

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR  
FACULTAD MULTIDISCIPLINARIA DE OCCIDENTE  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA



**TRABAJO DE GRADO**

EVALUACIÓN DEL POTENCIAL DE REGENERACIÓN DE DIFERENTES GENOTIPOS  
SALVADOREÑOS DE CACAO (*Theobroma cacao* L.) VÍA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA

**PARA OPTAR AL GRADO DE**

LICENCIADO EN BIOLOGÍA

**PRESENTADO POR**

CHRISTIAN ERNESTO FIGUEROA RAMÍREZ

**DOCENTES ASESORES**

MAESTRO RICARDO FIGUEROA CERNA

DOCTORA VIANNEY CASTAÑEDA MONROY

**ABRIL, 2022**

SANTA ANA, EL SALVADOR, CENTROAMÉRICA

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

AUTORIDADES



M.Sc. ROGER ARMANDO ARIAS ALVARADO

**RECTOR**

DR. RAÚL ERNESTO AZCÚNAGA LÓPEZ

**VICERRECTOR ACADÉMICO**

ING. JUAN ROSA QUINTANILLA QUINTANILLA

**VICERRECTOR ADMINISTRATIVO**

ING. FRANCISCO ANTONIO ALARCÓN SANDOVAL

**SECRETARIO GENERAL**

LICDO. LUIS ANTONIO MEJÍA LIPE

**DEFENSOR DE LOS DERECHOS UNIVERSITARIOS**

LICDO. RAFAEL HUMBERTO PEÑA MARIN

**FISCAL GENERAL**

FACULTAD MULTIDISCIPLINARIA DE OCCIDENTE

AUTORIDADES



M.Ed. ROBERTO CARLOS SIGÜENZA CAMPOS

**DECANO**

M.Ed. RINA CLARIBEL BOLAÑOS DE ZOMETA

**VICEDECANA**

LICDO. JAIME ERNESTO SERMEÑO DE LA PEÑA

**SECRETARIO**

LICDO. CARLOS MAURICIO LINARES HERNÁNDEZ

**JEFE DEL DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA**

## DEDICATORIA

A **Dios**, primeramente, por ser el pilar que sostiene mi vida y quien me da aliento a seguir adelante, ya que sin él no soy nada.

A mi madre **Ana Mirian Ramírez de Figueroa**, por apoyarme siempre y darme alientos a seguir adelante ya que ella es mi fuente de inspiración para poder luchar y afrontar la vida que me diste, la mejor madre que pueda existir, el mejor regalo que puedo tener, gracias por ayudarme a vencer los obstáculos de la vida, TE AMO. A mi padre **Héctor Ernesto Figueroa Oliva**, que estuvo presente y animándome para seguir adelante, por la protección que me brindaste y el cariño que me demuestras, gracias por siempre ser esa persona que a pesar de las dificultades siempre has hecho mucho por nosotros tus hijos TE AMO.

A mi hermana mayor **Johanna Elizabeth Figueroa de Aguilar**, por estar conmigo siempre y por ayudarme a ser fuerte en las adversidades de la vida. A mi hermana menor **Vanessa Julissa Figueroa Ramírez**, por animarme y brindarme su cariño. A mi abuela **María Magdalena Ramírez**, por estarme animando a seguir en la vida. A mis tías **Nubia Rodríguez** que en paz descanse, y **Vilma Figueroa**, por apoyar a nuestra familia en todos los momentos.

Persona, intelectual diligente, honesta, leal que conocí, que me enseñó que en la vida hay que seguir y nunca perder las esperanzas, increíble por dentro y por fuera, gracias por alegrarme los días con una sonrisa, por ese apoyo incondicional y desinteresado, te agradezco donde estés grandemente.

A mis queridos amigos incondicionales que llegué a formar en el transcurso de este recorrido de la vida, ya que uno debe aprender a vivir de la mejor manera en compañía de todos ellos, por los consejos y por las experiencias que marcaron mi vida y que me enseñaron en toda circunstancia.

EU AMO A VOCE

## AGRADECIMIENTOS

Principalmente a Dios todo poderoso, por darnos el conocimiento y la paciencia necesaria para poder obtener este grado académico.

Agradezco a mi Familia por darme el apoyo incondicional durante el transcurso de mi vida

A mi asesor interno **M.Sc. Ricardo Figueroa Cerna**, por su paciencia y dedicación al momento de realizar este trabajo y así culminar este peldaño de mi vida.

A mi asesora externa **Dra. Vianney Castañeda Monrroy**, por tener paciencia al momento de realizar este trabajo y ser la aportadora de muchos ánimos para seguir y aprender más de esto, ya que es su especialización como investigadora, se le agradece de una forma solemne y humilde por ser parte de este hermoso trabajo que no será solo para los desarrolladores si no para la ciencia, y por ese amor que se tiene hacia la genética y la biología celular y molecular, a **Amy y Margarita** por su apoyo especial en el desarrollo de esta investigación.

A **CENSALUD** por brindarme la hermosa experiencia de poder desarrollar mi trabajo de tesis en ese lugar, y así poner en práctica mis conocimientos adquiridos en el transcurso de mi carrera.

A toda la Universidad de El Salvador facultad multidisciplinaria de Occidente, en especial a los docentes del departamento de biología (**Lic. Amaya, Lic. Delfina Abrego, Lic. Morales, Lic. Linares, Lic. Bessy Álvarez, Lic. Ortez, Lic. Rosales, Lic. Figueroa, Lic. Guerra, Lic .Chilin**) de Biología de la FMOcc., que contribuyeron a mi formación.

## ÍNDICE

RESUMEN.....	xiii
INTRODUCCIÓN .....	xv
CAPÍTULO I: MARCO TEÓRICO.....	17
1.1 Características biológicas y morfológicas del cacao.....	17
1.1.1 Partes morfológicas.....	18
1.1.1.1 la raíz .....	18
1.1.1.2 Tallo y ramas .....	19
1.1.1.2.1 Brotes jóvenes.....	20
1.1.1.3 Hojas.....	20
1.1.1.4 Inflorescencia .....	21
1.1.1.4.1 Biología floral .....	23
1.1.1.5 El fruto.....	24
1.1.1.5.1 La semilla.....	24
1.2 Sub-especies y cacao domesticado.....	25
1.3 Clasificación taxonómica .....	26
1.4 Grupos genéticos.....	26
1.5 Distribución, suelo y condiciones climáticas .....	27
1.5.1 Distribución mundial.....	27
1.5.2 Suelo.....	28
1.5.3 Condiciones climáticas .....	28
1.6 Cultivo.....	29
1.6.1 Propagación regenerativa .....	30
1.6.2 Propagación vegetativa.....	31
1.7 Métodos de multiplicación.....	31

1.7.1 Injertos .....	31
1.7.2 Estacas o ramillas .....	32
1.7.3 Acodos .....	33
1.7.4 Propagación “in vitro” de cacao.....	33
1.8 Propagación “in vitro” .....	33
1.8.1 Generalidades del cultivo “in vitro” .....	34
1.8.2 Embriogénesis somática.....	34
1.8.3 Embriogénesis directa e indirecta.....	35
1.8.4 Fases de la embriogénesis somática. ....	35
1.8.5 Aspecto fisiológico y bioquímico de la embriogénesis somática.....	37
1.8.6 Aspectos moleculares: expresión genética .....	38
1.8.7 El explante .....	39
1.8.8 Desinfección superficial del explante.....	40
1.9 Medios de cultivo .....	41
1.9.1 Componentes del medio de cultivo .....	42
1.9.2 Fuente de energía en el medio de cultivo.....	48
1.9.3 Factores físicos que intervienen en el cultivo de tejidos .....	49
1.9.4 Investigaciones de Embriogénesis somática en cacao.....	50
CAPITULO II: MARCO METODOLÓGICO.....	53
2.1 Método, tipo y diseño .....	53
2.1.1 Método, tipo y diseño de la investigación. ....	53
2.2 Descripción del área de estudio .....	53
2.3 Universo, población y muestra.....	53
2.3.1 Universo .....	53
2.3.2 Población .....	53

