



**ACTIVIDAD FOTOQUÍMICA DE CLONES ÉLITES DE CACAO (*THEOBROMA CACAO* L.)
ECUATORIANO EN EL NORTE DE LA PROVINCIA ESMERALDAS**

**PHOTOCHEMICAL ACTIVITY OF ELITES CLONES OF ECUATORIAN CACAO (*THEOBROMA CACAO* L.)
AT NORTH OF ESMERALDAS PROVINCE**

Tezara W^{1,2,3,4*}, J. De Almeida⁴, E. Valencia², J.L. Cortes², M.J. Bolaños²

¹Proyecto Prometeo – Secretaría de Educación Superior, Ciencia, Tecnología e Innovación, Ecuador. ²Facultad de Ciencias Agropecuarias y Ambientales, Universidad Técnica Luis Vargas Torres, Estación Experimental Múlite, Esmeraldas, Ecuador. ³Facultad de Ingenierías y Tecnologías, Universidad Técnica Luis Vargas Torres, Ciudadela Universitaria Nuevos Horizontes, Esmeraldas, Ecuador. ⁴Instituto de Biología Experimental. Universidad Central de Venezuela. Apartado 47114, Caracas 1041-A. Venezuela.

wilmer.tezara@ciens.ucv.ve

Enviado (18.09.2015)

Aceptado (12.11.2015)

RESUMEN

Con el objetivo de conocer la eficiencia de captación y transferencia de energía lumínica en hojas de cacao (*Theobroma cacao* L.) e identificar clones élitos con un buen desempeño fisiológico durante la estación lluviosa, se evaluó el contenido de agua foliar (CAF), área foliar específica (AFE) y la eficiencia fotoquímica del fotosistema II (PSII) a través de medidas de fluorescencia de la clorofila *a* (Chl *a*), en 17 clones nacionales, provenientes de una selección de híbridos en la Estación Experimental Tropical de Pichilingue (Ecuador) y 3 clones criollos, cultivados en dos diferentes ensayos, ubicados en la finca de la Asociación de productores de cacao de Colón Eloy (CE) y en San Agustín (SA) al Norte de la Provincia Esmeraldas, Parroquia de Colón Eloy, Cantón Eloy Alfaro. Se discuten aspectos relacionados con la tasa de transporte de electrones (J), eficiencia cuántica máxima (F_v/F_m) y relativa del PSII (Φ_{PSII}), coeficiente de extinción fotoquímica (q_p) y no fotoquímica (q_n) y se comparan con resultados obtenidos con cultivares de cacao venezolano, en términos del requerimiento lumínico del cultivo cacao. Se concluyó que los clones de cacao ecuatoriano estudiados, cultivados a plena exposición solar (SA), redujeron significativamente el AFE y F_v/F_m , mostrando aclimatación morfoanatómica y regulación descendente del aparato fotoquímico, lo que constituye una evidencia de la aclimatación a diferentes condiciones lumínicas.

Palabras clave: Aclimatación, área foliar específica, cacao criollo, eficiencia cuántica, fluorescencia

ABSTRACT

In order to know the capture of light and energy transfer in cacao leaves (*Theobroma cacao* L.) and identify elite clones with a best physiological performance during the rainy season, was assessed the leaf water content (LWC), specific leaf area (SLA) and photochemical efficiency of photosystem II (PSII) by fluorescence of chlorophyll *a* (Chl *a*), in 17 national clones from a selection of hybrids in the Pichilingue Tropical Experimental Station (Ecuador) and 3 Criollos clones, which are grown in two different trials, located at the Association cocoa farm producers of Colon Eloy (CE) and San Agustín (SA) in the North of Esmeraldas province, Parroquia of Colón Eloy, Eloy Alfaro Canton. Will be discussed aspects such as electron transport rate (J), maximum quantum yield (F_v/F_m) and relative quantum yield of PSII (Φ_{PSII}), photochemical (q_p) and non-photochemical quenching coefficient (q_n) and compared with results obtained with Venezuelan cacao cultivars in terms of light requirement cocoa crops. We concluded that Ecuadorian cocoa clones studied, grown in full sunlight (SA), significantly reduced the AFE and F_v/F_m , showing morph-anatomical acclimatization and down-regulation of photochemical apparatus, which could allow adjust to different light conditions.

Keywords: Acclimation, specific leaf area, criollo cocoa, fluorescence, quantum efficiency

INTRODUCCIÓN

La luz se considera un factor ambiental de gran importancia ya que de éste va a depender la distribución y adaptación de las plantas; este factor abiótico además de ser un recurso de energía, también estimula el crecimiento, desarrollo y producción de las plantas; sin embargo, en ocasiones puede llegar a ser un factor de estrés ¹. La luz varía tanto temporal como espacialmente; esa variación ambiental es el escenario propicio para que se evidencie plasticidad entre y dentro de las especies de plantas ². De la luz absorbida por las plantas, una fracción se utiliza en fotosíntesis, una parte significativa se pierde como calor, y una cantidad más pequeña se pierde en forma de fluorescencia.

El cacao (*Theobroma cacao* L.) es considerado uno de los cultivos perennes más importantes a nivel mundial, con una producción estimada de 4,35 millones de toneladas en 2013/2014 y se estima para el 2014/2015 se llegue a una producción de 4,23 millones de toneladas ³. Ecuador es el octavo productor de cacao a nivel mundial y el primero junto con Brasil en Suramérica; siendo el primero en la producción de cacao fino de aroma, con un área de siembra de 500,000 ha ⁴. La producción de cacao ecuatoriano se encuentra localizada en las zonas del trópico húmedo ocupando el 83% del área de cultivo, lo que aporta el 5% del cacao que se consume a mundial ⁵.

El cacao es una especie leñosa tropical alógama de la familia Malvaceae ⁶, nativa de los bosques lluviosos de la cuenca amazónica y otras áreas tropicales de América central y América del Sur ⁷. Existen tres tipos o grupos morfogénéticos de cacao, que difieren en calidad, vigor y rendimiento: criollos, forasteros y trinitarios (resultado de la hibridación, o cruzamiento entre criollos, introducidos desde el Este de Venezuela x Forastero del Amazonas).

Se ha sugerido una nueva clasificación de cacao con 10 grupos genéticos, que reflejan de mejor manera la diversidad disponible para los cacaocultores, respecto a la clasificación anterior ⁸. El cacao criollo, identificado dentro de estos 10 grupos tiene una baja diversidad genética ⁷. En Ecuador, se puede decir que prácticamente no existe una variedad nacional genéticamente pura del cacao ⁹, pues lo que se encuentra es una mezcla de híbridos naturales que se agrupan en una población conocida con el nombre de complejo "nacional x trinitario" ¹⁰. Esta variedad nacional es diferente por ser nativa y proviene de los declives orientales de la Cordillera de los Andes en la hoya amazónica, conservándose como exclusivo hasta 1890, cuando se inició la introducción de material de origen trinitario desde Venezuela ¹¹.

