios del clon CCN 51, en que se encontró sólo un 33,3% de segmentos intermedios con hojas sanas, mientras que el 100% de explantes apicales no sufrió ningún daño. Por su parte, 52,9% de los segmentos intermedios de CC 137 y 92,9% de explantes apicales no presentaron ningún daño en sus hojas.

Con respecto a la técnica de aplicación de la hormona, a pesar de que al inicio el porcentaje de explantes con hojas sanas fue de 78,3% y 65,5% para la hormona disuelta en alcohol y en talco respectivamente, los porcentajes se igualaron a los 15 días en un 33,3%, por lo que, al no observarse diferencias entre tratamientos, se optó por seguir utilizando la aplicación con talco debido a la facilidad de la técnica.

A pesar de que al inicio, el daño fue menos aparente, a los 18 días, la totalidad de ramillas de CC137 se encontraron afectadas, mientras que un 33,3% de las de CCN 51 no presentaron ningún daño. No obstante, a la edad de un mes, no hubo sobrevivencia tanto para CC 137 como para CCN 51, por lo que se concluyó que las condiciones de sombra y riego utilizadas no fueron efectivas para lograr la sobrevivencia de las plantas, a pesar de que ambas se habían incrementado con respecto al ensayo anterior, por lo que se pensó que el nivel de sombra era deficitario, pues Palencia (2000) y July (2002) recomiendan niveles de sombra de 85-95% en el período inicial.

Prueba N°4. Evaluación de sombra y riego

A los cinco días, se observaron síntomas de clorosis en las hojas, aunque en algunos casos se presentó además de clorosis, necrosis en una misma hoja. A esta edad, para el tratamiento con riego no se presentaron diferencias entre el tipo de explante, mas sí entre clones, pues el 40% de ambos explantes de CC 137 presentaron todas sus hojas sanas, mientras que del clon CCN 51 se registraron sanas las hojas del 60% los dos tipos de explantes.

En el tratamiento sin riego, sí se observaron diferencias tanto entre los tipos de explante como entre clones, ya que para el clon CC 137, solamente el 20% de los explantes apicales conservaron todas sus hojas sanas y ninguno de los segmentos intermedios, mientras que del CCN 51, se mantuvieron sanas las hojas del 80% y 40% de los explantes apicales y segmentos intermedios, respectivamente.

A los 18 días, hubo una importante diferencia entre los tratamientos, ya que en el tratamiento con riego se mantuvo sano solamente el 40% de los explantes apicales del CC 137 y ningún segmento, así como el 60% de los explantes apicales y el 20% de los segmentos intermedios del clon CCN 51. Por otra parte, en el tratamiento sin riego, únicamente se mantiene sin daño el 20 % de los explantes apicales del clon CCN 51.

Al término de un mes, no se reportaron explantes con hojas sanas del clon CC 137 en ninguno de los tratamientos, mientras que del CCN 51, se registraron sin daño el 40% de los explantes apicales que recibieron riego y sólo el 20% de este mismo tipo de explante en el tratamiento sin riego (Cuadro 2).

Cuadro 2. Porcentaje de explantes con hojas sanas de dos clones de cacao propagados por ramillas en dos tratamientos diferentes a los 5, 18 y 30 días después de la siembra.

Tratamiento	Clon Explante ^{b/}	Edad		
		5 días	18 días	30 días
Con riego ^{a/}	CC 137 A	40,0	40,0	0,0
	CC 137 S	40,0	0,0	0,0
	CCN 51 A	60,0	60,0	40,0
	CCN 51 S	60,0	20,0	0,0
Sin riego	CC 137 A	20,0	0,0	0,0
	CC 137 S	0,0	0,0	0,0
	CCN 51 A	80,0	20,0	20,0
	CCN 51 S	40,0	0,0	0,0

a/ Riego por un minuto cada dos horas de 7:00 a.m. a 5:00 p.m.

b/Tipo de explante:

A) apical. S) segmento intermedio.

Sobrevivencia a los dos meses

Al momento del trasplante de las tres ramillas sobrevivientes, dos presentaron la formación de al menos una raíz de un centímetro, mientras una, correspondiente al tratamiento sin riego, presentó la formación de un callo en su base.

Con este ensayo se comprobaron los resultados de la prueba N°1 de que la frecuencia y la intensidad del riego son factores decisivos para la propagación de las ramillas, además de la superioridad del clon CCN 51 sobre el CC 137 en cuanto a su sobrevivencia. No obstante, existe un factor que probablemente sea el nivel de sombra, el que dificulta la propagación.

Prueba N°5. Evaluación de clones

Las observaciones se realizaron a partir de los ocho días, momento en que se observaron síntomas de daños como clorosis y necrosis en algunas de las hojas de las ramillas. A esta edad, se encontró que el clon menos dañado era el Pound 7 con el 100% de explantes con hojas sanas, seguido del

PMCT 58 con 70%, EET 183 e ICS 95 con 50% cada uno y luego el UF 273 Tipo 1 y CC 137 con 16,7 y 0% respectivamente.

Este comportamiento se mantuvo durante todo el período de evaluación, pues al término de un mes, Pound 7 mostró un 83,4% y PMCT 58 un 70% de explantes con hojas sanas, por lo que son considerados como clones fáciles de propagar. Mientras tanto, ICS 95 y EET 183 presentaron resultados de 50 y 33,3% de explantes sin daño, contrario al CC 137 y a UF 273 Tipo 1 que fueron difíciles de propagar en estas condiciones, ya que no presentaron explantes sanos.

Nuevamente se comprobó que el tipo de explante apical es el más adecuado para la propagación, pues aunque el porcentaje de ramillas sanas decreció de 66,7% a 44,5% desde los ocho hasta los 30 días, fue superior con respecto al segmento intermedio, el cual mostró un porcentaje de 34,4% de explantes con daño foliar desde los ocho hasta los 30 días.

Sobrevivencia a los dos meses

Después del mantenimiento de las ramillas bajo techo, se mostró pérdida de material debida a la muerte de sus yemas, por lo que de las 13 plantas sobrevivientes, solamente se sembraron en bolsa cinco, lo que representa el 38,7%, pues fueron los que se mantuvieron verdes y presentaron formación de raíces.

Se concluyó que para los explantes tomados del vivero, donde las condiciones son de mayor sombreadamiento, mayor densidad y mayor competencia por factores como espacio y luz en relación a plantas sembradas en el campo, un incremento en el nivel de sombra durante la propagación, parece ser más efectiva para facilitar la sobrevivencia de las ramillas.

Prueba N°6. Evaluación de clones y sustratos

Desde los cinco días se observó presencia de síntomas de clorosis en algunos de los explantes, siendo los menos afectados los del clon PMCT 58, con 87,5%, seguido por el CCN 51 con 75,5% y el EET 183 con 62,5% de explantes con hojas sanas. Los clones con menor rendimiento fueron ICS 95, UF 273 Tipo 1 y CC 137 con 50, 25 y 12,5% de plantas sanas.

Este comportamiento fue similar durante los 40 días de evaluación, de manera que se comprobó que los clones tienen respuestas diferentes al proceso de propagación, siendo unos más fácil de propagar que otros, tal como los clones PMCT 58, CCN 51, EET 183 e ICS 95, en los cuales la presencia de hojas sanas varió entre 87,5% (PMCT 58) y 50% (CCN 51, EET 183 e ICS 95), contrario a los clones UF 273 Tipo 1 y CC 137 cuyos porcentajes fueron de 12,5 y 0% respectivamente, concluyéndose que éstos presentan una mayor dificultad para ser propagados.

Por su parte, con respecto al tipo de sustrato utilizado, hubo diferencia entre la respuesta de las ramillas, pues se observó que los sustratos tierra + aserrín (1:1) y tierra + aserrín + abono orgánico Juan Viñas (1:1:2) presentaron los mayores porcentajes de explantes sin daño con 50% cada uno, mientras con tierra fue de 41,7% y con aserrín 33,3%.

Observando estos resultados y con base en lo reportado en otros países (Palacios y Monteiro 2001, Faria y Sacramento 2003), se pensó que un equilibrio entre la aireación y la retención de humedad de la mezcla tierra + sustrato, así como los componentes nutricionales del abono orgánico pueden facilitar la propagación, por lo tanto se procedió a estudiar el efecto de la adición de fertilizante en los siguientes ensayos.

Sobrevivencia a los dos meses

En la primera fase de aclimatación, hubo una sobrevivencia de 43% de explantes que se mantuvieron vivos y mostraron formación de raíces al momento del trasplante, que correspondieron al 50% de explantes de PMCT

58 de los sustratos de tierra, aserrín y la mezcla tierra + aserrín (1:1) y el 100% de explantes en tierra + aserrín + abono orgánico Juan Viñas (1:1:2). Además se mantuvo vivo el 100% de ICS 95 sembrado en tierra + aserrín (1:1) y en tierra + aserrín + abono orgánico Juan Viñas (1:1:2); así como el 50% de CCN 51 sembrado en tierra y el 100% de EET 183 en tierra + aserrín + abono orgánico Juan Viñas (1:1:2). Los explantes que presentaron hojas dañadas o ausencia de éstas fueron sembrados en bolsas para observar su comportamiento, sin embargo no hubo respuesta, debido a que sus brotes murieron.

Dos meses después de que las plántulas fueron trasplantadas al vivero para su aclimatación, se observó que hubo un mayor crecimiento de los brotes. Además éstas mostraron un desarrollo normal, cuyos órganos y tejidos presentan características de vigorosidad, por lo tanto, se concluye que el método de propagación seguido de la aclimatación de las plántulas es adecuado para la obtención de nuevas plantas de cacao (Figura 10).



Figura 10. Desarrollo de plántulas de cacao obtenidas mediante el método de ramillas, dos meses después de su trasplante a condiciones de vivero.

4.2 Experimentos formales

Ensayo N°1. *Evaluación de clones y sustratos*

A la edad de 15 días existió diferencia significativa entre clones para la variable de área de hoja afectada. Los clones PMCT 58 y CCN 51 presentaron los promedios menores para esta variable. Se obtuvieron promedios de 1,5 (CCN 51 en el sustrato 4) y 3,3 (CCN 51 en el sustrato 1) y para PMCT 58 de 0,75 (sustrato 3) y 3,8 (sustrato 4). En contraste, el CC 137 mostró valores mayores de área afectada entre 4,0 (sustratos 1 y 2) y 4,8 (sustrato 4) (Cuadro 3). Por su parte para esta variable, no se presentó diferencia significativa entre los sustratos utilizados, comprobándose que al inicio, el efecto clon influye en el estado del material, no así el sustrato.

La sobrevivencia de hojas en promedio para el sustrato 1 fue de 62,5%, para el sustrato 2 fue de 53,1%, en el sustrato 3 fue de 68,8% y en el sustrato 4 fue de 62,5%. Por clones, el que mantuvo una mayor sobrevivencia de hojas fue el PMCT 58 con 81,3%, seguido del CCN 51 con 68,8% y el ICS 95 con 56,3%, en último lugar el CC 137 con 40,6%. A los 15 días de la siembra, el 100% de los explantes se mantuvo vivo (Cuadro 3).

Cuadro 3. Área de hoja dañada, sobrevivencia de hojas y explantes vivos de cuatro clones de cacao propagados por ramillas en cuatro sustratos 15 días después de la siembra.

Sustrato ^{a/}	Clon	Área de hoja ^{b/} (0-5)	Sobrevivencia de hojas (%)	Explantes vivos (%)
1	CC 137	4,00	50,0	100,0
	CCN 51	3,25	50,0	100,0
	ICS 95	2,75	75,0	100,0
	PMCT 58	2,50	75,0	100,0
2	CC 137	4,00	50,0	100,0
	CCN 51	2,50	50,0	100,0
	ICS 95	3,50	37,5	100,0
	PMCT 58	1,50	75,0	100,0
3	CC 137	4,25	37,5	100,0
	CCN 51	1,75	75,0	100,0
	ICS 95	3,75	62,5	100,0
	PMCT 58	0,75	100,0	100,0
4	CC 137	4,75	25,0	100,0
	CCN 51	1,50	100,0	100,0
	ICS 95	3,25	50,0	100,0
	PMCT 58	3,75	75,0	100,0

^{a/} Sustratos:

1) tierra + aserrín (1:1), 2) tierra + aserrín + abono orgánico Juan Viñas (1:1:2), 3) tierra + aserrín (1:1) con 3,12 g de fertilizante (10-30-10) por cada kg de mezcla, 4) aserrín + abono orgánico Juan Viñas (1:1).

^{b/} Escala de área de hoja afectada: 0) 0%, 1) 1-20%, 2) 21-40%, 3) 41-60, 4) 61-80%, 5) 81-100%.

A la edad de 30 días, los menores promedios de área de hoja dañada los presentó el clon CCN 51, que fueron entre 1,50 (sustrato 4) y 3,25 (sustrato 1), seguido del PMCT 58 que varió entre 1,25 (sustrato 3) y 4,50 (sustrato 4), de tal forma que se comprobó la facilidad de propagación de ambos clones, así como el efecto positivo de la adición de nutrientes al sustrato. Mientras tanto, el clon CC 137 mostró mayor dificultad para ser propagado, pues su promedio de área afectada varió entre 4,75 (sustrato 4) y 4,00 (sustrato 1) (Cuadro 4). A pesar de esto, para esta variable, no se encontró diferencia significativa entre los clones ni entre los sustratos empleados.

El promedio de sobrevivencia de hojas por sustrato a los 30 días fue de 46,9% para los sustratos 1, 2 y 4; y de 59,4% en el sustrato 3. Por clones, la mayor sobrevivencia de hojas se mantuvo con el PMCT 58 con un 62,5%,

luego el CCN 51 con 59,4% e ICS 95 con 40,6%, por último CC 137 con 37,5%.

El número de explantes vivos de acuerdo a los clones, varió entre un 100% de ICS 95 y un 68,8% de PMCT 58, mientras los clones CC 137 y CCN 51 presentaron una sobrevivencia de 93,8 y 75,0% de sobrevivencia de explantes, respectivamente (Figura 11). De acuerdo a la sobrevivencia por sustrato, la mayor sobrevivencia se presentó en el sustrato 3 con un 100%, seguido de un 81,3% en los sustratos 2 y 4 y un 75% en el sustrato 1 (Cuadro 4).

Cuadro 4. Área de hoja dañada, sobrevivencia de hojas y explantes vivos de cuatro clones de cacao propagados por ramillas en cuatro sustratos 30 días después de la siembra.