2.3.3 Muestra .....	54
2.4 Recolección de datos .....	54
2.4.1 Ensayo preliminar.....	54
2.4.2 Fase de campo.....	54
2.4.2.1 Colección del material vegetal.....	54
2.4.3 Fase de laboratorio .....	55
2.4.3.1 Medios de cultivo.....	55
2.4.3.2 Preparación del medio de cultivo .....	56
2.4.3.3 Esterilización del material vegetativo en el laboratorio.....	59
2.4.3.4 Disección y siembra del material vegetativo en el laboratorio.....	60
2.4.4 Diseño Experimental.....	61
2.4.4.1 Variables evaluadas.....	64
2.5 Procesamiento y tabulación de datos .....	64
2.5.1. Formación de callo en explantes.....	65
2.5.2. Coloración de callo en el explante .....	65
2.5.3. Textura del callo .....	65
2.5.4. Formación de estructuras globulares pro-embriogénicas.....	66
CAPITULO III: RESULTADOS Y DISCUSION.....	67
3.1. Formación de callo en explante de pétalo y estaminodio en acepciones de <i>Theobroma cacao</i> L.....	67
3.2. Coloración del callo en explantes de pétalo y estaminodio de <i>Theobroma cacao</i> L.....	69
3.3. Textura del callo en explante de pétalo y estaminodio de <i>Theobroma cacao</i> L.....	72
3.4 Formación de estructuras globulares en callos provenientes de explantes pétalos y estaminodio de <i>Theobroma cacao</i> L.....	77

CAPITULO IV: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....	80
4.1 CONCLUSIONES.....	80
4.2 RECOMENDACIONES .....	81
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	82
LITERATURA CONSULTADA.....	85
ANEXOS.....	87

## INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Medios de cultivo según los días transcurridos.....	56
Tabla 2: Composición para medio de cultivo PCG (Primary Callus Growth Medium).....	57
Tabla 3: Composición para medio de cultivo SCG (Secondary Callus Growth Medium)	58
Tabla 4: Composición para medio de cultivo ED (Embryo Development Medium).....	59
Tabla 5: Diseño experimental.....	63
Tabla 6: Matriz de congruencia de datos generales de explantes que formaron callo....	67
Tabla 7: Matriz de congruencia de datos generales de los colores que explantes de pétalos y presentaron los estaminodio de <i>Theobroma cacao</i> L.....	70
Tabla 8: Matriz de congruencia de datos generales de textura que presentaron los explantes de pétalos y estaminodio de <i>Theobroma de cacao</i> L.....	75

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ilustración de las ubicaciones de los diferentes tipos genéticos de distribución de cacao ( <i>Theobroma cacao</i> L.) fuente extraída de: Monroy et al. (2016) .....	27
Figura 2. Porcentaje de explantes de pétalos y estaminodios de <i>Theobroma cacao</i> L. 20 días después de la siembra en medio de cultivo PCG con el protocolo de Guiltinan y Maximova diseñado en el año 2010 (Modificado). .....	68
Figura 3: Coloración de callos de explantes de pétalos y estaminodios de <i>Theobroma cacao</i> L. 34 días después de la siembra en medio del cultivo PCG con el protocolo de Guiltinan y Maximova diseñado en el año 2010 (Modificado) .....	70
Figura 4. Tipos de texturas en callos de explantes de <i>Theobroma cacao</i> L. a: explante de estaminodio con textura compacta. b: explante de pétalo con textura friable o suave c: explante de pétalo con textura friable-compacta o mixta, D) Textura friable, E) Textura compacta. Fotografías tomadas a 4X (panorámico) con cámara electrónica adaptada a microscopio óptico Leica. ....	73
Figura 5. Textura friable en explante color blanco de <i>Theobroma cacao</i> L. Observado a 40X en microscopio óptico Leica. a) Teñido con safranina al 1%, b) sin tinción, se observa que las células son hialinas y ovoides sobrepuesta una sobre otra como especie de dedos. ....	73
Figura 6. Textura friable en explante color café de <i>Theobroma cacao</i> L. Observado a 40X en microscopio óptico Leica. a) Sin tinción, b) teñido con safranina al 1%, se observa que estas células tienen una cantidad alta de polifenoles que les da el color característico café destacando que la forma de las células es más poligonales y uniformes. ....	74
Figura 7. Explante con textura compacta color blanco, teñido con safranina al 1%, donde se observan irregulares de la pared celular alrededor del corte. Observado a 40X en microscopio óptico Leica. ....	74
Figura 8. Textura de callos de explantes de pétalos y estaminodios de <i>Theobroma cacao</i> L. 34 días después de la siembra en medio de cultivo PCG con el protocolo de Guiltinan y Maximova diseñado en el año 2010 (Modificado). ....	75

Figura 9 .Crecimiento de explantes de pétalo y estaminodio para el genotipo TSH539, en ensayo preliminar a: formación de callo en explante de estaminodio finalizando medio de cultivo PCG. b, c: formación de callo en explante de pétalo finalizando medio de cultivo PCG. d: crecimiento de callo en explante de estaminodio finalizando medio de cultivo SCG. e, f: crecimiento de callo en explantes de pétalo finalizando medio de cultivo SCG. g: iniciación de maduración de callo para formación de embrión en estado globular en explante de estaminodio. h, i: iniciación de maduración de callos para formación de embriones en estado globular en explantes de pétalos. (Explantes de *Theobroma cacao* L.) Fotografías tomadas con cámara electrónica adaptada a microscopio óptico Leica. Observada a 4X (panorámico)..... 78

Figura 10. Etapa final en subcultivo en medio ED de *Theobroma cacao* L.  
 A) Explante de estaminodio de TSH539, B) Explante de pétalo de TSH539, C, E) Explante de estaminodio de CCN51, D) Explante de pétalo de CCN51, F) Explante de estaminodio de ICS95. Fotografías tomadas con cámara electrónica adaptada a microscopio óptico Leica. Observada a 4X (panorámico), NINGUNO DE LOS GENOTIPOS DESARROLLO EMBRIONES SOMATICOS..... 79

## RESUMEN

La investigación se realizó en el laboratorio de CENSALUD (Centro de Investigación y Desarrollo en Salud) con el objetivo de evaluar el potencial de regeneración de diferentes genotipos de cacao (*Theobroma cacao* L.) vía embriogénesis somática, *in vitro* a partir de pétalos y estaminodios provenientes de botones florales de seis árboles seleccionados (TSH539, IMC67, CCN51, ICS95, AMELONADO Y CACERES) del banco de germoplasma de la Facultad de Agronomía. Todos los explantes fueron evaluados a una misma concentración en los diferentes medios, con el protocolo de PENNSTATE (INTEGRATED SYSTEM FOR VEGETATIVE PROPAGATION OF CACAO, Project directors: Dr. Mark Guiltinan and Dr. Siela Maxinova, versión 2.1 noviembre 17, 2010)

Para obtener buenos resultados de sobrevivencia en la fase de siembra en estudio, se realizaron ensayos de desinfección superficial de los explantes con materiales recolectados directamente para prueba, previos a la investigación.

Con los ensayos realizados previos a la investigación, se procedió a desarrollar todo el protocolo establecido, dando como resultados en el primer medio de cultivo (PCG) *in vitro* de *Theobroma cacao* L., los genotipos que presentaron respuesta a formación de callo: TSH539 con el 100% y 90% para pétalo y estaminodio respectivamente, CCN51: Con el 100% y 60% para pétalo y estaminodio respectivamente, ICS95: con el 10% exclusivamente para explante de estaminodio, los genotipos restantes no presentaron ninguna respuesta.