El cacao es cultivado comúnmente en sombra en el sotobosque, bajo condiciones de reducida disponibilidad lumínica ¹²; especialmente las plantas juveniles requieren bajas densidades de flujo fotónico (DFF) para reducir el déficit hídrico y de nutrientes que puede ocurrir a plena exposición solar. Las plantas del sotobosque de los bosques tropicales por lo general, reciben DFF entre 5 y 25 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, lo que se traduce en 1-2% de la DFF recibida en el dosel ¹³. Generalmente se ha reportado que el cacao es un cultivo de sombra incapaz de adaptarse a una alta DFF; sin embargo, se conoce la existencia de árboles de cacao cultivados exitosamente en plena exposición en Ecuador, Brasil y países africanos (Ghana y Costa de Marfil). Se recomienda una sombra del 60% de la DFF que llega al dosel en los cultivos de

cacao¹⁴, a pesar de que no exista un acuerdo universal sobre la DFF necesaria para maximizar la producción de este cultivo¹².

Algunas especies leñosas tropicales siempreverdes, se originaron como plantas de sotobosque por lo que el aparato fotosintético funciona a su máxima capacidad y está adaptado a estas condiciones de baja DFF. Especies como cacao, café (*Coffea arabica*) y té (*Camellia sinensis*), son típicas especies adaptadas en su hábitat natural a bajas DFF, de aquí que generalmente son cultivadas en el sotobosque. Las plantas juveniles de muchas especies tropicales crecen mejor en condiciones de sombra que a plena exposición solar, por lo que el cultivo de estas especies en altas DFF podría provocar fotoinhibición, es decir daño del aparato fotoquímico por exceso de luz¹⁵. Se ha sugerido que la sombra no excesiva podría ser ventajosa para árboles de cultivo en el trópico debido a que: (a) la tasa de fotosíntesis (P_N) se satura a bajas DFF; (b) la radiación en el trópico durante gran parte del año es muy elevada y puede ocasionar daños fotoinhibitorios, particularmente cuando está asociada con déficit hídrico; y (c) las mejores condiciones microclimáticas tienen un efecto amortiguador sobre la humedad del aire y la disponibilidad de agua del suelo, lo que permite un prolongado funcionamiento y mantenimiento del intercambio gaseoso foliar¹⁶.

Se han realizado investigaciones de los procesos fotosintéticos de especies de sombra (captura de luz, la tasa de transporte de electrones a través del PSII (J), tasas de carboxilación de la ribulosa-1,5-bisfosfato (RuBP), actividad de la enzima RuBP carboxilasa-oxigenasa; Rubisco), los cuales son esenciales para la caracterización y la comprensión de cómo estas especies son exitosas cuando la luz es limitante. De hecho, se han reportado bajos valores de DFF saturante para la P_N en hojas individuales del café y cacao^{17, 18, 19, 20}. Además, se han observado bajas P_N , en plantas de cacao, café y té, respectivamente, en comparación con la mayoría de los árboles tropicales^{20, 21, 22}, lo cual podría estar relacionadas con una menor eficiencia en la captura de energía de excitación del PSII al altas DFF y con las menores J^{19, 20}.

El uso de técnicas de intercambio de gases permite estimar los cambios en la capacidad fotosintética producidos por algún estrés ambiental^{23, 24}; sin embargo,²⁴ señalan que estas medidas no definen completamente los efectos impuestos por el estrés sobre los procesos no estomáticos, como lo son los procesos bioquímicos y fotoquímicos de la P_N . Existe un método alternativo para estimar P_N *in vivo* mediante la medida de la actividad fotoquímica: la fluorescencia de la clorofila *a* (Cl *a*), con la cual se puede estimar P_N a través del transporte de electrones²⁵.

Las medidas de la fluorescencia de la Cl *a* del PSII están relacionadas con la actividad fotoquímica, la cual incluye la reducción-oxidación de las proteínas de la membrana del tilacoide que forman parte de las reacciones fotoquímicas. El NADPH y ATP que son producidos al final de las reacciones fotoquímicas son utilizados en la reducción del CO₂ y en la regeneración de la RuBP en el ciclo de Calvin, por lo que los parámetros derivados de la fluorescencia pueden expresar la capacidad potencial que tiene una planta de realizar fotosíntesis.

La energía lumínica absorbida por las moléculas de clorofila puede seguir cuatro rutas diferentes de desexcitación: (a) ser utilizada para trabajo fotoquímico, (b) ser transferida como energía de excitación a otros pigmentos, (c) ser disipada como calor y/o (d) ser re-

emitida a una longitud de onda mayor a la absorbida, proceso conocido como fluorescencia. La fluorescencia se origina principalmente de la Cl *a* asociada al PSII y disminuye como resultado de la competencia entre reacciones fotoquímicas y no fotoquímicas ²⁶. El coeficiente de extinción (*q*) denota todos los procesos que disminuyen la fluorescencia por debajo de su máximo ²⁶ y toma valores entre 0 y 1.

Derivado de las medidas de fluorescencia se pueden obtener varios parámetros que describen la relación entre la captura de luz y la disipación del exceso de energía: la eficiencia cuántica máxima del PSII (F_v/F_m) y la eficiencia cuántica relativa del PSII (Φ_{PSII}), los coeficientes de extinción fotoquímico (q_P) y no-fotoquímico (q_N) de la fluorescencia ²⁵. La eficiencia fotoquímica de los centros abiertos del PSII está correlacionada positivamente con la eficiencia cuántica de la P_N (Φ_{CO_2}), es decir, cantidad de CO_2 fijado o de O_2 producido por fotón de luz absorbido ²⁵. Por esta razón el uso de la fluorescencia en hojas intactas ha incrementado como un método no-intrusivo de monitoreo de los eventos fotosintéticos para determinar el estado fisiológico de la planta ²⁶.

La información sobre parámetros fotosintéticos de cultivos tropicales es escasa ^{27, 28, 29}, específicamente en cacao (criollo o forastero), pocos son los estudios ecofisiológicos realizados ^{30, 20, 14} y se desconoce de este tipo de información en el cacao ecuatoriano, es decir, no existen trabajos en los cuales se comparan las respuestas ecofisiológicas a la disponibilidad lumínica de los diferentes genotipos de cacao ecuatoriano, tanto en ecosistemas agrícolas como en hábitats naturales.