Sustrato ^{a/}	Clon	Área de hoja ^{b/} (0-5)	Sobrevivencia de hojas (%)	Explantes vivos (%)
1	CC 137	4,00	50,0	75,0
	CCN 51	3,25	37,5	50,0
	ICS 95	3,00	50,0	100,0
	PMCT 58	3,00	50,0	75,0
2	CC 137	4,50	37,5	100,0
	CCN 51	2,50	50,0	50,0
	ICS 95	3,50	37,5	100,0
	PMCT 58	2,00	62,5	75,0
3	CC 137	4,25	37,5	100,0
	CCN 51	2,00	62,5	100,0
	ICS 95	3,75	37,5	100,0
	PMCT 58	1,25	100,0	100,0
4	CC 137	4,75	25,0	100,0
	CCN 51	1,50	87,5	100,0
	ICS 95	3,25	37,5	100,0
	PMCT 58	4,50	37,5	25,0

^{a/} Sustratos:

1) tierra + aserrín (1:1), 2) tierra + aserrín + abono orgánico Juan Viñas (1:1:2), 3) tierra + aserrín (1:1) con 3,12 g de fertilizante (10-30-10) por cada kg de mezcla, 4) aserrín + abono orgánico Juan Viñas (1:1).

^{b/} Escala de área de hoja afectada: 0) 0%, 1) 1-20%, 2) 21-40%, 3) 41-60, 4) 61-80%, 5) 81-100%.

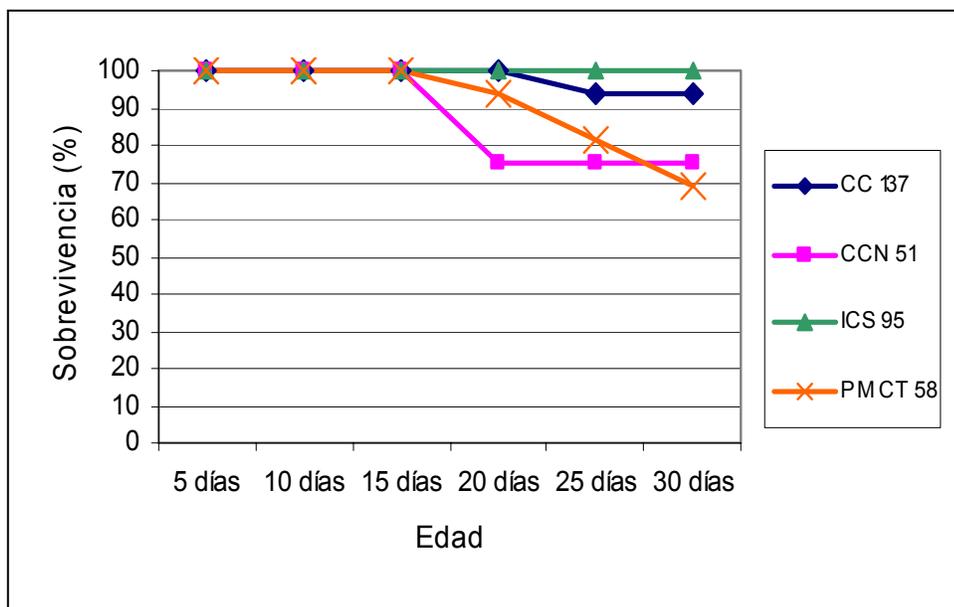


Figura 11. Porcentajes de sobrevivencia a los 30 días de cuatro clones de cacao propagados por ramillas en cuatro sustratos diferentes.

A partir de los 20 días, el área de las hojas dañada se mantuvo constante en los clones CC 137, CCN 51 e ICS 95, mientras que el PMCT 58 a pesar de que mantenía un promedio menor, siguió avanzando hasta superar al ICS 95 después de los 25 días (Cuadro 5).

Cuadro 5. Promedios de área de hoja dañada de cuatro clones de cacao propagados por ramillas desde los 5 hasta los 30 días después de la siembra.

Clon	Edad					
	5 días	10 días	15 días	20 días	25 días	30 días
CC 137	2,75 ^{a/}	3,88	4,25	4,38	4,38	4,38
CCN 51	0,94	2,06	2,25	2,31	2,31	2,31
ICS 95	1,75	3,00	3,31	3,38	3,38	3,38
PMCT 58	0,31	1,19	2,13	2,38	2,56	2,69

^{a/} Escala de área de hoja afectada: 0) 0%, 1) 1-20%, 2) 21-40%, 3) 41-60, 4) 61-80%, 5) 81-100%.

A pesar de que el clon PMCT 58 presentó los promedios de área de hoja afectada más bajos, esto no favoreció su sobrevivencia al final del experimento, pues como ya se indicó, los clones con mayor promedio de

área dañada mostraron una tasa de sobrevivencia de explantes mayor, lo cual parece indicar que las condiciones de baja exposición solar al inicio, no son favorables para los clones PMCT 58 y CCN 51 que son de fácil propagación. Además, se concluyó que las condiciones de sombreamiento al inicio y posterior exposición favorecieron la sobrevivencia de los clones más difíciles de propagar como el CC 137.

Ensayo N°2. *Evaluación de sombra y clones*

A los 15 días de edad se presentó una diferencia altamente significativa entre los clones y los niveles de sombra utilizados, así como una interacción significativa entre ambos factores para la variable de área de hoja afectada. Para esta variable, el clon PMCT 58 fue el que tuvo una mejor respuesta, pues presentó un promedio menor que varió entre 0,02 (propagador sin plástico y sin sarán) y 0,70 (propagador con plástico transparente y sarán al 50%), mientras que el CATIE R4 presentó un promedio entre 0,70 (propagador con plástico de polietileno) y 0,90 (propagador con plástico transparente y sarán al 50%), demostrando la superioridad del PMCT 58 sobre el CATIE R4.

De acuerdo a niveles de sombra, el que presentó un menor promedio fue el 1 (propagador sin plástico y sin sarán) con 0,41, seguido del 3 (plástico de polietileno) con 0,59; el 2 (propagador con sarán al 50%) con 0,64 y por último el 4 (propagador con plástico transparente y sarán al 50%) con un promedio de 0,80 (Cuadro 6). A esta edad, la incidencia de hojas afectadas fue alta para el clon CATIE R4, el cual varió entre 83,3% (nivel de sombra 3) y 100% (niveles 2 y 4). El clon PMCT 58 tuvo una menor incidencia, entre 8,3% (nivel 1) y 83,3% (nivel 4). Según los niveles de sombra, en el que se presentó una mayor incidencia de hojas afectadas fue el nivel 4 con 91,7%, seguido del 2 y 3 con un 79,2% y 66,7% respectivamente y con un menor promedio el nivel 1 con un 50% de incidencia (Cuadro 6). Estos resultados permiten concluir que la sombra es un factor que influye en la aparición del

daño en las hojas, indicando que el nivel de luz de los ambientes 2 y 4 no son suficientes para lograr un efecto positivo en los explantes.

La sobrevivencia de las hojas de acuerdo al nivel de sombra fue de 79,2% en el nivel 3, seguido de un 70,8% en el nivel 1 y luego un 58,3% en los niveles 2 y 4. De acuerdo a los clones, el PMCT 58 presentó una sobrevivencia de hojas de 85,4% y CATIE R4 de 48,4%. Por su parte, el 100% de los explantes se mantuvieron vivos a la edad de 15 días (Cuadro 6).

Cuadro 6. Área de hoja dañada, incidencia según daño en hoja, sobrevivencia de hojas y explantes vivos de dos clones de cacao propagados por ramillas en cuatro niveles de sombra 15 días después de la siembra.

Nivel de sombra ^{a/}	Clon	Área de ^{b/} hoja (0-5)	Incidencia (%)	Sobrevivencia de hojas (%)	Explantes vivos (%)
1	CATIE R4	0,80	91,67	41,67	100,0
	PMCT 58	0,02	8,33	100,0	100,0
2	CATIE R4	0,87	100,0	33,33	100,0
	PMCT 58	0,40	58,33	83,33	100,0
3	CATIE R4	0,70	83,33	66,67	100,0
	PMCT 58	0,47	50,0	91,67	100,0
4	CATIE R4	0,90	100,0	50,0	100,0
	PMCT 58	0,70	83,33	66,67	100,0

^{a/} Nivel de sombra:

1) propagador sin plástico y sin sarán, 2) propagador sin plástico con una cobertura de sarán al 50%, 3) propagador con plástico transparente de polietileno, 4) propagador con plástico transparente de polietileno con una cobertura de sarán al 50%.

^{b/} Escala de área de hoja afectada: 0) 0%, 1) 1-20%, 2) 21-40%, 3) 41-60, 4) 61-80%, 5) 81-100%.

A los 30 días hay diferencia altamente significativa entre clones y niveles de sombra y una interacción altamente significativa entre estos dos factores para la variable de área de hoja afectada. A esta edad el clon PMCT 58 presentó el menor promedio, que fue de 3,33 mientras que CATIE R4 presentó un promedio de 4,92. Por su parte, según el nivel de sombra, el que presentó menor promedio de área de hoja afectada fue el nivel 1 con un 2,5, luego el nivel 3 con 4,2 y el 2 con un promedio de 4,8; mientras el nivel 4 presentó el mayor promedio con un 5,0.

La incidencia de hojas afectadas más alta la presentó el clon CATIE R4, la cual fue de 100% en los niveles de sombra 2, 3 y 4, mientras que en el nivel 1 fue de 91,7%. El valor para el clon PMCT 58 fluctuó entre un 16,7% en el nivel de sombra 1 y un 100% en el nivel 4 (Cuadro 7).

Según el nivel de sombra, hubo una sobrevivencia de las hojas de 54,2% en el nivel 1; un 20,8% en el nivel 3, seguido de un 4,2% y 0% en los niveles 2 y 4 respectivamente. Mientras tanto, de acuerdo a clon utilizado, el que presentó mayor sobrevivencia de hojas fue el PMCT 58 con un 37,5%, mientras el CATIE R4 presentó 2,1%. A esta edad, la sobrevivencia de los explantes varió entre un 83,4% en el nivel de sombra 1 y un 0% en el nivel de sombra 4 (Figura 12); por su parte, el clon PMCT 58 presentó una sobrevivencia de 62,5% y CATIE R4 de 50% (Cuadro 7), concluyéndose que un incremento en el nivel de sombra causa un efecto negativo en la sobrevivencia de los explantes y dificulta la propagación.

Cuadro 7. Área de hoja dañada, incidencia según daño en hoja, sobrevivencia de hojas y explantes vivos de dos clones de cacao propagados por ramillas en cuatro niveles de sombra 30 días después de la siembra.

Nivel de sombra ^{a/}	Clon	Área de ^{b/} hoja (0-5)	Incidencia (%)	Sobrevivencia de hojas (%)	Explantes vivos (%)
1	CATIE R4	4,67	91,67	8,33	66,7
	PMCT 58	0,33	16,67	100,0	100,0
2	CATIE R4	5,00	100,0	0,00	50,0
	PMCT 58	4,67	91,67	8,33	83,3
3	CATIE R4	5,00	100,0	0,00	83,3
	PMCT 58	3,33	75,00	41,67	66,7
4	CATIE R4	5,00	100,0	0,00	0,0
	PMCT 58	5,00	100,0	0,00	0,0

^{a/} Nivel de sombra:

1) propagador sin plástico y sin sarán, 2) propagador sin plástico con una cobertura de sarán al 50%, 3) propagador con plástico transparente de polietileno, 4) propagador con plástico transparente de polietileno con una cobertura de sarán al 50%.

^{b/} Escala de área de hoja afectada: 0) 0%, 1) 1-20%, 2) 21-40%, 3) 41-60, 4) 61-80%, 5) 81-100%.

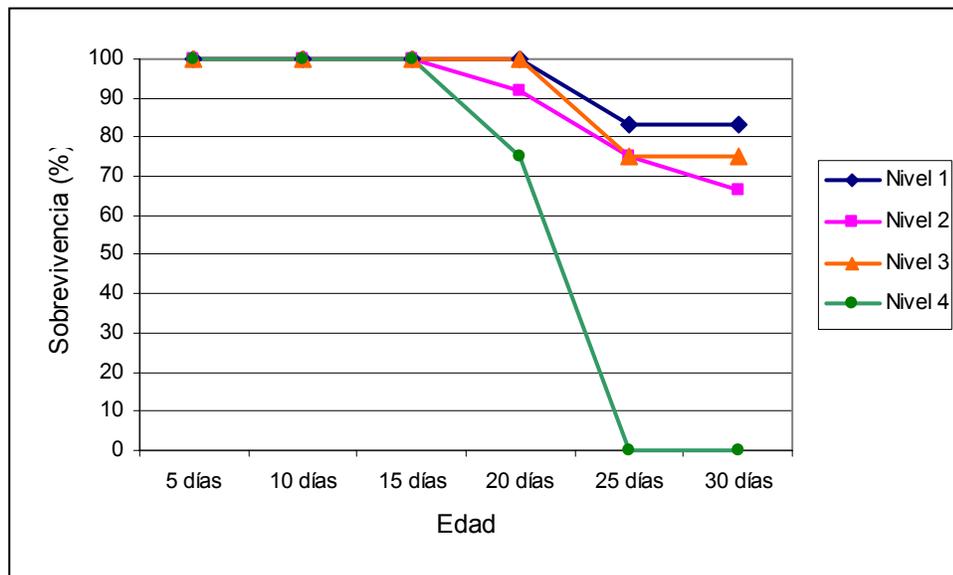


Figura 12. Porcentajes de sobrevivencia de explantes de cacao a los 30 días de acuerdo al nivel de sombra utilizado. Nivel 1) propagador sin plástico y sin sarán, Nivel 2) propagador sin plástico con una cobertura de sarán al 50%, Nivel 3) propagador con plástico transparente de polietileno, Nivel 4) propagador con plástico transparente de polietileno con una cobertura de sarán al 50%.

A los 30 días, de acuerdo a la prueba de Friedman hubo diferencias altamente significativas para la severidad del daño de la hoja tanto entre clones como entre los niveles de sombra. El clon PMCT 58, además de presentar un menor promedio de área de hoja afectada, mostró también un daño menos severo, con un promedio de 5,5; mientras el CATIE R4 registró una severidad de 7,8. El nivel de sombra 1 presentó el menor grado de severidad con un promedio de 4,3, seguido del nivel 3 con un 6,7; luego el nivel 2 con un 7,7 y por último el nivel 4 con un promedio de 8,0 (Cuadro 8).

Cuadro 8. Promedios de severidad del daño de la hoja de dos clones de cacao propagados por ramillas en cuatro niveles de sombra 30 días después de la siembra.