En la fase de cultivo en medio SCG *in vitro* de *Theobroma cacao* L., se presentaron resultados diferentes de los cuales los más significativos fueron: la coloración más abundante en los explantes fue blanca para estaminodio y coloración café oscuro para explantes de pétalo, las texturas más abundantes en los explantes de pétalo fueron mixtas (friable-compacta) y textura friable para estaminodio. En la fase de cultivo en medio (ED) y subcultivos empleados, No se obtuvo embriones somáticos en ningún explantes, pétalo y estaminodio

Los resultados muestran que el genotipo de cada uno de los árboles de cacao seleccionados de *Theobroma cacao* L. evaluados durante el desarrollo de la investigación difieren en su

respuesta ante el mismo tipo de explante y mismas concentraciones en medio de cultivo. Siendo los genotipos TSH539, CCN51 Y ICS95 los únicos que presentaron respuesta en la formación de callo durante el proceso de la embriogénesis somática.

## INTRODUCCIÓN

Actualmente, el cultivo de cacao (*Theobroma cacao L.*) ha experimentado un crecimiento; impulsado por la creciente demanda en países emergentes, la industria de productos intermedios y fábricas de chocolate que invierten en su expansión, el consumo en Europa y Norteamérica de productos Gourmet-Premium de origen que se consolida y el aumento en la sensibilización sobre los beneficios para la salud de consumir productos basados en cacao. Estos factores, generan en El Salvador la posibilidad de hacer una apuesta por el cacao como alternativa a la crisis que viene padeciendo el sector cafetalero.

Esto implica tener parcelas productivas con materiales genéticos de cacao seleccionados y contar con tecnologías apropiadas para su propagación clonal, garantizando al productor materiales de buena calidad y homogeneidad en la misma. De ahí, que una estrategia biotecnológica tal como el “cultivo *in vitro*” puede lograrse y obtener buenos resultados en la producción de este grano.

El cacao, es una especie de importancia económica, ya que presenta una serie de ventajas como, la calidad de su fruto, desarrollo y cosecha; posee diversos usos por sus propiedades, cada industria hace uso de esta según su utilidad que este les brinda a los de las industrias interesadas en la producción de cacao: industrias productoras de jugo de cacao para obtener jaleas y mermeladas, productoras de manteca de cacao, farmacéutica, industria cosmética, chocolatera entre otras.

El término genérico de cultivo de tejido vegetales o cultivo “*in vitro*” involucra a diferentes técnicas de cultivo de material vegetal diverso como células, órganos y plantas completas, mediante esta técnica es posible obtener plantas libres de patógenos, esto debido al medio nutritivo aséptico y con condiciones ambientales controladas, es una técnica muy utilizada en los cultivos de importancia económica.

Con los procesos de cultivo avanzados, la agricultura se va modernizando y pretende incluir de forma eficiente las técnicas biotecnológicas para aumentar la producción y que la producción de semilla de diferentes genotipos se vuelva competitiva en el mercado.

Al utilizar la herramienta de cultivo de tejidos vegetales en cacao con genotipos salvadoreños, se pretende que los productores de este material obtengan altos rendimientos en la cosecha y los resultados en producción sean altos y de una buena calidad para el comprador tanto nacional como extranjero

Por lo que en el trabajo evaluó potencial de regeneración de diferentes genotipos salvadoreños de cacao (*Theobroma cacao* L.) vía embriogénesis somática para que al momento de desarrollar el cultivo de tejidos vegetales de esta planta se ocupen las mejores estrategias y métodos para cada genotipo. Por lo que se hace necesario que los genotipos estudiados se induzcan a callo primario para medir el potencial de regeneración y si el genotipo forma o no embriones somáticos; con el fin de ver si es viable el cultivo en dichas condiciones tanto de medio de cultivo y tipo de explante.

## CAPÍTULO I: MARCO TEÓRICO

### 1.1 Características biológicas y morfológicas del cacao.

Según Batista (2009), Linneo, en el año 1737, clasificó el cacao como *Theobroma cacao*. Luego, Benthán y Hooker, en 1862, dieron una clasificación definitiva como especie de la familia Sterculiaceae, la cual actualmente pertenece al orden de las Malvales. Las diferentes especies del género *Theobroma* han tenido varias clasificaciones botánicas derivadas de las dificultades encontradas con el abundante polimorfismo y tipos intermedios como resultado del cruzamiento dirigido entre formas definidas, buscando fijar tipos de mayor aprovechamiento económico.

Monroy et al., (2016), mencionan que del género *Theobroma*, se encuentran unas 25 especies, de las cuales se pueden mencionar algunas de las más importantes: (*Theobroma cacao* L.), *T.guianesis*, *T.Bernoulli*, *T.capillifera*, *T.cirmolinae*, *T.microcarpa*, *T.obovata*, *T.bicolor*, *T.spruceana*, *T. angustifolium*.

Hay varios factores que hacen diferente a los cacaos en todo el mundo según Monroy et al., (2016), el cacao es una especie diploide, con 20 cromosomas en cada una de sus células somáticas ( $2n= 20$ ) debido a esto es que desarrollan una amplia variabilidad genética para la mayoría de los caracteres, especialmente para el tamaño, forma y color de los frutos, semillas, resistencia a plagas, vigor y tamaño de los aboles. Apoyándose para esta variabilidad, según (Bartley B, 2005), en su obra de la diversidad genética del cacao, establece que el rango de variabilidad se exhibe en términos de formas y colores, llega a ser inmenso en la medida que se exploran nuevas poblaciones, sin embargo, información acerca de la expresión de la variación de varios órganos de la planta, acumulada durante varios años de observación ha permitido medir la variabilidad de los caracteres en los diferentes genotipos.

Según Monroy et al., (2016), menciona que los descriptores en general son características morfológicas que se manifiestan más o menos establemente bajo diferentes condiciones del medio ambiente. Esto significa que una característica

morfológica para ser considerada como descriptor, no debe ser afectada en su expresión, por las diferentes condiciones medio ambientales, o así son afectadas, estas variantes deben ser mínimas; en cuanto así ocurra serán descriptores consistentes que permitan una adecuada caracterización morfológica.

Con la información del párrafo anterior según (Monroy et al., 2016), no se pretende hacer una revisión de los descriptores para cacao, pero si resaltar los que son más pertinentes a la hora de definir la característica genética de un material en una finca, o apoyar a los técnicos en la mejora de sus conocimientos en diferenciar los principales fenotipos de los grupos de cacao.

Según Monroy et al., (2016), para el cacao toman como descriptores relevantes a seis categorías las cuales son las siguientes: Generalidad de la planta, Características de las hojas, Características de los brotes, Características de la flor, Características del fruto, Características de la semilla.

Batista (2009), dice que, el árbol del cacao normalmente alcanza una altura entre 6 a 8 metros, con excepción del cacao Nacional del Ecuador y del Amelonado de África Occidental, los que en ocasiones alcanzan alturas hasta unos 12 metros. La altura del árbol depende de factores ambientales que influyen en el crecimiento. Cultivado con alta luminosidad el tamaño es más reducido que con exceso de sombra

### **1.1.1 Partes morfológicas**

#### **1.1.1.1 la raíz**

La raíz es un órgano que poseen las plantas para sostén y para absorber nutrientes, según (Batista ,2009), en plantas reproducidas por semillas el sistema radicular está compuesto por una raíz principal denominada raíz pivotante o raíz primaria, la cual crece hacia abajo de forma recta.

Conforme a Batista (2009), dice que, a partir de la raíz pivotante, inmediatamente debajo del cuello, se desarrollan la mayoría de las raíces secundarias a unos 15 a 20 cm de profundidad en la porción superior de la capa de humus. Éstas se

extienden en forma horizontal a 5 y 6 metros del tronco del árbol, con raíces laterales que se dividen repetidamente. Las raíces secundarias que se encuentran en la parte inferior de la raíz pivotante tienen un crecimiento hacia abajo en dirección a la roca madre o hacia la capa freática.

De acuerdo con Batista (2009), las plantas que son reproducidas por medios vegetativos o asexuales no desarrollan raíz pivotante, pero sí raíces primarias y secundarias, de crecimiento horizontal.