En Ecuador, el cacao tiene la capacidad de crecer a altas DFF, la evaluación de caracteres morfoanatómicos (área foliar específica, AFE) y fisiológicos (actividad fotoquímica del PSII), al igual que las respuestas fisiológicas del cacao élite ecuatoriano a diferentes intensidades lumínicas, podría ser una importante estrategia para mejorar la producción de este tipo de cacao basándose en un manejo agrícola adecuado, trayendo mayores beneficios a los productores.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación de las áreas de estudio

Los clones de cacao estudiados se encuentran ubicados en la zona Norte de Esmeraldas (Figura 1). Para las mediciones se utilizó un diseño de bloques completos al azar en la finca, propiedad de la Asociación de productores de cacao de Colón Eloy (CE) y en San Agustín (SA). Se realizaron dos ensayos: 1. con plantas de cacao de nueve años de edad, con sombreo, ubicadas en Colón Eloy (N 01°02'00.4'', W 078° 54'33.6'') y 2. con plantas de cacao de dos años de edad, creciendo a plena exposición solar, en la propiedad del Señor Enqui Valencia, ubicada cerca de Monsalve y San Agustín (N 01°03'15.3'', W 078° 55'03.3'').



Figura 1. Mapa de la Provincia Esmeraldas, donde se muestra la ubicación de los dos ensayos en la zona norte de Esmeraldas donde se realizaron las medidas fisiológicas.

Condiciones edafoclimáticas de las zonas de muestreo

En la zona de estudio la precipitación promedio anual de 2665,2 mm; con un periodo de lluvias intensas que va desde diciembre hasta mayo, y otro con lluvias leves que comprende los meses de junio a noviembre; la temperatura promedio de 25,9 °C.

En ambas zonas los suelos son de textura limo-arcillosa (Instituto Oceanográfico de la Armada, Ecuador (INOCAR 2012).

Material Vegetal y Procedencia

El estudio se realizó en 20 clones de cacao (Tabla I): 17 clones nacionales, provienen de la de la Estación experimental Tropical (EET) Pichilingue del Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias del Ecuador (INIAP), resultado de una selección de híbridos y árboles individuales (productivos y tolerantes a enfermedades) y 3 clones criollos (tipo angoleta, con semillas blancas o ligeramente pigmentadas), provenientes de la prospección realizada en el 2005, en la zona de Colón Eloy, Provincia de Esmeraldas.

A partir de la década de 1940, el INIAP, a través del Programa Nacional de Cacao en la EET de Pichilingue ha sumado esfuerzos para recolectar, estudiar y explotar el potencial del complejo “nacional x trinitario” mediante la selección de clones con características de

interés, puesto que éste se encuentra en un 95% de la superficie cacaotera del país. Así, una rigurosa selección fenotípica, basada en los caracteres de producción y resistencia a enfermedades, tuvo lugar en varias fincas cacaoteras de la zona central y el producto fue un grupo de clones comerciales que son distribuidos en el Ecuador desde 1978, algunos de estos clones fueron utilizados en el estudio (Tabla I). El Programa Nacional de Cacao del INIAP, realizó trabajos de mejoramientos en conjunto con la Universidad Técnica "LUIS VARGAS TORRES" (UTE-LVT), orientados a la búsqueda de nuevos cultivares de cacao, con buena productividad, tolerancia a enfermedades y que posean perfiles sensoriales especiales.

Tabla I. Clones de cacao nacional de Ecuador, acrónimo, genotipo y procedencia de los clones ubicados en los ensayos de Clon Eloy (CE) y San Agustín (SA), utilizados en la evaluación fisiológica.

CLON	Tratamiento	GENOTIPO	PROCEDENCIA
A - 2634	T8 (CE)	Trinitario x Trinitario Morado	Pichilingue
EET-446xCCN-51	T13(CE)	Nacional x Trinitario	Pichilingue
CCN-51xEET-233	T14(CE)	Trinitario x Venezolano Amarillo	Pichilingue
CCN-51xEET-462	T16(CE)	Trinitario x (Nacional x Venezolano)	Pichilingue
T21	T21(CE)	Criollo	Colón Eloy
T22	T22(CE)	Criollo	Colón Eloy
T24	T24(CE)	Criollo	Colón Eloy
EET -103	T28(CE)	Nacional x Venezolano Amarillo	Tenguel
CCN-51	CCN-51 (CE)	Trinitario	Naranjal
JHV-10	T30(CE)	Desconocido	Pichilingue
CCN-51xCCAT 2111	T11 (SA)	Trinitario x Nacional	Pichilingue
EET-446xCCN-51	T13 (SA)	Nacional x Trinitario	Pichilingue
CCN-51xEET-233	T14 (SA)	Trinitario x Venezolano Amarillo	Pichilingue
CCN 51 x EET 233	T15 (SA)	Trinitario x Venezolano Amarillo	Pichilingue
CCN-51xEET-462	T16 (SA)	Trinitario x (Nacional x Venezolano)	Pichilingue
CCN-51xEET-534	T23 (SA)	Trinitario x Nacional	Pichilingue
CCN-51xEET-534	T24 (SA)	Trinitario x Nacional	Pichilingue
Máximo Pincay Artonal	PMA12(SA)	Nacional	Quinindé
CCN-51	CCN-51 (SA)	Trinitario	Naranjal
INIAP 484	INIAP 484 (SA)	(AMAZ14 x EBC 148)	Pichilingue

Contenido de agua foliar (CAF) y suelo (CAS)

Contenido de agua foliar (CAF): se tomaron hojas de diferentes clones de cacao, se colocaron en bolsas plásticas herméticas y fueron trasladadas en hielo al laboratorio; se les determinó el peso fresco (P_f), se colocaron a secar en la estufa a 70 ° C por 72 h y se determinó el peso seco (P_s).

El CAF se determinó como la relación: $CAF = 100 * (P_f - P_s) / P_f$ **(Ec. 1)**

Contenido de agua del suelo (CAS): se determinó gravimétricamente en muestras tomadas a 30 cm de profundidad, en ocho repeticiones dentro del área experimental donde se encontraban los diferentes clones de cacao. El suelo se colocó en recipientes de metal de

500 gr de capacidad, donde posteriormente se pesó el Peso húmedo del suelo (PH), luego se secó a 70 °C durante 72 h, y se volvió a pesar obteniéndose el Peso seco del suelo (PS). El CAS se determinó como la relación: $CAS = 100 * (PH - PS) / PH$ **(Ec.2)**

Todas las evaluaciones fisiológicas se realizaron en al menos seis árboles de cada clon, en cada uno de los ensayos, en un área sombreada (Colon Eloy, CE) y otra expuesta a plena exposición solar (San Agustín, SA). Todas las mediciones fisiológicas se realizaron en la tercera hoja madura y completamente expandida de cada individuo.