Clon			
Nivel de ^{a/} sombra	CATIE R4	PMCT 58	Promedio
1	7,3 ^{b/}	1,2	4,3
2	8,0	7,3	7,7
3	8,0	5,4	6,7
4	8,0	8,0	8,0
Promedio	7,8	5,5	

^{a/} Nivel de sombra:

1) propagador sin plástico y sin sarán, 2) propagador sin plástico con una cobertura de sarán al 50%, 3) propagador con plástico transparente de polietileno, 4) propagador con plástico transparente de polietileno con una cobertura de sarán al 50%.

^{b/} Escala de severidad del daño de la hoja. 0) hoja sana, 1) clorosis incipiente, 2) clorosis intermedia, 3) clorosis avanzada, 4) clorosis total, 5) necrosis incipiente, 6) necrosis intermedia, 7) necrosis avanzada, 8) necrosis total.

De manera general, el comportamiento de los clones durante los 30 días de evaluación fue muy uniforme, pues durante los primeros 15 días mostraron un ascenso importante en el área de la hoja afectada, cuya pendiente fue menor después de los 20 días. En todas las evaluaciones el clon CATIE R4 mostró un promedio de área afectada mayor que el PMCT 58, tendencia que se mantuvo hasta el final (Cuadro 9).

Cuadro 9. Promedios de área de hoja dañada de dos clones de cacao propagados por ramillas desde los 5 hasta los 30 días después de la siembra.

Edad						
Clon	5 días	10 días	15 días	20 días	25 días	30 días
CATIE R4	1,25 ^{a/}	3,88	4,58	4,71	4,92	4,92
PMCT 58	0,09	1,54	2,29	2,67	3,09	3,33

^{a/} Escala de área de hoja afectada: 0) 0%, 1) 1-20%, 2) 21-40%, 3) 41-60, 4) 61-80%, 5) 81-100%.

Ensayo N°3. Evaluación de sombra, clones y tipo de explante

A los 15 días se registraron diferencias altamente significativas entre clones, ambientes y explantes y una interacción altamente significativa entre clones y

explantes según la variable de área de hoja afectada. De acuerdo al nivel de sombra, el que tuvo mejor respuesta fue el nivel 1 (propagador sin plástico y sin sarán) con un promedio de 2,3, seguido del nivel 2 (propagador con una cobertura de sarán al 50%) con 3,6 y luego los niveles 4 (propagador con tres coberturas de sarán al 50%) y 3 (propagador con dos coberturas de sarán al 50%) con 4,1 y 4,3 respectivamente.

Según el clon, el promedio de daño de hoja más bajo lo presentaron los clones PMCT 58 y CCN 51 con 2,4 y 2,8, seguido de los clones CATIE R4 y PA 169 con 3,9 y 4,0; mientras el CATIE R6 presentó un promedio de 4,8 (Cuadro 10); por lo que se confirmó nuevamente que los clones PMCT y CCN 51 tienen mayor facilidad de propagación y se determinó la dificultad del CATIE R6.

De acuerdo al tipo de explante, la porción apical presentó una menor área afectada con un 3,1, mientras el segmento intermedio mostró un promedio de 4,0 (Cuadro 10).

Los porcentajes de incidencia según el daño de hoja fluctuaron entre un 62,5% para el PMCT 58 y un 100% para CATIE R6. Mientras tanto, los clones CCN 51, PA 169 y CATIE R4 presentaron respectivamente una incidencia de 74,0%, 90,6% y 94,8%. Por otra parte, de acuerdo con el nivel de sombra, los valores de incidencia más bajos se presentaron en los niveles 1 y 2 con un 65,8 y un 86,7 por ciento, mientras en los niveles 3 y 4 hubo una incidencia del 95% y 90% respectivamente (Cuadro 10).

La sobrevivencia de las hojas fue de 68,8% para el clon PMCT 58 y 65,6% para CCN 51; seguidos de CATIE R4 y PA 169, ambos con un 42,7% y por último el CATIE R6 con un 10,4%. Entre los niveles de sombra, el nivel 1 presentó un porcentaje de 80,8, luego de 44,2% del nivel 2, seguido de los niveles 4 y 3 con porcentajes de 35,8 y 23,3 respectivamente (Cuadro 10).

Cuadro 10. Área de hoja dañada, severidad del daño de la hoja, incidencia según daño de hoja, sobrevivencia de hojas y explantes vivos de cinco clones de cacao propagados por ramillas en cuatro niveles de sombra 15 días después de la siembra.

Nivel de sombra ^{a/}	Clon	Explantado ^{b/}	Área de ^{c/} hoja (0-5)	Severidad de ^{d/} daño (0-8)	Incidencia (%)	Sobrevivencia de hojas (%)	Explantados vivos(%)	
1	CCN 51	1	2,00	2,25	50,0	100,0	100,0	
		2	0,50	0,50	50,0	100,0	100,0	
	CATIE R4	1	1,67	2,75	83,33	100,0	100,0	
		2	3,67	4,33	83,33	66,67	100,0	
	CATIE R6	1	3,33	6,75	100,0	66,67	100,0	
		2	5,00	7,83	100,0	16,67	100,0	
	PA 169	1	3,33	5,25	75,0	58,33	100,0	
		2	2,33	2,83	66,67	100,0	100,0	
	PMCT 58	1	0,00	0,00	0,0	100,0	100,0	
		2	1,50	2,00	50,0	100,0	100,0	
	2	CCN 51	1	1,00	0,25	25,0	100,0	100,0
			2	2,00	4,25	100,0	75,0	100,0
CATIE R4		1	3,67	5,17	91,67	66,67	100,0	
		2	5,00	8,00	100,0	0,0	100,0	
CATIE R6		1	5,00	8,00	100,0	0,0	100,0	
		2	5,00	8,00	100,0	0,0	100,0	
PA 169		1	4,67	7,50	100,0	33,33	100,0	
		2	4,33	7,17	100,0	16,67	100,0	
PMCT 58		1	2,00	4,75	100,0	75,0	100,0	
		2	3,00	4,00	50,0	75,0	100,0	
3		CCN 51	1	4,00	6,75	100,0	25,0	100,0
			2	4,00	6,50	100,0	25,0	100,0
	CATIE R4	1	4,33	7,25	100,0	50,0	100,0	
		2	5,00	8,00	100,0	0,0	100,0	
	CATIE R6	1	5,00	8,00	100,0	0,0	100,0	
		2	5,00	8,00	100,0	0,0	100,0	
	PA 169	1	4,00	7,00	100,0	33,33	100,0	
		2	5,00	8,00	100,0	0,0	100,0	
	PMCT 58	1	2,00	2,50	50,0	75,0	100,0	
		2	5,00	7,25	100,0	25,0	100,0	

./...

...Continuación Cuadro 10

Nivel de ^{a/}	Clon	Explantado ^{b/}	Área de ^{c/}	Severidad de ^{d/}	Incidencia	Sobrevivencia	Explantados
------------------------	------	--------------------------	-----------------------	----------------------------	------------	---------------	-------------

sombra			hoja (0-5)	daño (0-8)	(%)	de hojas (%)	vivos(%)
4	CCN 51	1	4,00	6,25	66,67	100,0	100,0
		2	5,00	8,00	100,0	0,0	100,0
	CATIE R4	1	3,00	3,92	100,0	58,33	100,0
		2	5,00	8,00	100,0	0,0	100,0
	CATIE R6	1	5,00	8,00	100,0	0,0	100,0
		2	5,00	8,00	100,0	0,0	100,0
	PA 169	1	3,67	5,58	83,33	66,67	100,0
		2	4,33	7,17	100,0	33,33	100,0
	PMCT 58	1	1,00	0,25	50,0	100,0	100,0
		2	5,00	8,00	100,0	0,0	100,0

a/ Nivel de sombra:

1) propagador sin plástico y sin sarán, 2) propagador con una cobertura de sarán al 50%, 3) propagador con dos coberturas de sarán al 50% y 4) propagador con tres coberturas de sarán al 50%.

^{b/} Tipo de explante: 1) segmento intermedio con dos hojas, 2) segmento apical con cuatro hojas

^{c/} Escala de área de hoja afectada: 0) 0%, 1) 1-20%, 2) 21-40%, 3) 41-60, 4) 61-80%, 5) 81-100%.

^{d/} Escala de severidad del daño de la hoja. 0) hoja sana, 1) clorosis incipiente, 2) clorosis intermedia, 3) clorosis avanzada, 4) clorosis total, 5) necrosis incipiente, 6) necrosis intermedia, 7) necrosis avanzada, 8) necrosis total.

A la edad de 15 días, según la prueba de Friedman, para la variable de severidad de daño de hoja, se presentó una diferencia altamente significativa entre los clones utilizados, sin embargo no existe diferencia entre los testigos CCN 51 y PMCT 58. Los promedios de severidad mostrados fueron de 5,9 para el CATIE R4, 6,3 para el PA 169 y 7,8 para CATIE R6, mientras que los testigos mostraron una severidad menor, que fue de 3,6 el PMCT 58 y el CCN 51 de 4,4 (Cuadro 11).

Se observó también que el aumento en el nivel de sombra tiene un efecto negativo para la propagación, ya que hubo un daño menos severo en las plantas que se mantuvieron más expuestas a la luz en los niveles 1 (propagador sin plástico y sin sarán) y 2 (propagador con una cobertura de sarán al 50%), donde los promedios fueron de 3,4 y 5,8 respectivamente; mientras en el nivel 3 (propagador con dos coberturas de sarán al 50%) fue de 7,0 y en el nivel 4 (propagador con tres coberturas de sarán al 50%) de 6,3.

Cuadro 11. Promedios de severidad del daño de la hoja de cinco clones de cacao propagados por ramillas en cuatro niveles de sombra 15 días después de la siembra.

Clon							
Nivel de ^{a/} sombra	Explante ^{b/}	CATIE R4	CATIE R6	CCN 51	PA 169	PMCT 58	Promedio
1	1	2,8	6,8	2,3	5,3	0,0	3,4
	2	4,3	7,8	0,5	2,8	2,0	3,5
2	1	5,2	8,0	0,3	7,5	4,8	5,2
	2	8,0	8,0	4,3	7,2	4,0	6,3
3	1	7,3	8,0	6,8	7,0	2,5	6,3
	2	8,0	8,0	6,5	8,0	7,3	7,6
4	1	3,9	8,0	6,3	5,6	0,3	4,8
	2	8,0	8,0	8,0	7,2	8,0	7,8
Promedio		5,9	7,8	4,4	6,3	3,6	

^{a/} Nivel de sombra:

1) propagador sin plástico y sin sarán, 2) propagador con una cobertura de sarán al 50%, 3) propagador con dos coberturas de sarán al 50% y 4) propagador con tres coberturas de sarán al 50%.

^{b/} Tipo de explante: 1) segmento intermedio con dos hojas, 2) segmento apical con cuatro hojas.

A la edad de 30 días, hubo diferencia altamente significativa entre clones y entre ambientes, así como entre la interacción de ambos factores para la variable de área de hoja afectada, mientras que no se presentó diferencia entre los explantes utilizados. El clon CCN 51 fue el que tuvo una mejor respuesta, con un promedio de área afectada de 3,8, seguido del PMCT 58 con 4,3; en tanto que los demás clones PA 169, CATIE R4 y CATIE R6 tuvieron promedios de 4,6; 4,8 y 5,0 respectivamente. El nivel de sombra influyó también en los promedios de área de hoja afectada, siendo los más afectados los ambientes 3 y 4 con 4,8; seguido del ambiente 2 con 4,6 y por último el ambiente 1 con 3,5 (Cuadro 12).

La mayor incidencia según el daño en hojas la presentó el clon CATIE R6 con el 100% hojas afectadas, seguido del PA 169 con 99,0%; el CATIE R4 con 97,9% y por último los testigos con porcentajes de 90,6 y 87,5% para CCN 51 y PMCT 58 respectivamente. Los niveles de sombra en los que hubo una menor incidencia fue en el 1 con un 85,8% y el 2 con 95,0%; por su parte, los niveles 3 y 4 presentaron respectivamente una incidencia de 100%

y 99,2%. El incremento en la sombra afectó además la sobrevivencia de las hojas, pues en el nivel 1 sobrevivió el 36,7%, en el nivel 2 el 10,0%, en el nivel 3 el 1,6% y en el nivel 4 solamente el 0,8%.

La sobrevivencia de explantes fue mayor para los testigos, que presentaron un 68,8% (CCN 51) y un 37,5% (PMCT 58). Los clones que tuvieron una menor sobrevivencia fueron el CATIE R6 con 16,7%, el CATIE R4 con 29,2% y el PA 169 con 33,3% (Cuadro 12), por lo que se comprobó que estas condiciones dificultan su propagación mediante el método de ramillas.

En el nivel de sombra 1, donde la tasa de sobrevivencia fue mayor con respecto a los otros niveles, hubo un 100% de sobrevivencia del clon CCN 51 y un 83,3% para CATIE R4, mientras PMCT 58 presentó un 75,0% y los clones CATIE R6 y PA 169 un 50,0% cada uno, por lo tanto se considera que de las condiciones evaluadas durante la investigación, estas fueron las más adecuadas para facilitar la propagación (Figura 13).

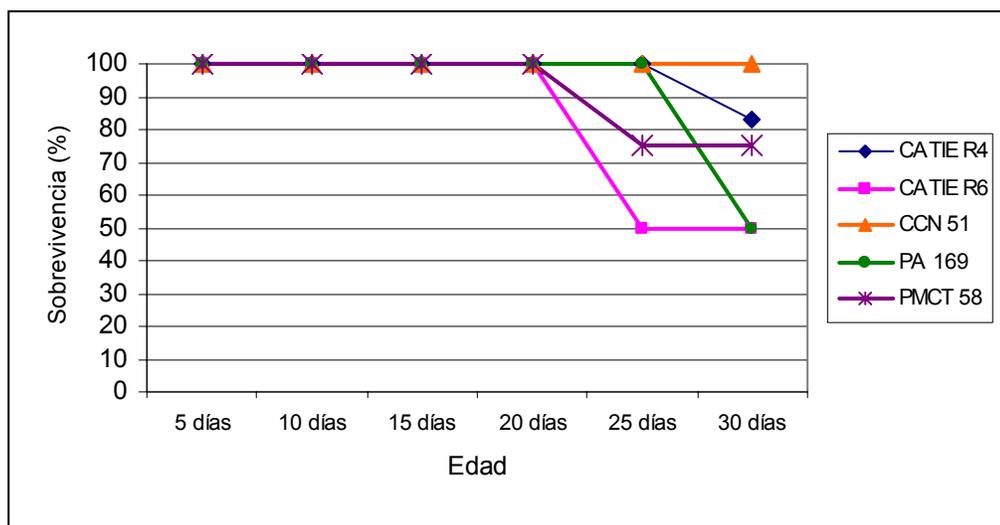


Figura 13. Porcentajes de sobrevivencia a los 30 días de cinco clones de cacao propagados por ramillas en un sistema abierto bajo la sombra del sarán del vivero al 50%.