Con arreglo a Batista (2009), la forma y desarrollo de las raíces del cacao dependen principalmente de la textura, estructura y consistencia del suelo, así como del modo de reproducción. En suelos profundos bien aireados su crecimiento puede alcanzar hasta 2 metros de profundidad; en suelos pedregosos su crecimiento es tortuoso. Cuando el suelo es de una estructura granular uniforme y de textura arcillosa, la raíz crece erecta o derecha.

#### **1.1.1.2 Tallo y ramas**

El tallo y las ramas componen el sistema mecánico de las plantas (Batista ,2009), menciona que: las ramas del árbol de cacao, al igual que las de otras especies del género *Theobroma*, son dismórficas:

- Unas son de crecimiento vertical hacia arriba, denominadas ramas de crecimiento ortotrópico, y constituyen el tallo y/o los chupones
- Otras son de crecimiento oblicuo hacia fuera, denominadas ramas de crecimiento plagiotrópico.

De acuerdo con lo que dice Dosert et al., (2011), las ramas son café y finamente vellosas. Las hojas son coriáceas (o cartáceas) simples, enteras (o ligera e irregularmente sinuadas), angostamente ovadas a obovado-elípticas, ligeramente asimétricas, 17—48(—60) cm de largo y 7—10(—14) cm de ancho, alternas y glabras o laxamente pubescentes en ambas caras.

#### **1.1.1.2.1 Brotes jóvenes**

Según Monroy et al., (2016), los brotes jóvenes, son fáciles de conocer ya que su color difiere del resto de las hojas, pudiendo tener gradaciones de verde o de violeta.

Los brotes son características fenotípicas que se pueden visualizar a simple vista. A juzgar por Monroy et al., (2016), el color de las hojas jóvenes varía de acuerdo con la cantidad de pigmentos de antocianina, la cual difiere en los distintos tipos de cacao. Se refiere a la presencia en las hojas de un color violeta o rojizo con distintas variaciones e intensas. La presencia de antocianina es característica de materiales forasteros y híbridos trinitarios. La ausencia de antocianina por el contrario de materiales criollos.

La pubescencia en brotes terminales es una característica también importante en la morfología del cacao. De acuerdo con lo que dice (Monroy et al., 2016), la vellosoidad es una característica ausente en materiales forastero, casi ausente en híbridos trinitarios (dependerá del grado de herencia criolla), y muy acentuada en materiales criollos.

#### **1.1.1.3 Hojas**

Este órgano esencial de la planta que se encargada de captar energía solar entre otras funciones, según (Batista ,2009), argumenta que las hojas están unidas al tronco o a las ramas por medio a los pecíolos, siendo los del tronco más largos que los de las ramas. Las hojas tienen, tanto en la base como en la parte superior, una estructura abultada constituida por un tejido parenquimatoso, cargado de gránulos de almidón, denominada pulvino que, a consecuencia de estímulos de los rayos de luz solar, orientan las hojas mediante movimientos de rotación, buscando posición en relación con sus necesidades de luz.

Conforme a Batista (2009), el tamaño de las hojas es variable; lo cual depende de caracteres genéticos y de su posición en el árbol. Las hojas de la periferia que están muy expuestas a la luz solar son más pequeñas que las que están ubicadas en el

interior del árbol. Las hojas adultas del cacao Criollo son más grandes que las del cacao Forastero.

Según Dosert et al., (2011), La base de las hojas es redondeada a ligeramente cordada, ápice largamente apiculado. El pecíolo es de 14—27 mm de largo. Las estípulas son lineares y caducas.

Monroy et al., (2016), menciona que : las hojas jóvenes del cacaotero presentan pigmentaciones que dependen en cierta forma de los tipos cultivados y cuyos colores van desde violeta a verde pálido, son pendulares y de consistencia flácida, presentan en su base dos estípulas que se desprenden rápidamente con la madurez las hojas se tornan verdes oscuras, de consistencia coriácea (como el cuero) y toman una posición sub-horizontal, son oblongo elípticas, con un promedio de 25 cm de largo por 7 cm de ancho, son enteras penninervias y su área depende principalmente de la cantidad de luz que se reciba.

Monroy et al., (2016), menciona que: el tamaño de las hojas es variable; lo cual depende de caracteres genéticos y de su posición en el árbol. Las hojas de la periferia que están muy expuestas a la luz solar son más pequeñas que las que están ubicadas en el interior del árbol. Las hojas adultas del cacao criollo son más grandes que las del cacao forastero.

De acuerdo con Monroy et al., (2016), con la edad, las hojas del cocotero dejan de ser flexibles, tornándose quebradizas. La vida activa de la hoja es aproximadamente de cuatro meses, al que le sigue un periodo de senectud, con un promedio de vida de un año, que depende en buena manera de las condiciones de humedad del medio y de la cantidad de luz que recibe, siendo más percederas aquellas que están más expuestas al sol.

#### **1.1.1.4 Inflorescencia**

Según Dosert et al., (2011), las inflorescencias son caulinares y cimosas. Las flores son pentámeras, hermafroditas, actinomorfas, y (5-)10- 20 mm de diámetro; el

pedúnculo floral es de 1-3 cm de largo. Los sépalos son (verdosos) blancos o rosa clara, 5-8 mm de largo, 1.5-2 mm de ancho, angostamente lanceoladas, persistentes y fusionados en la base. Los pétalos son un poco más largos que los sépalos, 6-9 mm de largo, libres, amarillentos, con dos (tres) nervios violetas adentro, glabros, con la parte inferior redondeada o abruptamente atenuada, recurvos y apiculados. Los estambres son 10 y lineares; cinco estambres fértiles se alternan con cinco estaminodios; todos los estambres están fusionados en la base formando un tubo; los estambres fértiles son de 2,5-3 mm de largo y están dispuestos frente a los pétalos; los estaminodios son violeta y 6.5-7.5 mm de largo. El ovario es de 2-3 mm de largo, anguloso ovado, ligeramente pentagonal y pentámero. Los óvulos se disponen en dos filas con 6-12(-16) óvulos por fila.

Enríquez (1985), cit. Por Monroy et al., (2016), normalmente hay una producción de flores luego de las primeras lluvias, después de un periodo seco; esto hace que en algunos lugares haya producción de mazorcas en épocas bien marcadas o definidas. En otros lugares, donde no hay periodos de sequía y lluvia bien marcados, la floración es casi permanente y más bien se nota una influencia del número de horas sol. La floración seguramente se aumenta por el estímulo durante la época de mayor luminosidad. El número de flores por cojín varía de acuerdo con el material genético, y a la época de observación. Parece ser esta una característica genética bien definida.

Esta peculiaridad de la disposición de las flores sobre las ramas, Según (Batista, 2009), desde el punto de vista botánico, la inflorescencia del cacao es una cima dicasiforme, la cual se forma directamente en la madera más vieja del tronco y de las ramas adultas del árbol y, de manera muy específica, en la base de una hoja, alrededor de la cicatriz y de la yema axilar que queda al caer la hoja. La inflorescencia, en su proceso de formación y crecimiento, se transforma en una masa densa que conforme se desarrolla forma un cojín que agrupa entre 40 a 60 flores. Existe una marcada diferencia en el número de flores presentes en diferentes cojines de diferentes árboles, lo cual obedece a caracteres genéticos

Batista (2009), menciona que: la flor del cacao es hermafrodita, pentámera, de ovario súpero, cuya fórmula floral es: S5, P5, E5+5, + G (5). Esto indica que la flor del cacao está constituida en su estructura floral por 5 sépalos, 5 pétalos; el androceo conformado por 10 filamentos de los cuales 5 son fértiles (estambres) y los otros 5 son infértiles (estaminodios); el gineceo (pistilo) está formado por un ovario súpero con 5 lóculos fusionados desde la base donde cada uno puede contener de 5 a 15 óvulos, dependiendo del genotipo.

Según Monroy et al., (2016), la flor presenta en la base del pedúnculo una constricción por la cual provoca su absorción al no ser fecundada durante sus tres primeros días de vida. Los granos de polen son esferoides pegajosos, de 16 a 23 micras, con un periodo de vida corta, bajo condiciones naturales no superan las 48 horas.