Área foliar específica (AFE)

El AFE se determinó en un área foliar (A_f) conocida, fue secada en una estufa a 70°C durante 72 horas y luego fueron pesados con una balanza (Adventures, OHAUS; China, sensibilidad 0,0001 g). El AFE se determinó como la relación entre el área foliar y el peso seco foliar, según la ecuación: $AFE = A_f / P_s$ (cm² g⁻¹) **(Ec. 3)**

Actividad fotoquímica

Se determinó la actividad fotoquímica del PSII a través de las medidas de fluorescencia de la clorofila *a* del PSII utilizando un fluorímetro portátil (PAM 2100, WALZ, Alemania). La temperatura foliar fue medida con el termopar de la pinza del Fluorímetro. Se determinaron la fluorescencia mínima (F_o) y la fluorescencia máxima (F_m) de hojas adaptadas por dos horas a oscuridad y la fluorescencia mínima (F'_o), fluorescencia máxima (F'_m) y fluorescencia estable (F) de hojas adaptadas a una DFF de 400 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Previos trabajo señalan que esta DFF es saturante para el cacao ^{19,20}.

Con estas medidas se calcularon los siguientes parámetros:

- Eficiencia cuántica máxima o potencial del PSII (F_v/F_m) ²⁵.

$$F_v/F_m = (F_m - F_o)/F_m \quad \text{(Ec.4)}$$

- Eficiencia cuántica relativa del transporte lineal de los electrones a través del PSII (Φ_{PSII}) expresa el número de electrones transportados a través del PSII relativo al número de fotones absorbido por PSII, representando una medida relativa del rendimiento fotoquímico del PSII ²⁵.

$$\Phi_{PSII} = (F'_m - F)/F'_m \quad \text{(Ec. 5)}$$

- Coeficiente de extinción fotoquímica (q_P) está relacionado con el estado redox de la quinona primaria (el aceptor de electrones del PSII, Q_A), este coeficiente denota la proporción de fotones capturados por trampas abiertas (Q_A oxidadas) que son convertidos a energía química en el centro de reacción del PSII ²⁶.

$$q_P = (F'_m - F)/F'_m - F'_o \quad \text{(EC. 6)}$$

- Coeficiente de extinción no fotoquímica (q_N) es proporcional a la cantidad de energía disipada en forma de calor y puede ser causada *in vivo* bajo condiciones fisiológicas por tres mecanismos principalmente: 1) extinción dependiente de energía causada

por la acidificación intratilaicoide durante las reacciones lumínicas; 2) extinción relacionada con la transición estado 1-estado 2 regulado por la fosforilación del complejo antena del PSII; y 3) extinción fotoinhibitoria relacionada con la fotoinhibición de P_N ²⁶.

$$q_N = 1 - (F'_m - F'_o) / F_m - F_o \tag{Ec.7}$$

- El transporte total de electrones (J) se estimó de la siguiente manera:

$$J = \Phi_{PSII} \times DFF \times a \times f \tag{Ec. 8}$$

Donde *a* es la fracción de DFF absorbida por la hoja (considerada como 0,84) y *f* es (0,5) representa la proporción de e⁻ que es absorbida por el PSII, considerando que ambos fotosistemas están involucrados de igual manera en el transporte lineal de e⁻.

Análisis estadístico

Se realizaron análisis de varianza (ANOVA) para evaluar si los parámetros morfoanatómicos y fotoquímicos medidos en los diferentes clones difieren entre sí en los dos ensayos estudiados. Se utilizó un nivel de significancia $\alpha = 0,05$. Las pruebas se realizaron utilizando el paquete estadístico STATISTICA v8.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Comparación de la temperatura foliar y el contenido de agua en el suelo (CAS) por localidad

Se observaron las mayores temperaturas foliares y un menor CAS en la localidad de San Agustín (SA) donde el cacao se encuentra completamente expuesto, producto de una mayor incidencia de radiación y mayor evaporación en esta localidad, en comparación con la otra (CE) (Tabla II). No se observaron diferencias significativas en la DFF utilizadas para las medidas de actividad fotoquímica en ambas localidades. Las bajas DFF en CE y el mayor porcentaje de humedad relativa ayuda a reducir el déficit hídrico de las plantas; sin embargo, hay que tener en cuenta que en las épocas donde aumenta la humedad relativa las condiciones se hacen propicias para la propagación de hongos, como ha sido previamente reportado ³².

Tabla II. Temperatura foliar promedio de los clones estudiados (n=120), contenido de agua del suelo (n=8) de cada localidad estudiada y la densidad de flujo de fotonico a la cual se realizaron las medidas de actividad fotoquímica.

Localidad	Temperatura foliar (°C)	CAS (%)	Alta DFF ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)
Colón Eloy (CE)	30,3 ± 0,09 ^a	29,0 ± 0,6 ^b	419,2 ± 8,5 ^a
San Agustín (SA)	32,9 ± 0,13 ^b	26,1 ± 1,1 ^a	425,2 ± 7,3 ^a

Contenido de agua foliar (CAF) y área foliar específica (AFE)

No se observaron diferencias significativas en el CAF entre localidades (Figura 2). Sin embargo, el menor CAF fue obtenido en el clon (T24) ubicado en SA, mientras que los

mayores fueron encontrados en el clon T28 (CE) y T11 (SA). Los valores CAF observados, sugieren un buen estado hídrico en la mayoría de los clones de cacao estudiados, excepto para el clon T24 (SA), lo que puede deberse a que el estudio se realizó en temporada lluviosa.

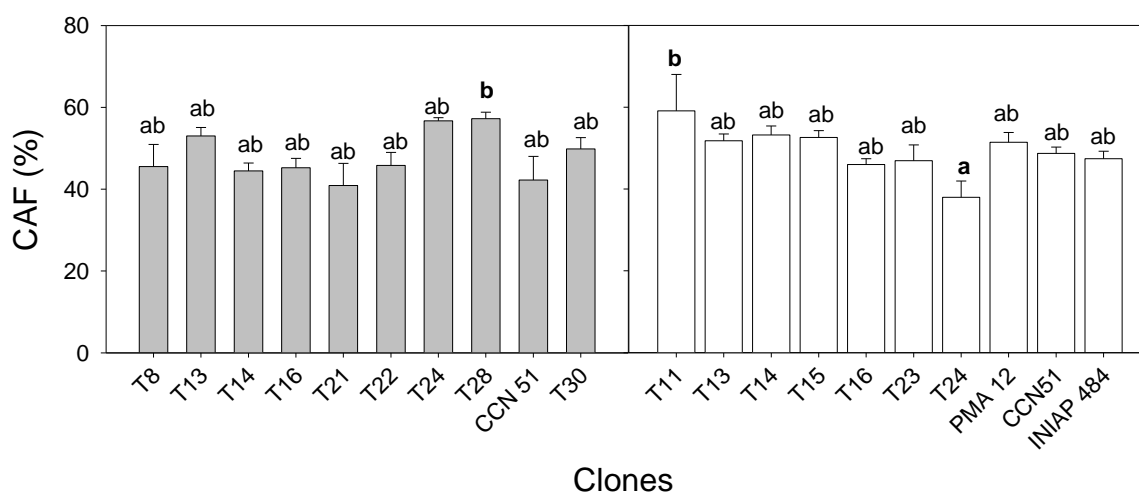


Figura 2. Contenido de agua foliar (CAF) en diferentes clones de cacao en plantas sombreadas (Barras grises, Colon Eloy) y expuestas (barras blancas, San Agustín). Los valores son la media \pm ES (n=6). Letras diferentes muestran diferencias significativas entre clones ($p < 0,05$).