Cuadro 12. Área de hoja dañada, severidad del daño de la hoja, incidencia según daño de hoja, sobrevivencia de hojas y explantes vivos de cinco clones de cacao propagados por ramillas en cuatro niveles de sombra 30 días después de la siembra.

Nivel de sombra ^{a/}	Clon	Explante ^{b/}	Área de ^{c/} hoja (0-5)	Severidad de ^{d/} daño (0-8)	Incidencia (%)	Sobrevivencia de hojas (%)	Explantos vivos(%)
1	CCN 51	1	2,0	3,0	75,0	75,0	100,0
		2	0,5	0,8	50,0	100,0	100,0
	CATIE R4	1	4,3	6,9	100,0	25,0	66,7
		2	4,3	4,0	83,3	16,7	100,0
	CATIE R6	1	5,0	8,0	100,0	0,0	33,3
		2	5,0	8,0	100,0	0,0	66,7
	PA 169	1	4,0	6,6	100,0	25,0	33,3
		2	3,3	4,8	100,0	50,0	66,7
	PMCT 58	1	4,0	6,5	100,0	25,0	100,0
		2	2,5	4,0	50,0	50,0	50,0
2	CCN 51	1	2,0	3,5	75,0	75,0	100,0
		2	5,0	8,0	100,0	0,0	0,0
	CATIE R4	1	5,0	8,0	100,0	0,0	0,0
		2	5,0	8,0	100,0	0,0	0,0
	CATIE R6	1	5,0	8,0	100,0	0,0	33,3
		2	5,0	8,0	100,0	0,0	0,0
	PA 169	1	5,0	8,0	100,0	0,0	0,0
		2	5,0	8,0	100,0	0,0	33,3
	PMCT 58	1	5,0	8,0	100,0	0,0	0,0
		2	4,0	6,0	75,0	25,0	50,0
3	CCN 51	1	5,0	8,0	100,0	0,0	100,0
		2	5,0	8,0	100,0	0,0	50,0
	CATIE R4	1	5,0	8,0	100,0	0,0	33,3
		2	5,0	8,0	100,0	0,0	0,0
	CATIE R6	1	5,0	8,0	100,0	0,0	0,0
		2	5,0	8,0	100,0	0,0	0,0
	PA 169	1	4,7	7,5	100,0	16,7	66,7
		2	5,0	8,0	100,0	0,0	0,0
	PMCT 58	1	5,0	8,0	100,0	0,0	100,0
		2	5,0	8,0	100,0	0,0	0,0

./...

...Continuación Cuadro 12

Nivel de sombra ^{a/}	Clon	Explante ^{b/}	Área de ^{c/} hoja (0-5)	Severidad de ^{d/} daño (0-8)	Incidencia (%)	Sobrevivencia de hojas (%)	Explantos vivos(%)
-------------------------------	------	------------------------	----------------------------------	---------------------------------------	----------------	----------------------------	--------------------

4	CCN 51	1	5,0	8,0	100,0	0,0	100,0
		2	5,0	8,0	100,0	0,0	0,0
	CATIE R4	1	5,0	8,0	100,0	0,0	33,3
		2	5,0	8,0	100,0	0,0	0,0
	CATIE R6	1	5,0	8,0	100,0	0,0	0,0
		2	5,0	8,0	100,0	0,0	0,0
	PA 169	1	4,7	7,3	91,7	8,3	66,7
		2	5,0	8,0	100,0	0,0	0,0
	PMCT 58	1	5,0	8,0	100,0	0,0	0,0
		2	5,0	8,0	100,0	0,0	0,0

a/ Nivel de sombra:

1) propagador sin plástico y sin sarán, 2) propagador con una cobertura de sarán al 50%, 3) propagador con dos coberturas de sarán al 50% y 4) propagador con tres coberturas de sarán al 50%.

^{b/} Tipo de explante: 1) segmento intermedio con dos hojas, 2) segmento apical con cuatro hojas

^{c/} Escala de área de hoja afectada: 0) 0%, 1) 1-20%, 2) 21-40%, 3) 41-60, 4) 61-80%, 5) 81-100%.

^{d/} Escala de severidad del daño de la hoja. 0) hoja sana, 1) clorosis incipiente, 2) clorosis intermedia, 3) clorosis avanzada, 4) clorosis total, 5) necrosis incipiente, 6) necrosis intermedia, 7) necrosis avanzada, 8) necrosis total.

A los 30 días después de iniciado el ensayo, según la prueba de Friedman, se encontró que hubo deferencia altamente significativa entre los clones y según el nivel de sombra para la variable de severidad del daño de la hoja. Los clones testigos CCN 51 y PMCT 58 mostraron la severidad del daño menor, cuyos promedios fueron de 5,9 y 7,1 respectivamente. El clon que resultó con un daño más severo fue el CATIE R6 con un promedio de 8,0; seguido del CATIE R4 con 7,5 y luego el PA 169 con 7,3. De esta manera se comprobó que los clones CATIE R6 y CATIE R4 son los de mayor dificultad para propagar (Cuadro 12).

Además se pudo confirmar que un menor porcentaje de sombra es una condición en que la propagación se ve favorecida, pues en el nivel 1 la severidad fue en promedio de 5,9; en tanto que en el nivel 2 de 7,6 y en los niveles 3 y 4 de 7,9 (Cuadro 12).

De acuerdo al comportamiento de los clones durante los 30 días de evaluación, pudo reafirmarse la diferencia que existe entre los mismos en su respuesta. De forma general, la mayoría de los clones mantuvo un comportamiento similar a partir de los 25 días, momento en que el área de

hoja afectada mostró un aumento más leve en relación a los primeros días en que el área afectada aumenta más rápidamente (Cuadro 13).

Cuadro 13. Promedios de área de hoja dañada de cinco clones de cacao propagados por ramillas desde los 5 hasta los 30 días después de la siembra.

Clon	Edad					
	5 días	10 días	15 días	20 días	25 días	30 días
CATIE R4	0,46 ^{a/}	2,92	3,92	4,46	4,71	4,83
CATIE R6	1,21	4,00	4,79	5,00	5,00	5,00
CCN 51	0,42	2,42	2,83	3,42	3,67	3,75
PA 169	0,96	3,17	3,96	4,46	4,58	4,58
PMCT 58	1,58	2,42	2,83	3,75	4,08	4,33

^{a/} Escala de área de hoja afectada: 0) 0%, 1) 1-20%, 2) 21-40%, 3) 41-60, 4) 61-80%, 5) 81-100%.

5. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en los ensayos previos mostraron que el manejo de los factores ambientales tiene un rol importante en la sobrevivencia de los explantes y por tanto, en el desarrollo de las nuevas plantas. Tal como se evidenció en la prueba N° 1, el riego es probablemente uno de los factores de más influencia en el estado del material.

A pesar de que con el uso del sistema cerrado para la propagación hubo condensación de agua y por ende un aumento en la humedad relativa dentro del sistema, estas condiciones no son suficientes para favorecer la sobrevivencia del cacao, pues hubo un sobrecalentamiento en el interior del propagador, lo cual provocó posiblemente que la tasa de respiración superara la tasa fotosintética causando marchitez en las hojas (Hernández y Leal 1997), que fue muy visible en los explantes.

Aunque este sistema permite resultados exitosos en la multiplicación de especies forestales (Leakey *et al.* 1990, Mesén 1998), la sensibilidad del cacao a la escasez de agua (Enríquez 2004) provocó su muerte.

De acuerdo con Salisbury y Ross (1994), las plantas superiores se ven limitadas por la disponibilidad de agua, ya que cuando ésta es un factor limitante, el potencial hídrico se torna muy negativo, por lo que la expansión celular se retarda y disminuye el crecimiento celular.

Además, la limitación de agua en las células trae consigo la aparición de daños fisiológicos en los tejidos debidos a la pérdida de la turgencia, dada por la pared celular que favorece el aumento en la presión; de esta manera las células turgentes aportan gran parte de la rigidez necesaria en las partes no leñosas de las plantas.

Al mismo tiempo, el estrés hídrico provocado por la limitación de agua estimula el cierre de los estomas y restringe, por lo tanto, la captación de CO₂, limitando la tasa fotosintética, cuyo efecto se ve reflejado principalmente en el daño fisiológico de los tejidos foliares de las plantas.

A pesar de que se aumentó la frecuencia de riego con respecto a las primeras pruebas, es probable que el daño observado en los explantes cuando se incrementó la exposición solar sea debido a un insuficiente suministro de agua, ya que Faria y Sacramento (2003) reportan resultados exitosos utilizando regímenes de riego de 30 segundos cada cinco minutos durante los primeros dos meses, mientras que por las características del sistema automático utilizado, se aplicó un riego de 30 segundos cada 30 minutos, el cual es aún bastante menor al recomendado.

La alta incidencia de daño en las hojas presentada principalmente en los ensayos previos, pudo ser favorecida también por los componentes del sustrato, ya que por su disponibilidad se utilizó un aserrín fresco, a pesar de que es recomendable usar uno que haya sufrido un proceso de descomposición previo, pues de lo contrario su tasa de descomposición y demanda de nitrógeno es alta, al tiempo que puede contener toxinas como resinas o taninos que favorecen la acidez del sustrato (VIFINEX 2002).

Según Marrocos *et al.* (2003) y Sodré *et al.* (2005) la clorosis de las hojas puede ser causada por el exceso de hierro en los tejidos foliares debido al alto contenido de este elemento en el sustrato, al ambiente de reducción y al bajo pH; factores que contribuyen a aumentar la disponibilidad de este elemento para las plantas y a disminuir la disponibilidad de micronutrientes.

Al parecer las diferencias encontradas en algunos casos en cuanto a la formación de raíces o de callo pudo deberse a condiciones fisiológicas de la planta de donde provino la estaca, pues esto es un proceso controlado hormonalmente y no es afectado por el nivel nutricional del sustrato ni por sus propiedades (Mesén 1998).

Las raíces laterales crecen por lo general opuestas a las puntas del protoxilema, hacia fuera a través de la corteza y epidermis y se originan de los iniciadores radicales que se encuentran en el periciclo, localizado afuera y entre los haces vasculares. Este grupo de células continúa dividiéndose

hasta formar grupos de muchas células que se convierten en los primordios radicales, los cuales dan origen a las raíces (Hartmann y Kester 1990).

El crecimiento radical implica una secreción de enzimas hidrolíticas por la raíz adventicia que digieren las paredes de la corteza y de la epidermis (Salisbury y Ross 1994).

Sin embargo, algunas veces se da el crecimiento de una masa irregular de células de parénquima, en varios estados de lignificación, que se origina de las células de la región del cambium vascular y el floema, así como de las células de la corteza y la médula en algunos casos. Esta masa de células, llamada callo, con frecuencia contribuye con la aparición de las raíces, a pesar de que se conoce que la formación de ambos es independiente entre sí (Hartmann y Kester 1990). No obstante, aunque el callo no conduce a la rizogénesis, éste proporciona una capa protectora que retarda el desarrollo de pudrición e impide el ataque de patógenos, permitiendo la sobrevivencia de la estaca por largos períodos aún sin mantener actividad aparente, hasta que agota las reservas energéticas, lo cual la conduce a la muerte (Hartmann y Kester 1990, Mesén 1998). Lo anterior, probablemente, pudo haber contribuido con la muerte de las ramillas con callo después de su trasplante a bolsa, pues a pesar sobrevivir en las condiciones del propagador, no sobrevivieron cuando se colocaron fuera de éste.

Por su parte, Mesén (1998) indica que la aparición de las raíces adventicias está más relacionada con la aplicación de fitoreguladores auxínicos, los cuales actúan como promotores del crecimiento aumentando el porcentaje de enraizamiento, reduciendo el tiempo de iniciación y mejorando la calidad del sistema radical. Estos compuestos ejercen su acción mediante la traslocación masiva de sus componentes hacia arriba a través del xilema (Hartmann y Kester 1990, Hernández y Leal 1997).

Además, el uso de AIB como promotor de enraizamiento tiene la ventaja de que no es tóxico en un amplio rango de concentraciones, no es degradado por la luz o microorganismos y es insoluble en agua, por lo que permanece

más tiempo en el sitio de aplicación, lo cual pudo favorecer la formación de raíces. A pesar de que no se observaron diferencias en los resultados según la técnica de aplicación de la hormona, se optó por utilizar la mezcla en polvo con talco neutro por su simplicidad y rapidez, pues Mesén (1998) menciona que es difícil controlar la cantidad absorbida cuando se utiliza alcohol como solvente, además de la necesidad de evaporar el alcohol, por lo que no se descarta que los explantes tratados con el mismo hayan sufrido deshidratación por el efecto del disolvente.

La diferencia mostrada en cuanto a la formación de raíces durante el período de establecimiento, además de ser determinado por los factores antes mencionados, otros como el genotipo, la época de colecta, los cuidados durante la preparación y el tiempo transcurrido entre la colecta y la siembra pueden afectar el porcentaje de enraizamiento (Faria y Sacramento 2003).

La formación de las raíces es uno de los aspectos de más importancia en los sistemas de propagación clonal mediante estacas y ramillas, ya que existe un temor generalizado de que éstas pueden tener sistemas radicales inferiores a los de plantas provenientes de semillas y ser susceptibles al volcamiento, sin embargo, de acuerdo con Leakey y Mesén (s.f.) no existe tal riesgo. A pesar de que no poseen una raíz pivotante, las ramillas tienden a formar un sistema horizontal con capacidad de formar raíces penetrantes. Aunque puede haber problemas de estabilidad por el viento, la posibilidad disminuye si se utilizan materiales de fácil enraizamiento y las técnicas que aseguren la formación de raíces vigorosas y con una distribución adecuada.

El uso de los tubetes es por lo tanto, una práctica que facilita la propagación del cacao, ya que por su forma de cono, induce un desarrollo radical dirigido con bastantes raicillas y pelos absorbentes y estimula el desarrollo de una raíz principal que actúa como raíz pivotante. Igualmente, su diseño facilita la extracción de la planta para su siembra, ya que las raíces forman una especie de enmallado permitiendo que el sustrato se compacte para evitar la siembra a raíz desnuda (Palencia y Mejía s.f.). Debido a esto los porcentajes

de muerte de ramillas enraizadas una vez que se trasplantaron fueron relativamente bajos en relación con las que contaban con callo.