Según Monroy et al., (2016), el ciclo de floración está directamente correlacionado con la humedad del suelo y con la carga de frutos formados; su aparición está condicionada al periodo de lluvias, disminuyendo en los periodos de sequía y cuando la carga de frutos por árbol es abundante. Las lluvias condicionan la cosecha a uno o dos periodos anuales, dependiendo de su distribución. Así mismo, existen diferencias entre los tipos de cacao: los criollos florecen menos que los forasteros a lo largo del año. Las inflorescencias se desarrollan sobre los cojinetes, que pueden albergar muchas flores activas al mismo tiempo.

#### **1.1.1.4.1 Biología floral**

Con arreglo a Dosert et al., (2011), Las primeras flores aparecen en el tallo de las plantas de cacao uno o dos años después de que el tallo se ha lignificado. Las flores forman inflorescencias que se originan a partir de botones axilares de las hojas caducas. Las plantas adultas de cacao pueden, dependiendo de las condiciones climáticas, producir flores y frutos durante todo el año, cuando no se presentan periodos secos extremos u oscilaciones térmicas muy pronunciadas. Normalmente, las plantas muestran uno o dos periodos de mayor fructificación. El cacao produce una gran cantidad de flores, de las que sólo un 0.5—5% son polinizadas y producen frutos.

Casi el 60 % de las flores cae después de 48 h sin ser fertilizadas. La apertura de los botones se produce generalmente en la tarde y la antesis finaliza a la mañana siguiente. El cacao tiene polinización cruzada (xenogénico) y posee un complejo sistema de autoincompatibilidad. En cultivo, sin embargo, las plantas pueden a veces ser auto compatibles.

#### **1.1.1.5 El fruto**

Batista (2009), explica que: el fruto del cacao es el resultado de la maduración del ovario de la flor fecundada. En esta descripción es apropiado indicar que hay frutos que nunca maduran por falta de semillas y abortan; son llamados frutos partenocarpio.

De acuerdo con Batista (2009), argumentan que dentro de su clasificación botánica el fruto de cacao es una drupa normalmente conocida como mazorca. Tanto el tamaño como la forma de los frutos varían ampliamente dependiendo de sus características genéticas, el medio ambiente donde crece y se desarrolla el árbol, así como el manejo en la plantación. Las mazorcas de cacao por sus formas están clasificadas como: Amelonado, Calabacillo, Angoleta y Cundeamor, variando según el tipo o la especie.

Según Monroy et al., (2016), la mazorca o fruto del cacaotero, es una drupa o baya indehiscente (fruto carnoso en el que la parte más interna del pericarpio de vuelve dura, rodeando y protegiendo a la semilla, hueso o pireno; no se abren en la maduración para que salgan las semillas) desde el punto de vista botánico , el cual se desprende del árbol cuando madura, en su interior guarda un conjunto de semillas cubiertas por una sustancia mucilaginosa de sabor agridulce, conformada por azúcares ácido cítrico en proporciones variables.

##### **1.1.1.5.1 La semilla**

Parte que se forma en la fecundación de los gametos, para dejar descendencia fértil, Según Batista (2009), el fruto del cacao puede contener entre 20 a 60 semillas o almendras, cuyo tamaño y forma varían según el tipo genético. La semilla del cacao es

más bien un óvulo del interior del ovario de la flor fecundado y desarrollado, que luego de su desarrollo y maduración constituye la mazorca.

Tal como menciona Batista (2009), la semilla del cacao no necesita un período de reposo para su germinación, que puede ocurrir inmediatamente el fruto alcanza su madurez y el mucílago que la cubre desaparece. Éste tiene sustancias inhibidoras, por lo que no se puede almacenar fresco ni ser sometido a temperaturas extremas que provocarían la muerte del embrión por fermentación o deshidratación. En condiciones óptimas, las semillas inician la germinación en 4 días.

## **1.2 Sub-especies y cacao domesticado.**

Cuatrecasas (1964), menciona que, sugirió el origen simultáneo del cacao por separado en el sur y América Central, una hipótesis apoyada por la mayoría de los autores posteriores (Cope, 1976; Wood and Lass, 1985; Gómez - Pompa y otros, 1990; Laurent et al, 1994; Whitkus et al, 1998). También proponen que el cacao de América del Norte y del Sur. Las poblaciones se desarrollaron en dos formas, separadas por el istmo de Panamá, y que esto se puede atribuir a la gran diversidad morfológica observada en A. Central, así como como en América del Sur. Estas poblaciones evolucionaron independientemente y son reconocidas como subespecies separadas (*T. cacao* ssp. *cacao* y *T. cacao* ssp. *sphaerocarpum*).

Además, Cuatrecasas (1964), planteó la hipótesis de que las plantas silvestres de la selva tropical lacandona México posiblemente sea ancestro del cacao domesticado. Estas subespecies que fueron propuestas por Cuatrecasas corresponden a los dos grupos morfo geográficos a conocer Criollo, que corresponde a *T. cacao* ssp. *cacao*, y Forastero, que corresponde a *T. cacao* ssp. *Sphaerocarpum*.

Cheesman (1944), cit. Por Bhattacharjee, (2018), propuso un tercer grupo híbrido se llamaba trinitario, Procedentes de cruces entre Criollo y Forastero. El grupo Forastero está compuesto de poblaciones muy diversas con diferentes orígenes geográficos como el Alto Amazonas, Bajo Amazonas, Orinoco y las Guayanas y pueden

identificarse de acuerdo con la cápsula. La morfología, por ejemplo, del tipo amelonado.

### 1.3 Clasificación taxonómica

Según Bhattacharjee, (2018), clasifica taxonómicamente el árbol de cacao (*Theobroma cacao* L.) de la siguiente forma:

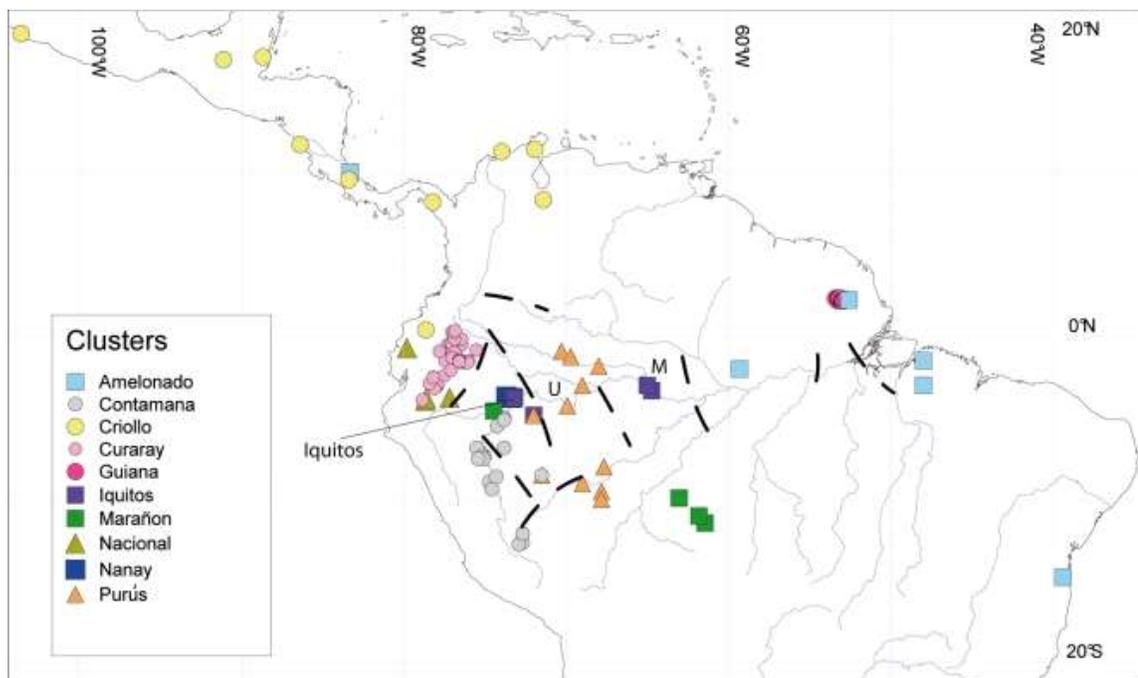
- Nombre científico preferido: *Theobroma cacao* L.
- Nombre común preferido: cacao
- Otros nombres científicos: *Theobroma pentagonum*, Bernoulli; *Theobroma sativum* (Aubl.)
- Dominio: eukaryota
- Reino: Plantae
- Sub-dominio: traqueobionta (plantas vasculares)
- Superdivisión: Spermatophyta (plantas de semilla)
- División: Magnoliophyta (plantas con flores)
- Phylum: Spermatophyta
- Subfilo: Angiospermas
- Clase: Magnoliopsida (Dicotiledóneas)
- Sub-clase: Dilleniidae
- Orden: Malvales
- Familia: Malvaceae / Sterculiaceae
- Género: *Theobroma*
- Especie: *Theobroma cacao* L.