Se encontraron diferencias significativas en el AFE entre clones evaluados (Figura 3), observándose el mayor valor de AFE en el clon T28 (CE), indicando una menor inversión de biomasa hacia las hojas en este clon; en general los clones ubicados en SA mostraron menores AFE, lo que podría estar asociado a un mayor grosor foliar como respuesta a una alta exposición lumínica; comparativamente las hojas de los clones en CE son más delgadas. El AFE promedio de todos los clones estudiados fue de $135,5 \pm 3$, menores a los valores reportados previamente para ocho clones de cacao forastero ($170-240 \text{ cm}^2 \text{ g}^{-1}$)³³.

Un AFE mayor en cacao podría traducirse en una mayor intercepción de las bajas DFF que llegan al sotobosque. Las mayores AFE en las plantas de CE (zona con menor exposición solar) se asemejan a lo reportado en plantas cultivadas en sombra, las cuales generalmente presentan hojas más delgadas debido a que el parénquima en empalizada tiene células más pequeñas y/o en menor número de capas³⁴.

Estas hojas poseen más clorofila por unidad de masa, mayor cantidad de clorofila b, menores tasas de respiración, una menor DFF de saturación, menor cantidad de pigmentos fotoprotectores y por lo tanto, una mayor susceptibilidad a fotoinhibición que las hojas expuestas al sol³⁵.

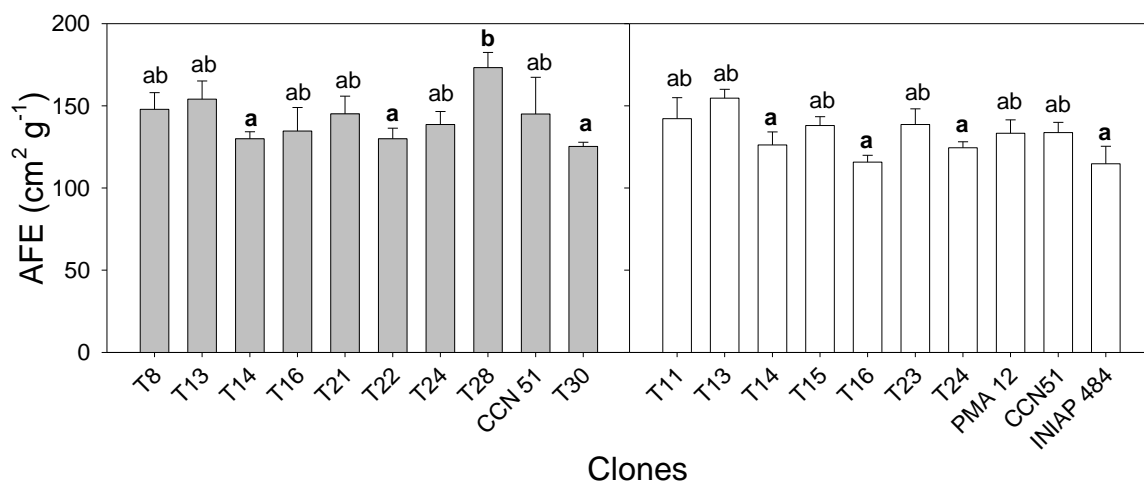


Figura 3. Área foliar específica (AFE) en diferentes clones de cacao de plantas sombreadas (Barras grises, Colon Eloy) y expuestas (barras blancas, San Agustín). Los valores son la media ± ES (n=6). Letras diferentes muestran diferencias significativas entre clones (p<0,05).

Actividad fotoquímica

Eficiencia cuántica máxima del PSII (F_v/F_m)

Se encontraron diferencias significativas en el F_v/F_m de los clones estudiados (p<0,05; Figura 4). Se observaron valores alrededor de 0,8 en F_v/F_m en al menos 7 clones en CE, indicando un buen funcionamiento del aparato fotoquímico, valores que concuerdan con los reportados en cultivares forasteros de cacao³³, en cacao criollo^{19,20} y con lo reportado para plantas sanas que no están sometidas a ningún tipo de estrés³⁶. En contraste bajos valores de F_v/F_m han sido reportado para cultivares de cacao criollo en el Sur del Lago de Maracaibo, lo cual fue explicado por una baja disponibilidad de fósforo¹⁸. En este estudio el F_v/F_m no disminuyó por debajo de 0,75, sugiriendo ausencia de fotoinhibición crónica.

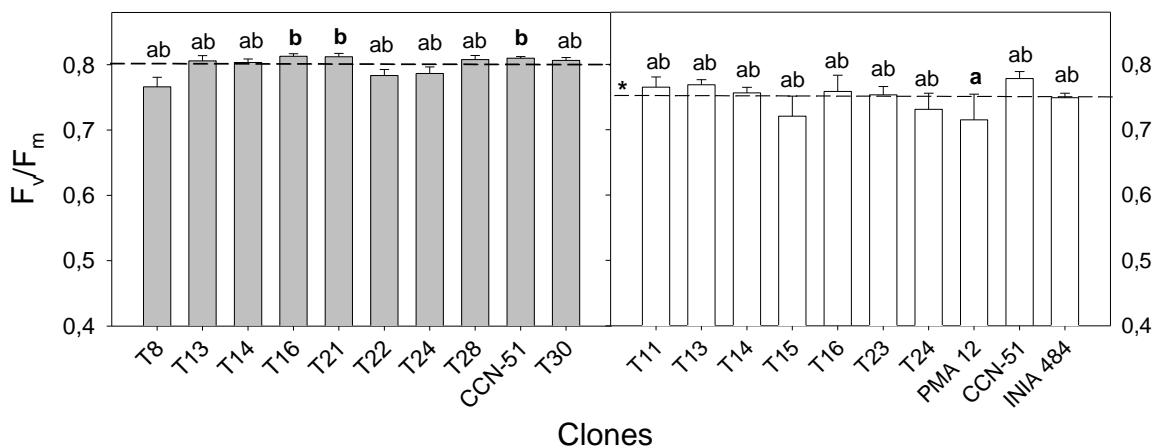


Figura 4. Eficiencia cuántica máxima del PSII (F_v/F_m) en diferentes clones de cacao de plantas sombreadas (Colon Eloy) y expuestas (San Agustín). Los valores son la media ± ES (n=6). Líneas quebradas representan los valores promedios de clones

en cada localidad, el asterisco muestra diferencia significativa entre las localidades ($p < 0,05$). Barras grises (Colón Eloy) y barras blancas (San Agustín). Letras diferentes muestran diferencias significativas entre clones.