De acuerdo con los resultados obtenidos, al parecer, la disponibilidad de luz es uno de los factores de mayor importancia, razón por la cual los niveles de sombra más bajos favorecieron la sobrevivencia y por ende la propagación.

La luz está relacionada con el comportamiento fisiológico de la planta, ya que la tasa fotosintética se ve amplificada tanto por el incremento en los niveles de luminosidad como por mayores concentraciones de CO₂, principalmente cuando los estomas se cierran como respuesta a las condiciones del ambiente. En contraste, a niveles bajos de luz la concentración intercelular de CO₂ puede convertirse en el principal factor limitante, mientras que la respuesta al aumento de luz puede equilibrar el requerimiento de CO₂ para la fotosíntesis y favorecer la concentración intercelular del mismo (Salisbury y Ross 1994).

Por las razones mencionadas, el uso de un sistema abierto y con mayor exposición solar resultó más eficiente para la propagación. Salisbury y Ross (1994) indican que el viento aporta más CO₂ y aleja el vapor de agua, lo que podría causar un aumento en la transpiración y la toma de CO₂, sin embargo la concentración intercelular de éste, por el contrario favorece el cierre parcial de los estomas. Además el viento actúa en la disminución de la temperatura del sistema, lo cual también promueve la reducción de la transpiración y a la vez el mantenimiento de la turgencia celular.

El daño presente en las hojas pudo estar relacionado además con el nivel de sombra en que se mantuvieron los explantes, pues existe una clara relación entre el nivel de sombra y los niveles de carbohidratos presentes en los tejidos. Con el incremento en el nivel de sombra se ha observado que se presenta una disminución en la concentración de carbohidratos, afectando los tejidos y el crecimiento celular (Taylor y Hadley 1987).

Cunningham y Burridge (1960) afirman que las plántulas de cacao no requieren de condiciones de sombreado para alcanzar un crecimiento

óptimo si el suministro de agua y nutrientes es adecuado de manera que no limite el crecimiento, lo cual pudo observarse en los resultados en que se aplicó un riego más frecuente y se adicionó fertilizante al sustrato.

Además, la sombra es un complejo factor que interviene en el crecimiento del cacao, cuyo efecto no se limita a la reducción de la intensidad lumínica, sino que tiene participación limitando el daño por insectos y heridas, reduciendo la competencia por nutrientes y agua, manteniendo una humedad relativa alta y permitiendo el uso de suelos con bajo contenido nutricional (Cunningham y Burridge 1960).

Tal como se observó, en la mayoría de los casos, el daño en las hojas condujo a la caída de las mismas, lo cual probablemente se deba a un mecanismo de respuesta de las células al estrés a que es sometida la planta. Cuando esto sucede, inicialmente las hojas muestran pérdida de clorofila (amarillamiento), ARN y proteínas, así como una disminución en el transporte de nutrientes (Salisbury y Ross 1994).

En la mayoría de las especies, la defoliación es precedida por la formación de una capa de abscisión que se forma a través del peciolo cerca de su articulación con el tallo. Esta zona consiste en una o más capas de células de parénquima con paredes delgadas que se originan de divisiones anticlinales, acompañada de la síntesis de enzimas que hidrolizan polisacáridos como celulasa y pectinasas presentes en la zona de abscisión, facilitando la defoliación (Salisbury y Ross 1994).

Las investigaciones realizadas en forma independiente por Cooper, Rappaport y Sachs citadas por Hartmann y Kester (1990) han confirmado que la presencia de las hojas en las estacas ejerce una fuerte influencia estimuladora en la iniciación de raíces, debida a los carbohidratos que resultan de la actividad fotosintética de las hojas, por lo tanto, la muerte de las plantas que no portaban hojas supo ser motivada por la falta de raíces y por las deficiencias de carbono producidas por la carencia de hojas (Odegbaro y Adedipe 1986).

Esto también pudo ser favorecido por el tipo de explante utilizado, pues la presencia de cuatro hojas en los explantes apicales, en contraste con las dos hojas presentes en los segmentos intermedios, posiblemente provocó un aumento en la tasa fotosintética de la planta, favoreciendo la sobrevivencia y por lo tanto, la propagación.

Las diferencias entre las respuestas de acuerdo a los clones son debidas tanto a los factores ambientales como a su composición genética, ya que existe una marcada variabilidad genética en el cacao respecto al efecto de la exposición solar y el crecimiento y desarrollo de las hojas (Galyuon *et al.* 1996). No obstante, estas diferencias pueden presentarse incluso entre diferentes árboles del mismo clon y diferentes partes del mismo árbol e incluso de la misma rama (Odegbaro y Adedipe 1986).

Odegbaro y Adedipe (1986) realizaron una clasificación de híbridos de acuerdo a las diferencias en su respuesta, sin embargo, mencionan que el tratamiento con reguladores como el AIB reduce la brecha entre clones y dificulta la clasificación, por lo tanto, se podría pensar que las diferencias encontradas entre los clones estudiados podrían ser más marcadas si no se tratan con soluciones hormonales.

En la brotación de las yemas para la obtención de nuevos tallos, la luz es el factor morfogénico más importante, pues tiene participación en la diferenciación de yemas axilares a brotes vegetativos. Se ha comprobado que la iluminación modifica el crecimiento al cambiar la proporción de las diferentes hormonas en los tejidos, por lo que favorece el desarrollo de las plantas (Aguila *et al.* 1995). La formación de los brotes en las ramillas aumentó al ser colocadas en condiciones de menor sombreadamiento, lo cual posiblemente actuó como estímulo para interrumpir la latencia de las yemas, pues esto se logra con la exposición a luz continua y con temperaturas moderadas (Salisbury y Ross 1994).

Además del efecto de la luz sobre la brotación, ésta ejerce también su efecto en el desarrollo de las hojas nuevas, por lo que se espera una respuesta

positiva en las ramillas establecidas en condiciones de alta luminosidad. De acuerdo con Galyuon *et al.* (1996), las plantas desarrolladas bajo sombras de 50% presentan mayor crecimiento y elongación de entrenudos que las expuestas totalmente al sol, al tiempo que un mayor grado de exposición provoca un incremento en el grosor de las hojas por tener un mejor desarrollo de mesófilo y parénquima de empalizada, así como una epidermis y cutícula más gruesas, lo cual reduce el efecto de la alta irradiación y mejora la eficiencia y utilización de la luz al ser plantadas en el campo.

6. CONCLUSIONES

1. El uso de un sistema cerrado con agua en el fondo de la pila no fue suficiente para crear las condiciones óptimas que permitan la propagación vegetativa del cacao mediante ramillas.
2. Al inicio de la fase de establecimiento, los explantes formados por la porción apical de la rama fueron los más adecuados para la propagación, sin embargo, el comportamiento de ambos explantes se igualó al final, por lo se debe estudiar aún más su efecto en la sobrevivencia.
3. No se requirió una humedad relativa cercana al 100% en el ambiente de propagación para lograr la sobrevivencia de los explantes de cacao durante el enraizamiento, en tanto que hubiera un riego frecuente que asegurara la disponibilidad de humedad.
4. La humedad permanente en el sistema es fundamental para la sobrevivencia, por lo que la aplicación de riego sobre las ramillas es esencial para permitir la propagación vegetativa, de manera que se debe proveer un riego de al menos 30 segundos cada 30 minutos.
5. A diferencia con otras especies como las forestales, los altos niveles de sombra (superiores al 50%) tuvieron un efecto negativo sobre las ramillas en la etapa de establecimiento.
6. Las condiciones más favorables para realizar la propagación de cacao fueron: un nivel de sombra cercano al 50% complementado con un régimen de riego de poca intensidad y de alta frecuencia.

7. El tratamiento de los explantes con AIB a una concentración de 6 000 ppm permitió la propagación, pues fue perceptible la formación de raíces entre los 20 y 30 días después de la siembra.
8. En los estados iniciales, se observó que el sustrato no ejercía ningún efecto sobre la sobrevivencia de las ramillas, sin embargo, durante todo el período se observó que el sustrato tierra + aserrín complementado con fertilizante favoreció la propagación debido al efecto positivo de los elementos adicionados.
9. El estado de conservación de las plantas madre, sea en vivero o en el campo, aparentemente tiene un efecto en la facilidad de propagación de cacao, el cual debe ser evaluado en estudios posteriores.
10. Existe diferencia entre los clones de acuerdo a su facilidad para ser propagados por medio de ramillas, siendo los más sencillos: CCN 51, PMCT 58 e ICS 95; los de facilidad intermedia: EET 183, PA 169 y CATIE R4 y los de mayor dificultad: CATIE R6, UF 273 Tipo 1 y CC 137.
11. Se observó que las plántulas que perdieron sus hojas se murieron al ser trasplantadas, por lo que se considera que de las variables evaluadas, la sobrevivencia de las hojas es la más importante, ya que define la capacidad de sobrevivencia del explante y la brotación de las yemas durante la etapa de aclimatación.
12. Las variables área de hoja afectada y severidad del daño de la hoja permiten predecir el comportamiento del explante durante la fase de establecimiento después de la siembra.

13. En observaciones preliminares se comprobó que las plántulas provenientes de ramillas, al ser sembradas en vivero tuvieron un desarrollo normal y presentaron órganos y tejidos con vigorosidad.
14. Es factible propagar plantas de cacao mediante el método de ramillas en el CATIE, sin embargo, será necesario hacer algunos ajustes en el sistema con el fin de aumentar los porcentajes de sobrevivencia.

7. RECOMENDACIONES

1. El método evaluado se considera promisorio, por lo que se recomienda continuar con los esfuerzos para aumentar la tasa de sobrevivencia y explorar los siguientes factores:

Riego: Utilizar un régimen de riego de poca intensidad pero de alta frecuencia (30 segundos cada cinco minutos) de manera que la superficie de las hojas mantengan una humedad tal que se disminuya la pérdida de agua por transpiración.

Sombra: Estudiar la necesidad de sombreamiento de acuerdo al clon y según las condiciones ambientales presentes en la época de siembra.

Procedencia del material: Evaluar materiales procedentes de vivero y del campo para determinar su efecto en la respuesta a la propagación.

2. Con el fin de determinar la densidad óptima de ocupación de las bandejas, se recomienda evaluar el efecto de ésta en la sobrevivencia de los explantes.
3. Evaluar la respuesta de los clones en diferentes épocas del año para determinar el efecto de la variación de las condiciones ambientales en la eficiencia del método.
4. Maximizar la capacidad del área de siembra, mediante el uso de un panel de metal para la ubicación de las bandejas en condiciones de sombreamiento y suministro de riego adecuados, de forma tal que se pueda prescindir de una estructura tan compleja y costosa como la utilizada en esta investigación.

5. Incluir como testigos en los diversos ensayos un clon de alta facilidad, uno de facilidad intermedia y uno de mayor dificultad.
6. Estudiar el efecto de la desinfección de los explantes con algún fungicida, así como la concentración óptima para evitar la diseminación de patógenos provenientes del campo en las nuevas plantas.
7. Contar con una fuente permanente de material vegetativo cercana al área de siembra, con el fin de asegurar el buen estado y las propiedades del mismo durante su preparación.
8. Estudiar en el campo el desarrollo de las plantas obtenidas mediante el método de las ramillas para determinar su capacidad de adaptación y desempeño en su ambiente de producción.
9. Probar otras técnicas convencionales de esterilización del sustrato diferentes al autoclave con el fin de facilitar la implementación del método.

8. BIBLIOGRAFÍA

- AIME, M.C; PHILLIPS-MORA, W. 2005. The causal agents of witches' broom and frosty pod rot of cacao (chocolate, *Theobroma cacao*) form a new lineage of Marasmiaceae. *Mycologia* 97(5):1012-1022.
- AGUILA, R; LÓPEZ, H; BEDOLLA, A. 1995. Efecto de diferentes porcentajes de luz en la producción de ejes múltiples en plántulas de café (*Coffea arabica* L.). En: Simposio de Caficultura Latinoamérica. (XV 1992. Veracruz, MX) s.p.
- AGUILAR, M. 1990. Obtención de plantas de cacao (*Theobroma cacao* L.) a partir del microinjerto de embriones somáticos. Tesis M.Sc. Turrialba, CR. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. 131 p.
- ARANZAZU, F; CASTILLO, J; ZULUAGA, L. 2000. Escoba de bruja en Colombia. Su impacto económico y manejo. En: Tecnología para el Mejoramiento del Sistema de Producción de Cacao. Mejía L; Argüello, O. comps. CORPOICA. Bucaramanga, CO. p. 85-90.
- ARCINIEGAS, A. 2005. Caracterización de árboles superiores de cacao (*Theobroma cacao* L.) seleccionados por el Programa de Mejoramiento Genético del CATIE. Tesis M.Sc. Turrialba, CR. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. 126 p.
- ARGÜELLO, O. 2000. Manejo integrado de monilia en cacao (*Theobroma cacao* L.) en Santader. En: Tecnología para el Mejoramiento del Sistema de Producción de Cacao. Mejía L; Argüello, O. comps. CORPOICA. Bucaramanga, CO. p. 74-84.
- CATIE, 2005. Selection and Generation of Moniliasis Resistant Cacao Genotypes and Maintenance and Conservation of the International Cacao Collection. WCF/CATIE Project. 2004 Annual Report. En: Cocoa Productivity and Quality Improvement, a Participatory Approach. Appendix to the General Progress Report Year 1. IPGRI comp. s.l. s.p.
- CCI (Centro de Comercio Internacional, CH), 2001. Cacao: Guía de prácticas comerciales. Centro de Comercio Internacional UNCTAD/OMC. Ginebra, CH. 188 p.