### 1.4 Grupos genéticos

Para Motamayor et al., (2008), cit. por Monroy et al. (2016), son los estudios utilizando marcadores moleculares los que han definido un nuevo sistema de clasificación del germoplasma de cacao. Mediante el estudio de las relaciones genéticas de accesiones de cacao silvestre y cultivado, utilizando los datos de pasaporte (la

información disponible sobre el origen de una accesión) y marcadores moleculares, 1241 individuos fueron analizados de diferentes orígenes geográficos con 106 marcadores de microsatélites.

Los resultados de este trabajo generaron 10 grandes “clusters”, o grupos: Marañón, Curaray, Criollo, Iquitos, Nanay, Contamana, Amelonado, Purus, Nacional y la Guayana (los nombres corresponden a los orígenes geográficos de las accesiones analizadas). Esta nueva clasificación refleja con mayor precisión la diversidad genética disponible en cacao, en lugar de la clasificación tradicional como criollo, forastero o trinitario. (Tal como muestra la figura 1)



**Figura 1.** Ilustración de las ubicaciones de los diferentes tipos genéticos de distribución de cacao

(*Theobroma cacao* L.) fuente extraída de: Monroy et al. (2016)

## 1.5 Distribución, suelo y condiciones climáticas

### 1.5.1 Distribución mundial

Para Dosert et al., (2011), El área de distribución natural de (*Theobroma cacao* L.) se extiende desde la región de la cuenca del Amazonas y las Guyanas hasta el sur de

México (10, 43). Después de la llegada de los europeos a América, el cultivo del cacao se ha expandido al Caribe, Asia y África y es hoy día pantropical, principalmente cultivado entre 10°N y 10°S (1, 7, 17, 21, 28, 30, 31). Los productores más importantes son Costa de Marfil, Ghana e Indonesia.

### **1.5.2 Suelo**

Dosert et al., (2011), menciona que: El cacao puede ser cultivado en diferentes tipos de suelo. Generalmente necesita suelos profundos, livianos y ricos en nutrientes. El perfil de suelo debe alcanzar una profundidad de 1-1.5) m, para que la raíz pivotante y todo el sistema radicular pueda formarse bien. Además, las plantas de cacao no toleran el anegamiento ni la sequedad. Los suelos no deben, por lo tanto, contener capas impermeables, pero tienen que poseer una buena capacidad de almacenamiento de agua. Las inundaciones son toleradas por las plantas sólo hasta un cierto punto. Los suelos permeables arcillo-arenosos son ideales, con 50% arena, 30-40% arcilla, 1-2 % limo y una proporción relativamente alta de materia orgánica (> 3.5%). Los suelos arenosos cercanos a la costa no son tolerados. Las plantas de cacao toleran un pH del suelo de 5.0-7.5 (óptimo 6.5-7.5), lo que significa que toleran suelos ligeramente ácidos a ligeramente alcalinos. En suelos muy ricos en nutrientes pueden tolerar también valores de pH más bajos. Valores de suelo y nutrientes ideales son una relación C: N de >9 y una relación N: P de 1.5. Esenciales para un buen crecimiento son, además, una disponibilidad de fósforo de 8 ppm y una concentración suficiente de micronutrientes como calcio (8 ppm), potasio (0.24 ppm) y magnesio (2 ppm).

### **1.5.3 Condiciones climáticas**

De acuerdo con Gómez (2010), la temperatura, así como sus fluctuaciones estacionales o diarias, afecta a los procesos fisiológicos más importantes de las plantas y, particularmente, en el cacao ejerce un efecto sobre el ritmo de los brotes foliares, superficie foliar total, crecimiento secundario y floración.

Braudeau (1970), cit. Por Gómez (2010), cuando los cambios de temperatura son bajos la humedad relativa incrementa y hay mayor incidencia de enfermedades como la *Phytophthora palmivora*, y se producen caída de las hojas, así como problemas en la floración. La formación de flores tiene su óptimo alrededor de los 27º C, pero temperaturas constantes de 31º C durante el día y la noche impiden la floración. El efecto de las bajas temperaturas se refleja en la tasa de crecimiento vegetativo, en el desarrollo de los frutos y en la intensidad de la floración. El crecimiento y la producción del cacao están determinados no sólo por la abundancia de las precipitaciones, sino también por su distribución durante el año.

## **1.6 Cultivo**

Dosert et al., (2011), dice que: el cacao puede ser cultivado tanto como monocultivo, así como en plantaciones forestales y en cultivos frutales intercalados. Tradicionalmente, el cacao se cultiva a la sombra de bosques raleados o en remanentes de bosque y se mantiene más o menos la estructura natural del bosque. La composición botánica de los árboles de sombra es, por lo tanto, compleja y diferente en cada región. Cultivos intercalados se practican, por ejemplo, en coco, caucho, nueces de areca, canela y plantaciones frutales de todo el mundo. También se practica el cultivo en combinación con especies arbóreas madereras y con leguminosas arbóreas. En parte, se utilizan en estas modalidades de cultivo más de tres especies de plantas en un mismo cultivo. Se asume hoy en día que el cultivo intercalado y el manejo forestal, más allá de la función de sombreado, disminuye la aparición de enfermedades del cacao, mantiene la fertilidad natural del sistema de producción, compensa los periodos secos y fomenta el mantenimiento de la biodiversidad.

Según Dosert et al., (2011), el cultivo de cacao en monocultivos, es decir, cultivos intensivos sin sombreado, se realiza especialmente en África occidental sobre bosques talados o terrenos de barbecho. La instalación de las plantaciones se efectúa normalmente con sombreado temporal con, por ejemplo, matas de plátano o

leguminosas diversas (por ejemplo, *Gliricidia sepium*, *Inga spp.*, *Albizia spp.*). Si bien el cacao es un árbol tolerante a la sombra y se cultiva tradicionalmente bajo árboles de sombra, algunos estudios muestran que un sombreado muy intenso (árboles de sombra y autosombreado) no sólo disminuye el rendimiento, sino que también favorece la aparición de enfermedades.

### **1.6.1 Propagación regenerativa**

Tal como menciona Dosert et al., (2011), La forma más fácil y económica de propagar el cacao es por medio de semillas (15, 52). Semillas maduras tienen, sin embargo, sólo un corto periodo viable y no se deben secar. Una desventaja de la propagación por semillas es la predominancia de la polinización cruzada y la resultante variabilidad de la progenie. Algunos cultivares (Amelonado y algunas formas de Criollo) son, sin embargo, auto compatibles y pueden ser propagados con identidad varietal a través de semillas (27). Las semillas se sacan del fruto carnoso, por lo general, inmediatamente después de la cosecha y se siembran en viveros sombreados. Las semillas pueden también ser sembradas directamente en la plantación, en cuyo caso deben ser protegidas con mallas plásticas alrededor. La siembra en vivero se realiza en sustratos de siembra de turba y perlita, o en humus. La siembra se realiza con el hilum de las semillas hacia abajo, en una profundidad de 10-20 mms.