Se encontraron valores significativamente menores de F_v/F_m en los clones expuestos en SA ($0,75 \pm 0,003$) que lo observado en clones sombreados CE ($0,80 \pm 0,001$); lo que podría indicar algún grado de fotoinhibición dinámica del PSII³⁶ y/o una regulación descendente de la actividad fotoquímica, ya que en SA una DFF saturante podría ser considerado un factor de estrés en clones de cacao estudiado.

Se ha reportado que la reducción en F_v/F_m causadas por algún tipo de estrés (biótico o abiótico) podrían ser considerada como un indicador de fotoinhibición, debido a una pérdida de función a nivel del aparato fotosintético³⁷; el exceso de excitación generado por altas intensidades de energía lumínica puede resultar en la inactivación del PSII, el daño oxidativo, y la fotoinhibición de la P_N ³⁸. Sin embargo, también se ha reportado que una disminución de este parámetro está asociada a procesos de fotoprotección³⁹, ya que puede ser considerada como la capacidad de las plantas para ajustar la fotosíntesis a las condiciones ambientales prevalecientes, en lugar de un proceso que necesariamente se traduce en daños o lesiones a las plantas³⁸.

Cuando las plantas están expuestas a altas DFF, la cantidad de energía lumínica interceptada puede sobrepasar la capacidad de la maquinaria fotosintética de procesar dicha energía, dando lugar a fotoinhibición⁴⁰, proceso caracterizado por una disminución en la eficiencia cuántica máxima del fotosistema II (PSII) (F_v/F_m) y que ocasiona reducciones en P_N ³⁹. La fotoinhibición puede ser dinámica o crónica, la primera es reversible y está asociada con una disipación térmica del exceso de energía absorbida y a una reducción en la eficiencia fotoquímica^{41, 42}. La fotoinhibición crónica en cambio, ocurre cuando el exceso de luz absorbida genera especies reactivas del oxígeno, que pueden causar daños en el aparato fotosintético⁴³. Las plantas pueden protegerse del exceso de luz absorbida mediante una regulación descendente de la eficiencia cuántica⁴⁴ y a través del ciclo de las xantofilas: el estado de de-epoxidación (DEPS) de las xantofilas permite una disipación el exceso de energía antes de llegar a los centros de reacción del PSII evitando el fotodaño^{41, 45, 46}.

Transporte de electrones, eficiencia cuántica y coeficientes de extinción de la fluorescencia

Se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los clones de cacao estudiados en J, observándose valores relativamente bajos de J entre 31 a 82 $\mu\text{mol e}^- \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Tabla III), no se encontraron diferencias significativas de este parámetro entre localidades. Estos valores de J son similares lo reportado en cultivares de cacao venezolano^{19, 20} sugiriendo que las bajas tasa de P_N reportada en cacao puede estar relacionado a una baja tasa de transporte de electrones. La Φ_{PSII} mostro diferencias significativas entre clones y en general las mayores Φ_{PSII} se observaron en CE, en comparación con SA (Tabla III). Una tendencia similar fue observada en q_p . Mientras que una mayor disipación térmica en forma de calor fue evidenciada en los clones cultivados en CE mostraron mayores q_N que los clones de cacao en SA.

Altos valores de Φ_{PSII} fueron observados en ambas localidades (Tabla III); valores similares han sido reportados en cacao criollo^{19, 20}. Los valores obtenidos en este estudio de Φ_{PSII} son

hasta dos veces más altos que los reportados para cacao forastero amelonado del bajo amazona ⁴⁷.

Tabla III. Parámetros de fluorescencia: tasa de transporte de electrones (J), eficiencia cuántica relativa del PSII (Φ_{PSII}), coeficiente de extinción fotoquímica (q_P), coeficiente de extinción no fotoquímica (q_N) en diferentes clones de cacao de plantas sombreadas (Colon Eloy) y expuestas (San Agustín). Los valores son la media \pm ES (n=6). Medidas realizadas a una densidad de flujo fotónico ($400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Letras diferentes en cada columna indican diferencias significativas entre clones ($p < 0,05$).

Clones	J	Φ_{PSII}	q_P	q_N
T08 (CE)	81,9 \pm 2 ^d	0,48 \pm 0,01 ^c	0,76 \pm 0,01 ^{cd}	0,64 \pm 0,02 ^{abc}
T13 (CE)	62,1 \pm 6 ^{abcd}	0,39 \pm 0,04 ^{bc}	0,61 \pm 0,08 ^{abcd}	0,63 \pm 0,06 ^{abc}
T14 (CE)	69,7 \pm 5 ^{abcd}	0,39 \pm 0,02 ^{bc}	0,62 \pm 0,04 ^{abcd}	0,69 \pm 0,03 ^{abc}
T16 (CE)	62,5 \pm 5 ^{abcd}	0,40 \pm 0,03 ^c	0,65 \pm 0,05 ^{abcd}	0,67 \pm 0,05 ^{abc}
T21 (CE)	78,7 \pm 5 ^{cd}	0,46 \pm 0,03 ^c	0,67 \pm 0,06 ^{abcd}	0,55 \pm 0,04 ^{abc}
T22 (CE)	68,7 \pm 8 ^{abcd}	0,40 \pm 0,04 ^c	0,62 \pm 0,07 ^{abcd}	0,59 \pm 0,05 ^{abc}
T24 (CE)	80,7 \pm 9 ^d	0,43 \pm 0,02 ^c	0,70 \pm 0,03 ^{bcd}	0,66 \pm 0,02 ^{abc}
T28 (CE)	71,7 \pm 6 ^{abcd}	0,44 \pm 0,04 ^c	0,67 \pm 0,03 ^{abcd}	0,65 \pm 0,06 ^{abc}
CCN51 (CE)	74,1 \pm 10 ^{bcd}	0,45 \pm 0,06 ^c	0,72 \pm 0,07 ^{bcd}	0,68 \pm 0,04 ^{abc}
T30 (CE)	63,3 \pm 8 ^{abcd}	0,37 \pm 0,05 ^{bc}	0,62 \pm 0,09 ^{abcd}	0,68 \pm 0,05 ^{abc}
T11 (SA)	63,8 \pm 4 ^{abcd}	0,36 \pm 0,02 ^{bc}	0,54 \pm 0,05 ^{abc}	0,31 \pm 0,12 ^a
T13 (SA)	81,7 \pm 8 ^d	0,44 \pm 0,04 ^c	0,72 \pm 0,06 ^{bcd}	0,45 \pm 0,10 ^{abc}
T14 (SA)	74,7 \pm 18 ^{bcd}	0,36 \pm 0,08 ^{bc}	0,68 \pm 0,09 ^{bcd}	0,34 \pm 0,14 ^a
T15 (SA)	30,7 \pm 1 ^a	0,16 \pm 0,00 ^a	0,39 \pm 0,02 ^a	0,82 \pm 0,01 ^c
T16 (SA)	34,3 \pm 2 ^{ab}	0,18 \pm 0,01 ^{ab}	0,50 \pm 0,07 ^{abc}	0,85 \pm 0,03 ^c
T23 (SA)	75,2 \pm 11 ^{bcd}	0,48 \pm 0,02 ^c	0,86 \pm 0,05 ^d	0,37 \pm 0,14 ^{ab}
T24 (SA)	80,9 \pm 4 ^d	0,47 \pm 0,02 ^c	0,79 \pm 0,02 ^{cd}	0,49 \pm 0,08 ^{abc}
PMA12 (SA)	37,9 \pm 2 ^{abc}	0,19 \pm 0,03 ^{ab}	0,46 \pm 0,07 ^{ab}	0,79 \pm 0,04 ^{cd}
CCN 51 (SA)	74,1 \pm 4 ^{bcd}	0,41 \pm 0,02 ^c	0,68 \pm 0,03 ^{bcd}	0,45 \pm 0,08 ^{abc}
INIAP 484 (SA)	80,5 \pm 7 ^d	0,39 \pm 0,04 ^{bc}	0,73 \pm 0,03 ^{bcd}	0,65 \pm 0,09 ^{abc}