- CHANATÁSIG, C. 2004. Inducción de la embriogénesis somática en clones superiores de cacao (*Theobroma cacao* L.), con resistencia a enfermedades fungosas. Tesis M.Sc. Turrialba, CR. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. 86 p.
- CONABIO, 2004. *Theobroma cacao*. (en línea). México D.F., MX. Consultado 20 jul. 2006. Disponible en: http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/info_especies/arboles/doctos/68-sterc03m.pdf
- CUNNINGHAM, R; BURRIDGE, J. 1960. The growth of cacao (*Theobroma cacao*) with and without shade. *Annals of Botany*. 24(96):458-462.
- EHLERT, P; LUZ, J; INNECCO, R. 2004. Propagação vegetativa de Ifavaca-cravo utilizando diferentes tipos de estacas e substratos. *Horticultura Brasileira*. 22(1):10-13.
- ENRÍQUEZ, G. 2004. Cacao orgánico. Guía para productores ecuatorianos. Manual N°54. Instituto Nacional Autónomo de investigaciones Agropecuarias. Quito, EC. 360 p.
- ESKES, B. 2001. Introductory Notes. En: *Proceedings of the International Workshop on New Technologies and Cocoa Breeding*. Kota Kinabalu, MY. p. 8-11.
- FARIA, J; SACRAMENTO, C DO. 2003. Enraizamento e crescimento de estacas herbáceas do cacauero (Clones CEPEC 42, TSH 516 e TSH 1188) em função da aplicação do Ácido indolbutírico (AIB). *Rev. Bras. Frutic. Jaboticabal* 25(1):192-194.
- FHIA (FUNDACIÓN HONDUREÑA DE INVESTIGACIÓN AGRÍCOLA, HN). 2003. Identificación y control de la moniliasis del cacao. Centro de Comunicación Agrícola de la FHIA. La Lima, Cortés, HN. 19 p.
- FLORES, F; VERA, J. 1995. Influencia de la fenología sobre el enraizamiento de ramillas y prendimiento de injertos en clones de cacao. *El Cacaotero Colombiano*. 14(40):26-34.
- GALYUON, I; McDAVID, C; LÓPEZ, F; SPENCE, J. 1996. The effect of irradiance level on cocoa (*Theobroma cacao* L.): I. Growth and leaf adaptations. *Tropic. Agric. (Trinidad)*. 73(1):23-28.
- GUTIÉRREZ, A. 2003. Propagación del burío (*Heliocarpus appendiculatus* Turcz.) por semillas, estacas y acodos. Tesis M.Sc. Turrialba, CR. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. 107 p.

- HARTMANN, H; KESTER, D. 1990. Propagación de plantas. Principios y prácticas. Trad. A. Marino. 4 reimpresión. México. Editorial CECSA. 693 p.
- HERNÁNDEZ, S; LEAL, F. 1997. Enraizamiento de estacas de cacao. Revista Unellez de Ciencia y Tecnología 15(1):1-12.
- ICCO (Organización Internacional del Cacao, UK) 2006. Informe Anual 2004/2005. (en línea). Londres, UK. Consultado 31 oct. 2006. Disponible en <http://www.icco.org/anrep/anrep0405spanish.pdf>.
- JULY, W. 2002. Comportamiento de estacas de tres variedades de cacao (*Theobroma cacao* L.) con tres tipos de fitohormonas en la región de Alto-Beni. Tesis Grado. La Paz, BO. Universidad Mayor de San Andrés. 85 p.
- LEAKEY, R; MESÉN, F. s.f. Métodos de propagación vegetativa en árboles tropicales: enraizamiento de estacas suculentas. En: Manual sobre Mejoramiento Genético Forestal con referencia especial a América Central. Eds. JP Cornelius; JF Mesén; EA Corea. Turrialba, CR. CATIE. p. 147-167.
- _____; MESÉN, J; TCHOUNDJEU, Z; LONGMAN, K; DICK, J; NEWTON, A; MATIN, A; GRACE, J; MUNRO, R; MUTHOKA, P. 1990. Low-technology techniques for the vegetative propagation of tropical trees. Commonwealth Forestry Review. 69(3):247-257.
- LEÓN, J. 2000. Botánica de los cultivos tropicales. 3 ed. San José, CR. Editorial Agroamérica del IICA. 522 p.
- LIMA, J; PACHECO, R; ROSA, I; SILVA, R; AGUILAR, M; VALLE, R. 2001. Recomendações para o plantio de mudas de cacau propagadas por estaquia. Ed. Marques, J. CEPLAC/CEPEC. Ihéus-Bahia, BR. 34 p.
- LÓPEZ-BAEZ, O; MORENO-MARTINEZ, J; PACHECO-RODAS, S. 2001. Avanzos en propagación de cacao -*Theobroma cacao*- por embriogénesis somática en México. En: Proceedings of the International Workshop on New Technologies and Cocoa Breeding. Kota Kinabalu, MY. p. 169-183.
- MARROCOS, P; SODRÉ, G; PACHECO, R; PEREIRA, A. 2003. Diagnóstico da produção de mudas do Instituto Biofábrica de Cacau. En: 14th International Cocoa Research Conference Ghana 2003. Actas. Cocoa Producers' Alliance. MY. p. 443-447.

- MESÉN, F. 1998. Enraizamiento de estacas juveniles de especies forestales: uso de propagadores de sub-irrigación. Turrialba, CR. Proyecto de Semillas Forestales, CATIE. 36 p.
- ODEGBARO, O; ADEDIPE, N. 1986. Rooting classification and culture responses of some cacao hybrids. Turrialba. Revista Interamericana de Ciencia Agrícolas. 36(2):197-204.
- PALACIOS, J; MONTEIRO, W. 2001. Mass Multiplication on a Semi-industrial Scale of Cocoa Clones by Rooted Cuttings in Brazil. En: Proceedings of the International Workshop on New Technologies and Cocoa Breeding. Kota Kinabalu, MY. p. 184-190.
- PALENCIA, G. 2000. Propagación del árbol de cacao. En: Tecnología para el Mejoramiento del Sistema de Producción de Cacao. Mejía L; Argüello, O. comps. CORPOICA. Bucaramanga, CO. p. 65-72.
- _____; MEJÍA, L. 2000. Métodos de injertación de cacao. Publicación CORPOICA. Bucaramanga, CO. 24 p.
- _____; MEJÍA, L. s.f. Injertación temprana en la producción masiva de clones de cacao. (en línea). Innovación y Cambio Tecnológico. CORPOICA. CO. Consultado 31 oct. 2006. Disponible en: www.corpoica.org.co/Archivos/Revista/6_injertacion_temprana_v4n2-3.PDF
- PAREDES, M. 2003. Manual del Cultivo del Cacao. (en línea). Lima, PE. Consultado 12 jul 2006. Disponible en [http://www.proamazonia.gob.pe/estudios /manualcacao.pdf](http://www.proamazonia.gob.pe/estudios/manualcacao.pdf)
- PAREDES, J; CANALS, M; GONZÁLEZ, A; VENTURA, M. 2003. Evaluación de sustratos en el enraizamiento de estacas de cacao (*Theobroma cacao* L.). En: 14th International Cocoa Research Conference Ghana 2003. Actas. Cocoa Producers' Alliance. MY. p. 497-500.
- PENNSYLVANIA STATE UNIVERSITY, US. 2003. Cacao Tissue Culture. Protocol Book. Version 1.4. (en línea). Pennsylvania, US. Consultado 12 jul 2006. Disponible en http://guiltinanlab.cas.psu.edu/Research/Cocoa/Tissue%20Culture%20and%20Propagation/Somatic_Embryo_Protocol.pdf.
- PHILLIPS-MORA, W. 2003a. Nuevas expectativas en la lucha contra la moniliasis del cacao: origen, dispersión y diversidad genética del hongo *Moniliophthora roreri* e incorporación de fuentes de resistencia a través de mejoramiento genético. Turrialba, Costa Rica. CATIE. 3 p.

- _____. 2003b. Origin, biogeography, genetic diversity and taxonomic affinities of the cacao (*Theobroma cacao* L.) fungus *Moniliophthora roreri* (Cif.) Evans *et al.* as determined using molecular, phytopathological and morpho-physiological evidence. Tesis Ph.D. Reading, Inglaterra. University of Reading. 349 p.
- PURDY, L; SCHMIDT, R. 1996. Status of cacao witches' broom: biology, Epidemiology and Management. Annual Review of Phytopathology. 34:573-594.
- REUCK, D. 1997. Monilia del cacao. ¿Una amenaza semejante a la escoba de bruja? Café and Cacao: Noticias. 2(1):1-2.
- REYES, E; MARIA, A. 2003. Frecuencia de riego y niveles de fertilización en el desarrollo de plántulas de cacao (*Theobroma cacao* L.). En: p. 253-258.
- SALISBURY, F; ROSS, C. 1994. Fisiología Vegetal. Trad. V. González. México D.F, MX. Grupo Editorial Iberoamérica. 759 p.
- SICA (Servicio de Información y Censo Agropecuario, EC). s.f. Embriogénesis somática en cacao nacional. (en línea). Ministerio de Agricultura y Ganadería del Ecuador. Consultado 17 nov 2006. Disponible en <http://www.sica.gov.ec/agronegocios/biblioteca/ing%20rizzo/cafe%20y%20cacao/tecnologia.htm>
- SIQUEIRA, P; ALMEIDA, H DE. 2003. Determinação das principais propriedades físico-hídricas dos substratos utilizados na produção de mudas de cacao no IBC. En: 14th International Cocoa Research Conference Ghana 2003. Actas. Cocoa Producers' Alliance. MY. p.1295-1300.
- SODRÉ, G; CORÁ, J; SILVA FONTES, I; CARVALHO, M DE. 2005. Características químicas de substratos utilizados na produção de mudas de cacauzeiros. Rev. Bras. Frutic. 27(3):514-516.
- STAHEL. G. 1915. *Marasmius perniciosus* nov. spec. Dept Landbouw in Suriname Bull 33:1-27.
- TAYLOR S; HADLEY, P. 1987. Relationships between root and shoot growth in cocoa (*Theobroma cacao* L.) grown under different shade regimes. En: 10th International Cocoa Research Conference Santo Domingo. R.D. 1987. Actas. Cocoa Producers' Alliance. NG. p.177-183.

VIFINEX (Vigilancia Fitosanitaria en Cultivos de Exportación no Tradicional, CR) 2002. Manual producción de sustratos para viveros. (en línea). San José, CR. Consultado 12 jul 2006. Disponible en ns1.oirsa.org.sv/Publicaciones/VIFINEX/Manuales/Manuales-2002/Costa-Rica/Sustratos-para-Viveros-07.htm.

WCF (World Cocoa Foundation, US). 2006. Cocoa Farming: Fast Facts (en línea) Virginia, US. Consultado 31 oct. 2006. Disponible en <http://www.worldcocoafoundation.org/for-the-media/fast-facts.asp>.

ANEXOS

Anexo 1. Resultado del análisis químico de la composición del abono orgánico Juan Viñas utilizado en la preparación de sustrato.

Anexo 2. Resultados del análisis de varianza de los experimentos formales para la variable área de hoja afectada desde los cinco hasta los 30 días de siembra. (InfoGen/P 2005 (versión 1.0)).

Ensayo N°1. Evaluación de clones y sustratos

Análisis de varianza a los 5 días

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Área hoja afect	64	0,49	0,33	95,12

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	2,15	15	0,14	3,04	0,0017
Sustrato	0,07	3	0,02	0,52	0,6721
Clon	1,54	3	0,51	10,92	<0,0001**
Sustrato*Clon	0,53	9	0,06	1,26	0,2839
Error	2,26	48	0,05		
Total	4,41	63			

Test:Duncan Alfa:=0,05

Error: 0,0471 gl: 48

Clon	Medias	n			
PMCT 58	0,04	16	A		
CCN 51	0,14	16	A	B	
ICS 95	0,28	16		B	
CC 137	0,46	16			C

Letras distintas indican diferencias significativas(p<= 0,05)

Análisis de varianza a los 10 días

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Área hoja afect	64	0,37	0,17	74,30

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	2,90	15	0,19	1,86	0,0531
Sustrato	0,07	3	0,02	0,23	0,8722
Clon	2,11	3	0,70	6,76	0,0007**
Sustrato*Clon	0,72	9	0,08	0,77	0,6478
Error	5,00	48	0,10		
Total	7,90	63			

Test:Duncan Alfa:=0,05

Error: 0,1042 gl: 48

Clon	Medias	n			
PMCT 58	0,19	16	A		
CCN 51	0,36	16	A	B	
ICS 95	0,52	16		B	C
CC 137	0,68	16			C

Letras distintas indican diferencias significativas(p<= 0,05)

Análisis de varianza a los 15 días

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Área hoja afect	64	0,33	0,12	64,33

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	2,67	15	0,18	1,59	0,1135
Sustrato	0,14	3	0,05	0,42	0,7409
Clon	1,59	3	0,53	4,73	0,0057**
Sustrato*Clon	0,94	9	0,10	0,93	0,5102
Error	5,38	48	0,11		
Total	8,04	63			

Test:Duncan Alfa:=0,05

Error: 0,1120 gl: 48

Clon	Medias	n		
PMCT 58	0,36	16	A	
CCN 51	0,39	16	A	
ICS 95	0,58	16	A	B
CC 137	0,75	16		B

Letras distintas indican diferencias significativas($p \leq 0,05$)

Análisis de varianza a los 20 días

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Área hoja afect	64	0,30	0,08	63,51

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	2,50	15	0,17	1,39	0,1907
Sustrato	0,11	3	0,04	0,31	0,8152
Clon	1,50	3	0,50	4,17	0,0105*
Sustrato*Clon	0,89	9	0,10	0,82	0,5987
Error	5,76	48	0,12		
Total	8,26	63			

Test:Duncan Alfa:=0,05

Error: 0,1199 gl: 48

Clon	Medias	n		
PMCT 58	0,41	16	A	
CCN 51	0,41	16	A	
ICS 95	0,59	16	A	B
CC 137	0,78	16		B

Letras distintas indican diferencias significativas($p \leq 0,05$)

Análisis de varianza a los 25 días

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Área hoja afect	64	0,29	0,07	62,87

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	2,40	15	0,16	1,32	0,2298
Sustrato	0,12	3	0,04	0,32	0,8084
Clon	1,35	3	0,45	3,70	0,0178*
Sustrato*Clon	0,93	9	0,10	0,85	0,5731
Error	5,84	48	0,12		
Total	8,24	63			

Test:Duncan Alfa:=0,05

Error: 0,1216 gl: 48

Clon	Medias	n		
CCN 51	0,41	16	A	
PMCT 58	0,44	16	A	
ICS 95	0,59	16	A	B
CC 137	0,78	16		B

Letras distintas indican diferencias significativas($p \leq 0,05$)

Análisis de varianza a los 30 días

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Área hoja afect	64	0,26	0,02	63,29

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	4,00	15	0,27	1,10	0,3831
Clon	1,76	3	0,59	2,41	0,0783
Sustrato	0,31	3	0,10	0,43	0,7326
Clon*Sustrato	1,93	9	0,21	0,88	0,5464
Error	11,65	48	0,24		
Total	15,65	63			