Dosert et al., (2011), Las macetas de siembra deben ser de al menos 5 x 5 x 12 cm. También se puede sembrar en bolsas plásticas (20 x 12 cm con hoyos). La germinación ocurre generalmente en pocos días, dependiendo de la temperatura. La tasa de germinación de semillas frescas es de 90%. Una disponibilidad de agua suficiente, sombra y protección del viento son importantes para el crecimiento de las plántulas. Además, las plantas son sensibles a la sobre fertilización. El primer trasplante se realiza normalmente cuando las plántulas han alcanzado un tamaño de 0.6 m. Las plantas juveniles pueden mantenerse en vivero hasta por 12 meses en macetas de

tamaño adecuado, antes de ser llevadas a la plantación; sin embargo, la plantación toma lugar, generalmente, 4-5 meses después de la siembra.

### **1.6.2 Propagación vegetativa**

Siguiendo a Dosert et al., (2011), el cacao puede ser propagado con identidad varietal, de manera vegetativa, vía injerta, sobre un patrón apropiado, esquejes, acodos o también mediante cultivo de tejidos.

## **1.7 Métodos de multiplicación**

Según Vera, (1993), cit. Por Castillo Herrera, (2004), El cacao como en todo individuo superior, es imposible fijar indefinidamente sus caracteres genéticos cuantitativos por medio de la reproducción sexual, por la dificultad en repetir la combinación de gametos que originaron el genotipo del individuo. Por lo tanto, la propagación vegetativa que permite la formación de clones es el único método capaz de perennizar genotipos superiores, siendo los métodos más conocidos, los injertos, las ramillas y los acodos.

### **1.7.1 Injertos**

A Proporción de Dosert et al., (2011), Especialmente importante es la propagación por injertos en patrones adecuados: en injertos de yema se extrae cuidadosamente una yema con un trozo de corteza (> 2.5 x 0.5 cm), normalmente de un chupón (eje vertical) y se coloca en otra planta. Para evitar la pérdida de humedad, la yema se fija a la planta con rafia y cinta de injerto y el lugar del injerto se sella con cera de injerto. Como patrón se usan normalmente plántulas de 60-90 días de edad. Después de cerca de 3 semanas, cuando el ,‘ojo‘‘se ha injertado completamente, se remueve la cinta con la cera y se poda completamente la parte antigua del patrón por arriba injerto.

Según Vera (1987) y Gildardo y Palencia (2000), cit. Por Castillo Herrera, (2004), El injerto es la unión orgánica de los tejidos jóvenes de dos plantas en donde de tal forma, que continúen su desarrollo como una sola; una de ellas es la yema que origina ramas, hojas y frutos, es decir el sistema productivo de la planta y el patrón se constituye en el sistema radical. El cambium de la yema debe quedar en contacto íntimo del cambium del patrón, dando como resultado un árbol con caracteres morfológicos, genéticos y fisiológicos de ambos.

Tal como menciona Vera (1993), cit. Por Castillo Herrera, (2004), dice que generalmente el patrón transmite resistencia a enfermedades, características de vigor, adaptación a las condiciones del suelo que el injerto mantiene características de calidad y producción de frutos.

Según Flores (1987), cit. Por Castillo Herrera, (2004), la multiplicación de injertos sobre portainjertos de 15 días a 4 meses de edad cultivados en viveros permite obtener las plantas con buena raíz vertical pero su fenotipo fuertemente plagiotrópico obliga a realizar podas de formación continuas, además con esta metodología, se obtienen bajos porcentajes de prendimiento de las yemas injertadas, debido a una mala unión entre la yema y el patrón o malas condiciones ambientales.

### **1.7.2 Estacas o ramillas**

Siguiendo a Evans (1951), cit. Por Castillo Herrera, (2004), recomienda utilizar brotes con yemas maduras que aun conserven el color verde, y que el recorte de hojas de las estacas es para facilitar la entrada de luz para las hojas inferiores debido a que se necesita de 10 a 15% de hojas para poder cumplir con la fotosíntesis.

Según Gildardo y Palencia (2000) y Compañía Nacional de Chocolates (1983), cit. Por Castillo Herrera, (2004), dice que este método consiste en seleccionar un pedazo de rama, ubicada preferiblemente en el penúltimo crecimiento es decir la zona de tejidos en formación, caracterizada por su estado semi-leñoso y con coloración café en su parte superior y verde en la inferior, las cuales son sometidas a un tratamiento especial para su enraizamiento.

Siguiendo lo que dice Vera (1993), cit. Por Castillo Herrera, (2004), las estacas son sembradas en fundas plásticas llenas de tierra y núcleo de aserrín, debiendo utilizar ramas jóvenes que serán tratadas con funguicidas para evitar infecciones y con hormonas para estimular el crecimiento de raíces, así como mantener una alta humedad relativa. La desventaja de este método.

Según Wood (1982), cit. Por Castillo Herrera, (2004), dice que existe una serie de factores que pueden afectar el proceso de enraizamiento, siendo las más importantes; el tipo de cacao, manejo del vivero, edad de las estacas, empleo de hormonas, temperatura, luz y humedad medio de enraizamiento entre otros.

### **1.7.3 Acodos**

De acuerdo con Vera (1993), cit. Por Castillo Herrera, (2004), este método emplea ramas adultas, a las que se corta un anillo de corteza sobre la que se deposita cualquier hormona que estimule la emisión de raíces. La herida es cubierta con material enraizante sujeto por plástico perforado, y una vez enraizada se separa de la planta y se siembra en fundas llenas de tierra.

### **1.7.4 Propagación “*in vitro*” de cacao**

Según Dublín (1984), cit. Por Castillo Herrera, (2004), la reproducción vegetativa “*in vitro*” de cacao tiene ciertas ventajas tales como: coeficiente elevado de multiplicación, mejor enraizamiento, una posibilidad de reversión de la plagiotrópica en ortotrópica.

### **1.8 Propagación “*in vitro*”**

Orchard *et al* (1979), cit. Por Castillo Herrera, (2004), realizaron estudios de cultivo *in vitro* de brotes apicales de cacao para propagación vegetativa, sin obtener plantas debido a que estos resultaron inactivos.

### **1.8.1 Generalidades del cultivo “*in vitro*”**

Según Mejía y Vittorelli (1988), cit. por Ángel & Gonzáles (2013), argumenta que existen dos clases de crecimiento en cultivo *In vitro*: a) organizado: se denomina así cuando se utilizan puntos de crecimiento (meristemas apicales) de tallos y raíces, yemas florales, pequeños frutos, nudos y cultivo de embriones. Estos explantes cuando son cultivadas *in vitro* continúan creciendo con su estructura. Y se denomina b) desorganizado: cuando segmentos de tejidos son cultivados *in vitro* estos carecen de estructuras diferenciadas. El tejido desorganizado puede incrementarse en volumen por sucesivos sub-cultivos y mantenerse en medio de cultivo por periodos largos. Cultivo de callos (células agregadas), cultivo de suspensión de células (medio líquido agitado), cultivo de protoplastos (células sin pared celular) y cultivo de anteras y de polen (para obtener plantas haploides) son considerados de crecimiento desorganizado como un paso intermedio para la regeneración de plántulas.

### **1.8.2 Embriogénesis somática**

Según Aguilar (2002), cit. Por Castillo Herrera, (2004), dice que por embriogénesis somática se entiende el proceso por el cual las células somáticas son capaces de desarrollar plantas a partir de diferentes estados morfológicos característicos del estado embriogénico.

Según Gómez (1998), cit. Por Castillo Herrera, (2004), dice que la embriogénesis somática es la formación de un embrión a partir de una célula somática, sin la necesidad de la fusión de gametos, el mismo que atraviesa por todos los estados morfológicos característicos del estado embriogénico, la expresión temporal y espacial de los genes es fuertemente regulada, permitiendo así la diferenciación de varios sistemas de órganos, hasta lograr su total desarrollo a planta.