Los menores valores de Φ_{PSII} y q_P observados en SA, podría indicar que los clones más expuestos (SA) tienen menor capacidad de transferencia de la energía captada por los centros de reacción del PSII, sin apreciarse un aumento en la disipación térmica del exceso de energía en forma de calor (q_N), sugiriendo una regulación descendente de la actividad fotoquímica de las plantas de cacao en condiciones de alta DFF ⁴⁸.

CONCLUSIONES

Los clones evaluados presentaron una alta plasticidad morfológica y fisiológica aun cuando crecen en condiciones lumínicas contrastantes. Estos clones mostraron diferencias en la actividad fotoquímica (J , Φ_{PSII} , q_N y q_P) y en el AFE, que podrían permitir ajustarse a las diferentes condiciones lumínicas. Se constató que en clones de cacao, cultivados en un área expuesta (con altas DFF) se redujeron significativamente tanto el AFE y F_v/F_m , mostrando aclimatación morfoanatómica, como la regulación descendente del aparato fotoquímico, sin evidencias de fotoinhibición crónica. Se encontraron bajas tasas de transporte de electrones (J) lo cual explicaría parcialmente las bajas P_N en este cultivo. El cacao es un cultivo nativo de hábitats sombreados pero como se ha verificado, en Ecuador existen clones que pueden aclimatar los caracteres fisiológicos y morfológicos en plantas cultivadas a plena exposición solar. Sin embargo, un estudio más detallado debe realizarse para conocer con certeza si todos los genotipos de cacao pueden desarrollarse exitosamente a plena exposición solar y aclarar si será beneficioso cultivar el cacao a plena exposición solar ante un inminente cambio climático, considerando que las condiciones de estrés abiótico serán influenciadas por la marcada variación del clima ante el nuevo escenario ambiental.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen de manera especial al Proyecto Prometeo y a su programa de becas, específicamente a la beca PROMETEO-20150158BP, de la Secretaría de Educación Superior, Ciencia, Tecnología e Innovación (SENESCYT) de la República del Ecuador por su patrocinio y financiamiento en este trabajo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Larcher W. 1995. Physiological Plant Ecology. En: Ecophysiology and Stress Physiology of Function Groups (3rd edition). Springer Verlag, Berlin-Heidelberg.
- [2] Bazzaz F, Morse S. 1991. The Response of Annual Plants to Multiple Stresses. Winnert W, Pell E, Mooney HA, (Eds.). San Diego (California), pp 283-299.
- [3] ICCO. 2015. Quarterly Bulletin of Cocoa Statistics, Vol. XXXIX, No. 2, Cocoa year 2014/15. <http://www.icco.org>
- [4] Sistema de Información Nacional de Agricultura, Ganadería, Acuicultura y Pesca (SINAGAP) 2014. <http://sinagap.agricultura.gob.ec>
- [5] Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). 2010. www.fao.org/home
- [6] Almeida A, Valle R. 2007. Ecophysiology of the cacao tree. Brazilian J. Plant Physiology 19: 425-448.
- [7] Motamayor JC, Risterucci AM, Lopez PA, Ortiz C.F., Moreno, A., and Lanaud C. 2002. Cacao domestication I: The origin of the cacao cultivated by the Mayas. Heredity 89, 380-386.