Ensayo N°2. Evaluación de sombra y clones

Análisis de varianza a los 5 días

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Área hoja afect	48	0,37	0,26	140,42

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	1,61	7	0,23	3,38	0,0062
Clon	1,21	1	1,21	17,81	0,0001**
Nivel sombra	0,21	3	0,07	1,06	0,3783
Clon*Nivel sombra	0,18	3	0,06	0,90	0,4479
Error	2,71	40	0,07		
Total	4,32	47			

Test:Duncan Alfa:=0,05

Error: 0,0678 gl: 40

Clon	Medias	n	
PMCT 58	0,03	24	A
CATIE R4	0,34	24	B

Letras distintas indican diferencias significativas(p<= 0,05)

Análisis de varianza a los 10 días

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Área hoja afect	48	0,53	0,45	51,53

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	5,77	7	0,82	6,49	<0,0001
Clon	4,13	1	4,13	32,46	<0,0001**
Nivel sombra	0,81	3	0,27	2,12	0,1133
Clon*Nivel sombra	0,84	3	0,28	2,21	0,1022
Error	5,08	40	0,13		
Total	10,86	47			

Test:Duncan Alfa:=0,05

Error: 0,1271 gl: 40

Clon	Medias	n	
PMCT 58	0,40	24	A
CATIE R4	0,98	24	B

Letras distintas indican diferencias significativas(p<= 0,05)

Análisis de varianza a los 15 días

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Área hoja afect	48	0,62	0,56	37,09

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	6,84	7	0,98	9,43	<0,0001
Clon	3,77	1	3,77	36,41	<0,0001**
Nivel sombra	1,79	3	0,60	5,74	0,0023**
Clon*Nivel sombra	1,28	3	0,43	4,13	0,0121*
Error	4,14	40	0,10		
Total	10,98	47			

Test:Duncan Alfa:=0,05

Error: 0,1036 gl: 40

Clon	Medias	n	
PMCT 58	0,59	24	A
CATIE R4	1,15	24	B

Letras distintas indican diferencias significativas(p<= 0,05)

Test:Duncan Alfa:=0,05

Error: 0,1036 gl: 40

Nivel sombra	Medias	n			
1	0,59	12	A		
3	0,84	12	A	B	
2	0,90	12		B	C
4	1,13	12			C

Letras distintas indican diferencias significativas(p<= 0,05)

Test:Duncan Alfa:=0,05

Error: 0,1036 gl: 40

Clon	Nivel sombra	Medias	n				
PMCT 58	1	0,05	6	A			
PMCT 58	2	0,60	6		B		
PMCT 58	3	0,68	6		B	C	
CATIE R4	3	1,01	6			C	D
PMCT 58	4	1,02	6			C	D
CATIE R4	1	1,13	6				D
CATIE R4	2	1,21	6				D
CATIE R4	4	1,25	6				D

Letras distintas indican diferencias significativas(p<= 0,05)

Análisis de varianza a los 20 días

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Área hoja afect	48	0,66	0,60	33,41

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	7,50	7	1,07	11,18	<0,0001
Clon	3,08	1	3,08	32,17	<0,0001**
Nivel sombra	2,62	3	0,87	9,11	0,0001**
Clon*Nivel sombra	1,80	3	0,60	6,25	0,0014**
Error	3,84	40	0,10		
Total	11,34	47			

Test:Duncan Alfa:=0,05

Error: 0,0959 gl: 40

Clon	Medias	n	
PMCT 58	0,67	24	A
CATIE R4	1,18	24	B

Letras distintas indican diferencias significativas(p<= 0,05)

Test:Duncan Alfa:=0,05

Error: 0,0959 gl: 40

Nivel sombra	Medias	n	
1	0,59	12	A
3	0,90	12	B
2	0,96	12	B
4	1,25	12	C

Letras distintas indican diferencias significativas(p<= 0,05)

Test:Duncan Alfa:=0,05

Error: 0,0959 gl: 40

Clon	Nivel sombra	Medias	n	
PMCT 58	1	0,05	6	A
PMCT 58	2	0,68	6	B
PMCT 58	3	0,71	6	B
CATIE R4	3	1,09	6	C
CATIE R4	1	1,13	6	C
PMCT 58	4	1,25	6	C
CATIE R4	4	1,25	6	C
CATIE R4	2	1,25	6	C

Letras distintas indican diferencias significativas(p<= 0,05)

Análisis de varianza a los 25 días

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Área hoja afect	48	0,74	0,70	24,81

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	7,26	7	1,04	16,65	<0,0001
Clon	2,40	1	2,40	38,58	<0,0001**
Nivel sombra	2,77	3	0,92	14,80	<0,0001**
Clon*Nivel sombra	2,09	3	0,70	11,19	<0,0001**
Error	2,49	40	0,06		
Total	9,75	47			

Test:Duncan Alfa:=0,05

Error: 0,0623 gl: 40

Clon	Medias	n	
PMCT 58	0,78	24	A
CATIE R4	1,23	24	B

Letras distintas indican diferencias significativas(p<= 0,05)

Test:Duncan Alfa:=0,05

Error: 0,0623 gl: 40

Nivel sombra	Medias	n			
1	0,61	12	A		
3	1,03	12		B	
2	1,13	12		B	C
4	1,25	12			C

Letras distintas indican diferencias significativas(p<= 0,05)

Test:Duncan Alfa:=0,05

Error: 0,0623 gl: 40

Clon	Nivel sombra	Medias	n			
PMCT 58	1	0,05	6	A		
PMCT 58	3	0,81	6		B	
PMCT 58	2	1,02	6		B	C
CATIE R4	1	1,17	6			C
CATIE R4	2	1,25	6			C
CATIE R4	3	1,25	6			C
CATIE R4	4	1,25	6			C
PMCT 58	4	1,25	6			C

Letras distintas indican diferencias significativas(p<= 0,05)

Análisis de varianza a los 30 días

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Área hoja afect	48	0,78	0,74	21,12

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	6,81	7	0,97	20,31	<0,0001
Clon	1,80	1	1,80	37,60	<0,0001**
Nivel sombra	2,85	3	0,95	19,83	<0,0001**
Clon*Nivel sombra	2,16	3	0,72	15,02	<0,0001**
Error	1,92	40	0,05		
Total	8,72	47			

Test:Duncan Alfa:=0,05

Error: 0,0479 gl: 40

Clon	Medias	n	
PMCT 58	0,84	24	A
CATIE R4	1,23	24	B

Letras distintas indican diferencias significativas(p<= 0,05)

Test:Duncan Alfa:=0,05

Error: 0,0479 gl: 40

Nivel sombra	Medias	n		
1	0,63	12	A	
3	1,05	12		B
2	1,21	12		B C
4	1,25	12		C

Letras distintas indican diferencias significativas(p<= 0,05)

Test:Duncan Alfa:=0,05

Error: 0,0479 gl: 40

Clon	Nivel sombra	Medias	n		
PMCT 58	1	0,10	6	A	
PMCT 58	3	0,85	6		B
CATIE R4	1	1,17	6		C
PMCT 58	2	1,17	6		C
PMCT 58	4	1,25	6		C
CATIE R4	4	1,25	6		C
CATIE R4	2	1,25	6		C
CATIE R4	3	1,25	6		C

Letras distintas indican diferencias significativas(p<= 0,05)

Ensayo N°3. Evaluación de sombra, clones y tipo de explante

Análisis de varianza a los 5 días

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Área hoja afect	96	0,62	0,36	125,30

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	8,88	39	0,23	2,38	0,0015
Clon	0,52	4	0,13	1,37	0,2567
Nivel sombra	1,10	3	0,37	3,83	0,0144*
Explante	1,10	1	1,10	11,48	0,0013**
Clon*Nivel sombra	1,95	12	0,16	1,70	0,0927
Clon*Explante	0,86	4	0,22	2,26	0,0745
Nivel sombra*Explante	0,66	3	0,22	2,29	0,0881
Clon*Nivomb*Explante	1,25	12	0,10	1,09	0,3871
Error	5,36	56	0,10		
Total	14,24	95			

Test:Duncan Alfa:=0,05

Error: 0,0957 gl: 56

Nivel sombra	Medias	n		
2	0,12	24	A	
1	0,15	24	A	
3	0,24	24	A	B
4	0,42	24		B

Letras distintas indican diferencias significativas(p<= 0,05)

Test:Duncan Alfa:=0,05

Error: 0,0957 gl: 56

Explante	Medias	n		
1	0,11	44	A	
2	0,35	52		B

Letras distintas indican diferencias significativas(p<= 0,05)

Análisis de varianza a los 10 días

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Área hoja afect	96	0,64	0,39	38,79

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	9,74	39	0,25	2,56	0,0006
Clon	2,41	4	0,60	6,18	0,0003**
Nivel sombra	1,85	3	0,62	6,31	0,0009**
Explante	1,75	1	1,75	17,91	0,0001**
Clon*Nivel sombra	0,94	12	0,08	0,80	0,6451
Clon*Explante	1,31	4	0,33	3,35	0,0158*
Nivel sombra *Explante	0,54	3	0,18	1,83	0,1513
Clon*Niv sombra*Explante	1,55	12	0,13	1,32	0,2317
Error	5,47	56	0,10		
Total	15,21	95			

Test:Duncan Alfa:=0,05

Error: 0,1470 gl: 91

Clon	Medias	n		
PMCT 58	0,63	12	A	
CCN 51	0,63	12	A	
CATIE R4	0,76	24	A	B
PA 169	0,82	24	A	B
CATIE R6	1,02	24		B

Letras distintas indican diferencias significativas(p<= 0,05)

Test:Duncan Alfa:=0,05

Error: 0,0976 gl: 56

Nivel sombra	Medias	n			
1	0,53	24	A		
2	0,69	24	A	B	
4	0,82	24		B	C
3	0,94	24			C

Letras distintas indican diferencias significativas(p<= 0,05)

Test:Duncan Alfa:=0,05

Error: 0,0976 gl: 56

Explante	Medias	n		
1	0,59	44	A	
2	0,89	52		B

Letras distintas indican diferencias significativas(p<= 0,05)

Test:Duncan Alfa:=0,05

Error: 0,0976 gl: 56

Clon	Explante	Medias	n				
PMCT 58	1	0,16	4	A			
CATIE R4	1	0,52	12		B		
CCN 51	1	0,54	4		B		
CCN 51	2	0,68	8		B	C	
PA 169	1	0,81	12		B	C	D
PA 169	2	0,82	12		B	C	D
PMCT 58	2	0,87	8			C	D
CATIE R6	1	0,94	12			C	D
CATIE R4	2	1,00	12			C	D
CATIE R6	2	1,09	12				D

Letras distintas indican diferencias significativas($p \leq 0,05$)**Análisis de varianza a los 15 días**

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Área hoja afect	96	0,75	0,57	23,92

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	9,25	39	0,24	4,29	<0,0001
Clon	3,02	4	0,76	13,67	<0,0001**
Nivel sombra	2,79	3	0,93	16,82	<0,0001**
Explante	0,87	1	0,87	15,66	0,0002**
Clon*Nivel sombra	1,02	12	0,09	1,54	0,1381
Clon*Explante	0,80	4	0,20	3,64	0,0105*
Nivel sombra*Explante	0,19	3	0,06	1,13	0,3441
Clon*Niv sombra*Explante	0,78	12	0,07	1,18	0,3192
Error	3,10	56	0,06		
Total	12,35	95			

Test:Duncan Alfa:=0,05

Error: 0,1072 gl: 91

Clon	Medias	n	
PMCT 58	0,74	12	A
CCN 51	0,74	12	A
CATIE R4	1,00	24	B
PA 169	1,00	24	B
CATIE R6	1,20	24	B

Letras distintas indican diferencias significativas($p \leq 0,05$)**Test:Duncan Alfa:=0,05**

Error: 0,0553 gl: 56

Nivel sombra	Medias	n			
1	0,61	24	A		
2	0,92	24		B	
4	1,04	24		B	C
3	1,09	24			C

Letras distintas indican diferencias significativas($p \leq 0,05$)

Test:Duncan Alfa:=0,05

Error: 0,0553 gl: 56

Explante	Medias	n	
1	0,81	44	A
2	1,02	52	B

Letras distintas indican diferencias significativas($p \leq 0,05$)**Test:Duncan Alfa:=0,05**

Error: 0,0553 gl: 56

Clon	Explante	Medias	n					
PMCT 58	1	0,37	4	A				
CCN 51	1	0,72	4		B			
CCN 51	2	0,75	8		B			
CATIE R4	1	0,82	12		B	C		
PMCT 58	2	0,92	8		B	C	D	
PA 169	1	0,99	12			C	D	E
PA 169	2	1,01	12			C	D	E
CATIE R6	1	1,15	12				D	E
CATIE R4	2	1,17	12					E
CATIE R6	2	1,25	12					F

Letras distintas indican diferencias significativas($p \leq 0,05$)**Análisis de varianza a los 20 días**

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Área hoja afect	96	0,71	0,51	19,08

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	6,09	39	0,16	3,53	<0,0001
Clon	1,60	4	0,40	9,03	<0,0001**
Nivel sombra	2,07	3	0,69	15,61	<0,0001**
Explante	0,20	1	0,20	4,50	0,0382*
Clon*Nivel sombra	1,25	12	0,10	2,35	0,0158*
Clon*Explante	0,14	4	0,04	0,81	0,5233
Nivel sombra*Explante	0,20	3	0,07	1,50	0,2245
Clon*Niv sombra*Explante	0,99	12	0,08	1,86	0,0596
Error	2,48	56	0,04		
Total	8,57	95			

Test:Duncan Alfa:=0,05

Error: 0,0784 gl: 91

Clon	Medias	n			
CCN 51	0,87	12	A		
PMCT 58	0,95	12	A	B	
PA 169	1,12	24		B	C
CATIE R4	1,12	24		B	C
CATIE R6	1,25	24			C

Letras distintas indican diferencias significativas($p \leq 0,05$)

Test:Duncan Alfa:=0,05

Error: 0,0442 gl: 56

Nivel sombra	Medias	n	
1	0,77	24	A
2	1,13	24	B
4	1,13	24	B
3	1,17	24	B

Letras distintas indican diferencias significativas($p \leq 0,05$)

Test:Duncan Alfa:=0,05

Error: 0,0442 gl: 56

Explante	Medias	n	
1	1,00	44	A
2	1,10	52	B

Letras distintas indican diferencias significativas($p \leq 0,05$)

Test:Duncan Alfa:=0,05

Error: 0,0442 gl: 56

Clon	Nivel sombra	Medias	n					
CCN 51	1	0,37	3	A				
PMCT 58	1	0,47	3	A				
CCN 51	2	0,79	3		B			
CATIE R4	1	0,87	6		B	C		
PA 169	1	0,91	6		B	C	D	
PMCT 58	4	0,91	3		B	C	D	E
CCN 51	3	1,00	3		B	C	D	E
PMCT 58	3	1,12	3			C	D	E
PA 169	4	1,13	6			C	D	E
CATIE R4	4	1,13	6			C	D	E
PMCT 58	2	1,13	3			C	D	E
PA 169	3	1,21	6				D	E
PA 169	2	1,25	6					E
CATIE R4	3	1,25	6					E
CATIE R4	2	1,25	6					E
CATIE R6	1	1,25	6					E
CATIE R6	4	1,25	6					E
CATIE R6	3	1,25	6					E
CATIE R6	2	1,25	6					E
CCN 51	4	1,25	3					E

Letras distintas indican diferencias significativas($p \leq 0,05$)

Análisis de varianza a los 25 días

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Área hoja afect	96	0,72	0,52	15,82

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	4,59	39	0,12	3,62	<0,0001
Clon	1,01	4	0,25	7,76	<0,0001**
Nivel sombra	1,95	3	0,65	20,01	<0,0001**
Explante	0,02	1	0,02	0,72	0,4009
Clon*Nivel sombra	1,11	12	0,09	2,84	0,0041**
Clon*Explante	0,03	4	0,01	0,26	0,9003
Nivel sombra*Explante	0,13	3	0,04	1,35	0,2686
Clon*Niv sombra*Explante	0,47	12	0,04	1,22	0,2954
Error	1,82	56	0,03		
Total	6,41	95			

Test:Duncan Alfa:=0,05

Error: 0,0597 gl: 91

Clon	Medias	n			
CCN 51	0,93	12	A		
PMCT 58	1,03	12	A	B	
PA 169	1,15	24		B	C
CATIE R4	1,18	24		B	C
CATIE R6	1,25	24			C

Letras distintas indican diferencias significativas(p<= 0,05)

Test:Duncan Alfa:=0,05

Error: 0,0325 gl: 56

Nivel sombra	Medias	n			
1	0,84	24	A		
2	1,16	24		B	
4	1,21	24		B	
3	1,21	24		B	

Letras distintas indican diferencias significativas(p<= 0,05)

Test:Duncan Alfa:=0,05

Error: 0,0325 gl: 56

Clon	Nivel sombra	Medias	n				
CCN 51	1	0,37	3	A			
PMCT 58	1	0,60	3	A			
CCN 51	2	0,91	3		B		
PA 169	1	0,95	6		B	C	
CATIE R4	1	1,01	6		B	C	D
CCN 51	3	1,12	3		B	C	D
PMCT 58	4	1,12	3		B	C	D
PMCT 58	2	1,13	3		B	C	D
PA 169	3	1,21	6			C	D
CATIE R4	4	1,21	6			C	D
PA 169	4	1,21	6			C	D
CATIE R6	1	1,25	6				D
CATIE R6	2	1,25	6				D
CATIE R6	3	1,25	6				D
CATIE R6	4	1,25	6				D
PMCT 58	3	1,25	3				D
CATIE R4	3	1,25	6				D
CATIE R4	2	1,25	6				D
CCN 51	4	1,25	3				D
PA 169	2	1,25	6				D

Letras distintas indican diferencias significativas($p < 0,05$)

Análisis de varianza a los 30 días

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Área hoja afect	96	0,71	0,50	15,27

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	4,20	39	0,11	3,44	<0,0001
Clon	0,76	4	0,19	6,11	0,0004**
Nivel sombra	1,63	3	0,54	17,43	<0,0001**
Explante	4,9E-03	1	4,9E-03	0,16	0,6936
Clon*Nivel sombra	1,10	12	0,09	2,94	0,0031*
Clon*Explante	0,07	4	0,02	0,55	0,6982
Nivel sombra*Explante	0,21	3	0,07	2,20	0,0977
Clon*Niv sombra*Explante	0,42	12	0,03	1,12	0,3648
Error	1,75	56	0,03		
Total	5,95	95			

Test:Duncan Alfa:=0,05

Error: 0,0564 gl: 91

Clon	Medias	n		
CCN 51	0,96	12	A	
PMCT 58	1,08	12	A	B
PA 169	1,15	24		B
CATIE R4	1,21	24		B
CATIE R6	1,25	24		B

Letras distintas indican diferencias significativas($p < 0,05$)

Test:Duncan Alfa:=0,05

Error: 0,0312 gl: 56

Nivel sombra	Medias	n	
1	0,89	24	A
2	1,16	24	B
3	1,24	24	B
4	1,24	24	B

Letras distintas indican diferencias significativas($p \leq 0,05$)

Test:Duncan Alfa:=0,05

Error: 0,0312 gl: 56

Clon	Nivel sombra	Medias	n					
CCN 51	1	0,37	3	A				
PMCT 58	1	0,81	3		B			
CCN 51	2	0,91	3		B	C		
PA 169	1	0,95	6		B	C	D	
CATIE R4	1	1,09	6			C	D	E
PMCT 58	2	1,13	3			C	D	E
PA 169	3	1,21	6				D	E
PA 169	4	1,21	6				D	E
PA 169	2	1,25	6					E
CATIE R6	1	1,25	6					E
CATIE R4	3	1,25	6					E
PMCT 58	3	1,25	3					E
CATIE R6	3	1,25	6					E
CATIE R6	2	1,25	6					E
CATIE R4	4	1,25	6					E
CATIE R6	4	1,25	6					E
PMCT 58	4	1,25	3					E
CCN 51	3	1,25	3					E
CATIE R4	2	1,25	6					E
CCN 51	4	1,25	3					E

Letras distintas indican diferencias significativas($p \leq 0,05$)

Anexo 3. Resultados de la prueba no paramétrica Friedman de los experimentos formales para la variable severidad del daño de la hoja afectada a los 15 y 30 días de la siembra. (InfoGen/P 2005 (versión 1.0)).

Ensayo N°2. Evaluación de sombra y clones

Prueba de Friedman a los 30 días¹

De acuerdo con los clones evaluados

Prueba de Friedman

CATIE R4	PMCT 58	T ²	p
1,68	1,32	25,77	<0,0001**

Minima diferencia significativa entre suma de rangos (6,736)

Tratamiento	Suma(Ranks)	Media(Ranks)	n	
PMCT 58	63,50	1,32	48	A
CATIE R4	80,50	1,68	48	B

Letras distintas indican diferencias significativas(p<= 0,050)

Ensayo N°3. Evaluación de sombra, clones y tipo de explante

Prueba de Friedman a los 15 días

De acuerdo con el nivel de sombra

Prueba de Friedman

Nivel 1	Nivel 2	Nivel 3	Nivel 4	T ²	p
1,79	2,79	2,52	2,90	14,34	<0,0001**

Minima diferencia significativa entre suma de rangos (8,905)

Tratamiento	Suma(Ranks)	Media(Ranks)	n	
Nivel 1	43,00	1,79	24	A
Nivel 3	60,50	2,52	24	B
Nivel 2	67,00	2,79	24	B C
Nivel 4	69,50	2,90	24	C

Letras distintas indican diferencias significativas(p<= 0,050)

¹ No se realizó la Prueba de Friedman a los 15 días.

De acuerdo con los clones evaluados²

Prueba de Friedman

CATIE R4	CATIE R 6	PA 169	T ²	p
1,78	2,32	1,90	14,53	<0,0001**

Minima diferencia significativa entre suma de rangos (14,902)

Tratamiento	Suma(Ranks)	Media(Ranks)	n			
CATIE R4	128,50	1,78	72	A		
PA 169	136,50	1,90	72	A	B	
CATIE R 6	167,00	2,32	72			C

Letras distintas indican diferencias significativas(p<= 0,050)

De acuerdo con los clones testigos

Prueba de Friedman

PMCT 58	CCN 51	T ²	p
1,41	1,59	1,67	0,2057

Minima diferencia significativa entre suma de rangos (9,467)

Tratamiento	Suma(Ranks)	Media(Ranks)	n	
PMCT 58	45,00	1,41	32	A
CCN 51	51,00	1,59	32	A

Letras distintas indican diferencias significativas(p<= 0,050)

De acuerdo con el nivel de sombra y los clones evaluados

Prueba de Friedman

CATIE R4 1	CATIE R4 2	CATIE R4 3	CATIE R4 4	CATIE R6 1	CATIE R6 2	CATIE R6 3
3,44	6,03	7,50	5,53	6,22	8,22	8,22

CATIE R6 4	PA 169 1	PA 169 2	PA 169 3	PA 169 4	T ²	p
8,22	3,61	7,47	7,39	6,14	9,53	<0,0001

Minima diferencia significativa entre suma de rangos (27,166)

Tratamiento	Suma(Ranks)	Media(Ranks)	n						
CATIE R4 1	62,00	3,44	18	A					
PA 169 1	65,00	3,61	18	A	B				
CATIE R4 4	99,50	5,53	18			C			
CATIE R4 2	108,50	6,03	18			C	D		
PA 169 4	110,50	6,14	18			C	D	E	
CATIE R6 1	112,00	6,22	18			C	D	E	F
PA 169 3	133,00	7,39	18				D	E	F
PA 169 2	134,50	7,47	18				D	E	F
CATIE R4 3	135,00	7,50	18				D	E	F
CATIE R6 2	148,00	8,22	18						G
CATIE R6 3	148,00	8,22	18						G
CATIE R6 4	148,00	8,22	18						G

Letras distintas indican diferencias significativas(p<= 0,050)

² Se realizó un análisis separado de los clones evaluados y los testigos, pues se hicieron menos repeticiones de los clones testigos.

De acuerdo con el nivel de sombra y los clones testigos

Prueba de Friedman

PMCT 58 1	PMCT 58 2	PMCT 58 3	PMCT 58 4	CCN 51 1	CCN 51 2
2,00	4,94	5,06	4,56	3,13	3,38

CCN 51 3	CCN 51 4	T ²	p
6,31	6,63	7,05	<0,0001**

Minima diferencia significativa entre suma de rangos (13,624)

Tratamiento	Suma(Ranks)	Media(Ranks)	n					
PMCT 58 1	16,00	2,00	8	A				
CCN 51 1	25,00	3,13	8	A	B			
CCN 51 2	27,00	3,38	8	A	B	C		
PMCT 58 4	36,50	4,56	8		B	C	D	
PMCT 58 2	39,50	4,94	8			C	D	E
PMCT 58 3	40,50	5,06	8			C	D	E
CCN 51 3	50,50	6,31	8					E
CCN 51 4	53,00	6,63	8					E

Letras distintas indican diferencias significativas(p<= 0,050)

Prueba de Friedman a los 30 días

De acuerdo con el nivel de sombra

Prueba de Friedman

Nivel 1	Nivel 2	Nivel 3	Nivel 4	T ²	p
2,09	2,59	2,65	2,67	18,46	<0,0001**

Minima diferencia significativa entre suma de rangos (12,637)

Tratamiento	Suma(Ranks)	Media(Ranks)	n	
Nivel 1	146,00	2,09	70	A
Nivel 2	181,50	2,59	70	B
Nivel 3	185,50	2,65	70	B
Nivel 4	187,00	2,67	70	B

Letras distintas indican diferencias significativas(p<= 0,050)

De acuerdo con los clones evaluados

Prueba de Friedman

CATIE R4	CATIE R6	PA169	T ²	p
1,98	2,10	1,92	4,50	0,0128*

Minima diferencia significativa entre suma de rangos (8,415)

Tratamiento	Suma(Ranks)	Media(Ranks)	n			
PA169	138,50	1,92	72	A		
CATIE R4	142,50	1,98	72	A	B	
CATIE R6	151,00	2,10	72			C

Letras distintas indican diferencias significativas(p<= 0,050)

De acuerdo con los clones testigos

Prueba de Friedman

CCN 51	PMCT 58	T ²	p
1,44	1,56	1,35	0,2545

Minima diferencia significativa entre suma de rangos (7,027)

Tratamiento	Suma(Ranks)	Media(Ranks)	n	
CCN 51	46,00	1,44	32	A
PMCT 58	50,00	1,56	32	A

Letras distintas indican diferencias significativas(p<= 0,050)

De acuerdo con el nivel de sombra y los clones evaluados

Prueba de Friedman

CATIE R4 1	CATIE R4 2	CATIE R4 3	CATIE R4 4	CATIE R6 1	CATIE R6 2	CATIE R6 3
5,17	6,89	6,89	6,89	6,89	6,89	6,89

CATIE R6 4	PA 169 1	PA 169 2	PA 169 3	PA 169 4	T ²	p
6,89	4,92	6,89	6,25	6,56	4,93	<0,0001**

Minima diferencia significativa entre suma de rangos (16,087)

Tratamiento	Suma(Ranks)	Media(Ranks)	n			
PA 169 1	88,50	4,92	18	A		
CATIE R4 1	93,00	5,17	18	A	B	
PA 169 3	112,50	6,25	18			C
PA 169 4	118,00	6,56	18			C
PA 169 2	124,00	6,89	18			C
CATIE R6 4	124,00	6,89	18			C
CATIE R6 3	124,00	6,89	18			C
CATIE R4 2	124,00	6,89	18			C
CATIE R4 3	124,00	6,89	18			C
CATIE R4 4	124,00	6,89	18			C
CATIE R6 1	124,00	6,89	18			C
CATIE R6 2	124,00	6,89	18			C

Letras distintas indican diferencias significativas(p<= 0,050)

De acuerdo con el nivel de sombra y los clones testigos

Prueba de Friedman

PMCT 58 1	PMCT 58 2	PMCT 58 3	PMCT 58 4	CCN 51 1	CCN 51 2
3,88	4,75	5,38	5,38	1,88	4,00

CCN 51 3	CCN 51 4	T ²	p
5,38	5,38	6,96	<0,0001**

Minima diferencia significativa entre suma de rangos (10,634)

Tratamiento	Suma(Ranks)	Media(Ranks)	n				
CCN 51 1	15,00	1,88	8	A			
PMCT 58 1	31,00	3,88	8		B		
CCN 51 2	32,00	4,00	8		B	C	
PMCT 58 2	38,00	4,75	8		B	C	D
CCN 51 3	43,00	5,38	8				D
CCN 51 4	43,00	5,38	8				D
PMCT 58 4	43,00	5,38	8				D
PMCT 58 3	43,00	5,38	8				D

Letras distintas indican diferencias significativas(p<= 0,050)