- [8] Motamayor JC, Lachenaud P, da Silva e Mota JW, Loor R, Kuhn DN, Brown JS, Schnell RJ. 2008. Geographic and genetic population differentiation of the Amazonian chocolate tree (*Theobroma cacao* L.). *PLoS ONE* 3: 1–8.
- [9] Escobar R. 2008. Comportamiento de seis clones de “cacao” (*Theobroma cacao* L.) en Guasaganda, provincia de Cotopaxi, Ecuador. *La Granja* 7(1): 9-12.
- [10] Loor R, Amores F. 2003. Explorando la variabilidad del cacao tipo Nacional para identificar clones elite. *Revista Sabor Arriba* 2(4): 18–19.
- [11] Wood GAR, Lass RA. 1959. El cacao en el Ecuador. En: *Notes on Three Cocoa Diseases, Cocoa Growing in Venezuela, Colombia, and Ecuador*. Cadbury Brothers Ltd. Bournville, USA. pp. 35-52.
- [12] Baligar V, Bunce J, Machado R, Elson M. 2008. Photosynthetic photon flux density carbon, dioxide concentration and vapor pressure deficit effects on photosynthesis in cacao seedlings. *Photosynthetica* 46: 216-221.
- [13] Liang N, Tang Y, Okuda T. 2001. Is elevation of carbon dioxide concentration beneficial to seedling photosynthesis in the understory of tropical rain forests? *Tree Physiology* 21: 1047-1055.
- [14] Jaimez R, Tezara W, Coronel I. 2008. Ecofisiología del cacao (*Theobroma cacao*): su manejo en el sistema agroforestal. Sugerencias para su mejoramiento en Venezuela. *Revista Forestal Venezolana* 52(2): 253-258.
- [15] Huxley P. 2001. Multipurpose trees: biological and ecological aspects relevant to their selection and use. En: *Tree Crop Ecosystems*. Last F. (Ed.). Elsevier, Amsterdam pp: 19-74.
- [16] Matos F, Wolfgramm R, Gonçalves F, Cavatte P, Ventrella M, DaMatta F. 2009. Phenotypic plasticity in response to light in the coffee tree. *Environmental and Experimental Botany* 67: 421-427.
- [17] Fahl J, Carelli M, Vega J, Magalhães A. 1994. Nitrogen and irradiance levels affecting net photosynthesis and growth of young coffee plants (*Coffea arabica* L.). *Horticultural Science & Biotechnology* 69: 161-169.
- [18] Araque O, Jaimez RE, Tezara W, Coronel I, Urich R, Espinoza W. 2012. Comparative photosynthesis, water relations, growth and survival rates in juvenile Criollo cacao cultivars (*Theobroma cacao*) during dry and wet seasons. *Experimental Agriculture* 48, 513–522.
- [19] Ávila-Lovera E, Coronel I, Jaimez R, Urich R, Pereyra G, Araque O, Chacón I, Tezara W. 2016. Ecophysiological traits of adult trees of Criollo cocoa cultivars (*Theobroma cacao* L.) from a germplasm bank in Venezuela. *Experimental Agriculture* 52: 137-153 doi: 10.1017/S0014479714000593.
- [20] Tezara W, Urich R, Jaimez R, Coronel I, Araque O, Azócar C, Chacón I. 2016. Does Criollo cocoa have the same ecophysiological characteristics than Forastero? *Botanical Sciences* in press.
- [21] Pinheiro HA, Damatta FM, Chavez AM, Loureiro ME, Ducatti C. 2005. Drought Tolerance is Associated with Rooting Depth and Stomatal Control of Water Use in Clones of *Coffea canephora*. *Annals of Botany* 96: 101–10.
- [22] Martins SCV, Galmés J, Cavatte PC, Pereira LF, Ventrella MC, DaMatta FM. 2014. Understanding the low photosynthetic rates of sun and shade coffee leaves: bridging the gap on the relative roles of hydraulic, diffusive and biochemical constraints to photosynthesis. *Plos ONE* 9, 1–10.
- [23] Farquhar GD, von Caemmerer S. 1982. Modeling of photosynthetic responses to environmental conditions. En: *Lange, O.L., Nobel, P.S., Osmond, C.B., Zeigler, H. (Eds.). Physiological Plant Ecology II. Encyclopedia of Plant Physiology, new series, Vol. 12B*, Springer-Verlag, Heidelberg. Pp. 550-587
- [24] Wang K, Kellomäki S. 1997. Effects of elevated CO₂ and soil-nitrogen supply on chlorophyll fluorescence and gas exchange in Scots pine, based on a branch-in-bag experiment. *New Phytologist* 136: 277-286.
- [25] Genty B, Briantais JM, Baker NR. 1989. The relationships between the quantum yield of photosynthesis electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochim. Biophys. Acta* 990: 87-92.
- [26] Krause GH, Weis E. 1991. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: The basics. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 42: 313-349.

- [27] Joly R, Hahn D. 1989. Net assimilation of cacao seedlings during periods of plant water deficit. *Photosynthesis research* 21:151-159.
- [28] Balasimha D, Daniel E, Bhat P. 1991. Influence of environmental factor on photosynthesis in cocoa trees. *Agriculture Forest Meteorology* 55:15-21.
- [29] DaMatta F, Ronchi C, Barros R, Maestri M. 2007. Ecophysiology of coffee growth and production. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 19: 485-510.
- [30] Tezara W, Coronel I, Urich R, Marín O, Jaimez R, Chacón I. 2009. Plasticidad ecofisiológica de árboles de cacao (*Theobroma cacao* L.) en diferentes ambientes de Venezuela. En: III Congreso Latinoamericano de Ecología y IX Congreso de Ecología de Brazil. São Lorenzo pp: 1-5.
- [31] Krall JP, Edwards GE. 1992. Relationship between photosystem II activity and CO₂ fixation in leaves. *Physiol. Plant.* 86: 180-187.
- [32] Porras V, Sánchez L. 1991. Enfermedades del cacao. En: Fundación Hondureña de investigación agrícola, La Lima, Cortés, Honduras pp: 7-27.
- [33] Daymond A, Tricker P, Hadley P. 2011. Genotypic variation in photosynthesis in cacao is correlated with stomatal conductance and leaf nitrogen. *Biologia Plantarum* 55 (1): 99-104.
- [34] Lambers H, Chapin I, Pons T. 1998. *Plant Physiological Ecology*. Springer-Verlag, New York pp: 540.
- [35] Walters R. 2005. Towards an understanding of photosynthetic acclimation. *Experimental Botany* 56: 435-447.
- [36] Maxwell K, Johnson G. 2000. Chlorophyll fluorescence a practical guide. *Journal of Experimental Botany* 51: 659-668.
- [37] Bilger W, Schreiber U, Bock M. 1995. Determination of the quantum efficiency of photosystem II and of non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence in the field. *Oecologia* 102 (4): 425-432
- [38] Huner N, Öquist Hurry N, Krol M, Falk S, Griffith M. 1993. Photosynthesis, photoinhibition and low-temperature acclimation in cold tolerant plants. *Photosynthesis Research* 37: 19-39.
- [39] Osmond C. 1994. What is photoinhibition? Some insights from comparisons of shade and sun plants. En: Baker N.; Bowyer J. (eds). *Photoinhibition of Photosynthesis: from Molecular Mechanisms to the Field*. BIOS Scientific Publishers Oxford pp: 1-24.
- [40] Moraes G, Chaves A, Matins S, Barros R, DaMatta F. 2010. Why is it better to produce coffee seedlings, a plant native to shaded habitats in full sunlight than in the shade? *Photosynthetica* 48(2): 199-207.
- [41] Demmig-Adams B, Adams W, Baker D, Logan B, Bowling D, Verhoeven AS. 1996. Using chlorophyll fluorescence to assess the fraction of absorbed light allocated to thermal dissipation of excess excitation. *Physiologia Plantarum* 98: 253-264.
- [42] Thiele A, Krause G, Winter K. 1998. In situ study of photoinhibition of photosynthesis and xanthophyll cycle activity in plant growing in natural gaps of the tropical forest. *Australian Journal of Plant Physiology* 25: 189-195.
- [43] Mittler R. 2002. Oxidative stress antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science* 7: 405-410.
- [44] Asada K. 1999. The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annual Review, Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 50: 601-639.
- [45] Demmig-Adams B, Adams W. 2006. Photoprotection in an ecological context: The remarkable complexity of thermal energy dissipation. *New Phytologist* 172: 11-21.
- [46] Adams W, Zarter C, Ebbert V, Demmig-Adams B. 2004. Photoprotective strategies of overwintering evergreens. *Bioscience* 54: 41-49.
- [47] Bae H, Kim S-H, Kim MS, Sicher RC, Strem MD, Natarajan S, Bailey, BA. 2008. The drought response of *Theobroma cacao* (cacao) and the regulation of genes involved in polyamine biosynthesis by drought and other stresses. *Plant Physiology and Biochemistry* 46: 174-188.
- [48] Laisk A, Oja, V, Rasulov B, Eichelmann H, Sumberg A. 1997. Yields and Rate Constants of Photochemical and Nonphotochemical Excitation Quenching (Experiment and Model). *Plant Physiology* 115: 803-815.