### **1.8.3 Embriogénesis directa e indirecta**

Para Tisserat y Col, citados por Gómez (1998), cit. Por Castillo Herrera, (2004), indican que los tratamientos para la obtención de la embriogénesis somática dependen si el tejido del ex plante está formado o consiste en células somáticas determinadas pre-embriogénicamente (**CsDPE**) o células somáticas no embriogénicas (**CsNE**)

Para Williams y Mashewaren, citados por Gómez (1998), cit. Por Castillo Herrera, (2004), la “**embriogénesis somática directa**”, se realiza a partir de las células somáticas determinadas pre embriogénicamente y logra la formación de embriones somático, al provocar un estímulo de la división celular a estructuras organizadas como; embriones cigóticos completos, o segmentos de estos y/o tallos,

Según este mismo autor, la “**embriogénesis somática indirecta**” se realiza a partir de células somáticas no embriogénicas, las células del tejido deben sufrir varias divisiones mitóticas en la presencia de una auxina dando lugar a un callo, esta fase de calogénesis se interpone entre el ex plante original y la aparición de embriones somáticos. Existen 2 tipos de embriogénesis somática indirecta:

- 1- Embriones de baja frecuencia, en la cual el número de callos con embriones es mayor, aunque se forman pocos embriones por callo, los cuales aparecen aislados o en pequeños grupos, con desarrollo globular, corazón, torpedo y maduro.
- 2- Embriogénesis de alta frecuencia en la que los embriones no se desarrollan completamente manteniéndose en estado globular, agrupados en un número mucho mayor, aunque estos grupos aparecen en un número menos de callos.

### **1.8.4 Fases de la embriogénesis somática.**

Según las observaciones realizadas por Fujimura y Komane, citados por Gómez (1998), y las realizadas por Pliego y Barceló (2001), cit. Por Castillo Herrera, (2004), existen 4 fases según observaciones de detalles morfológicos realizadas en una especie dicotiledónea (*D. carota*).

**Fase 0. Establecimiento** la célula aislada forma masas de células pro-embriogénicas (callo), por continuas divisiones celulares las cuales se realizan en las regiones más superficiales, mientras que en las células centrales alternamente vacuolizadas entran en fase de senescencia. En presencia de auxinas y una baja concentración de nitrógeno, los grupos de células meristemáticas con citoplasma muy denso se desprenden de la capa superficial de las masas pro-embriogénicas y continúan proliferando activamente. En el proceso de división activa, los grupos de células hijas permanecen dentro de la pared de la célula madre, con paredes celulares muy delgadas y entre estas existen numerosos plasmodesmos.

**Fase 1. Proliferación:** en esta fase, al transferir los explantes a un medio sin auxinas hay una aceleración del crecimiento debido a la división activa de los agregados que contienen células con citoplasmas muy denso, estos se separan de células vacuolizadas, se continúan dividiendo dando lugar a embriones somáticos los cuales se individualizan al alcanzar el estado globular; sin embargo si los niveles de fitohormonas se eliminan o bajan demasiado se produce el desarrollo y maduración de los embriones. Unas especies requieren pocos días de estímulos con auxina mientras que otras necesitan ausencia de esta para lograr una auto-embriónia.

**Fase 2. Maduración.** Este es el periodo de desarrollo del embrión en estado globular, caracterizada por divisiones celulares muy rápidas en ciertas partes del agregado, producto de la polarización de la síntesis de ADN, lo cual da lugar al embrión y su suspensor en la zona que no ocurrió división, en esta fase se expande la célula y almacena sustancias de reserva, siendo fundamental la presencia de Nitrógeno en suplementos como nitratos, amonio, aminoácidos y caseína hidrolizada, así como carbohidratos (sacarosa 3-6%) y bajas concentraciones de oxígeno en el medio de cultivo. Una correcta acumulación de reservas y correspondiente incremento en el peso seco del embrión somático puede indicar una alta cantidad de vigor, lo cual influye positivamente en su posterior germinación.

**Fase 3. Germinación** Es el desarrollo continuo del embrión el estado de corazón – torpedo y su conversión a plántula, para lo cual es necesario la acumulación de

abundantes sustancias de reserva durante la maduración del embrión, puesto estas declinan sustancialmente a partir del primer día en condiciones de inhibición o bien antes de la elongación de la raíz, en referencia a un embrión cigótico es posiblemente el resultado de la falta de tejido nutritivo que rodea a la semillas, lo cual explica por qué a veces las plantas de embriones somáticos son más pequeñas y débiles que las de semillas. También es importante en la germinación la adición de citocininas en el medio de cultivo, las cuales contrarrestan el efecto provocado por las auxinas durante la inducción y proliferación.

### **1.8.5 Aspecto fisiológico y bioquímico de la embriogénesis somática.**

Para Pliego Y Barceló (2001), cit. Por Castillo Herrera, (2004), el genotipo, el ex plante y el medio de cultivo, juegan un papel fundamental en el proceso de cultivo “in vitro” ya que al trabajar con especies recalcitrantes se utilizan partes de embriones inmaduros, debido a que están formados por células poco diferenciadas con alto potencial morfogénico debido a su procedencia que son tejidos jóvenes, se debe utilizar células somáticas de partes de tejidos de nucela, inflorescencias inmaduras o secciones de hojas jóvenes.

Según Kamada y Harada citados por Pliego y Barceló (2001), cit. Por Castillo Herrera, (2004), mencionan que en la primera fase de embriogénesis somática se utiliza una alta concentración de auxina o auxina + citoquinina, para estimular la división celular e inducir a las células con potencial embriogénico. La presencia del ion amonio es importante en la formación de embriones multicelulares, a partir de células embriogénicas ya determinadas.

Para Raghavan, citado por Pliego y Barceló (2001), cit. Por Castillo Herrera, (2004), dice que en la segunda fase es necesaria la ausencia de auxina para lograr maduración de embriones. Un medio sin auxina presenta un incremento en las síntesis de ARNm, y éstos en presencia de auxina serán los responsables de la síntesis de proteínas en los primeros estadios de la embriogénesis, mientras que los ARNms sintetizados en ausencia de auxina juegan su papel en estadios posteriores del

desarrollo del embrión. Durante los estadios globulares y corazón se observa un incremento marcado de las síntesis de lípidos, los embriones globulares poseen cadenas largas de ácidos grasos. Por otra parte, se ha observado que embriones somáticos en estado cotiledonar tiene menos lípidos y proteínas y más almidón que los cigóticos en el mismo estado.

#### **1.8.6 Aspectos moleculares: expresión genética**

De acuerdo con, Dure y Goldberg, citados por Pliego y Barceló (2001), cit. Por Castillo Herrera, (2004), durante el desarrollo del embrión cigótico, la serie de genes expresados se clasifican en los siguientes grupos:

- Genes que se encuentran en toda la planta y se expresan constitutivamente con funciones relacionadas al desarrollo.
- Genes específicos del embrión, los cuales cesan antes o en el momento de la germinación.
- Genes expresados en los estadios tempranos de la embriogénesis hasta el estado cotiledonar.
- Genes que codifican proteínas específicas de semillas, expresados en la fase de expansión de los cotiledones y maduración de semilla.
- Genes que se expresan en los últimos estadios de la embriogénesis, hasta el inicio de la germinación.

Para Barceló y Pliego (2001), cit. Por Castillo Herrera, (2004), en la embriogénesis somática existen genes del grupo dos y tres que se expresan en los primeros estadios del desarrollo del embrión; sin embargo, estudios detallados para comparar la expresión temporal de los genes en embriogénesis somática y cigótica, en la primera, la expresión ocurre en los estadios de desarrollo más temprano, formación de masas pro embriogénicas y estado globular, mientras que en los cigóticos fundamentalmente se expresan en el estado cotiledonar.

Por lo que no parece adecuado utilizar el modelo de expresión temporal de los genes durante la embriogénesis somática para su clasificación. De otra manera, utilizando técnicas de localización *in situ* de mRNAs, se ha demostrado que los modelos de distribución espacial de genes que codifican proteínas de reserva son similares en embriones somáticos y cigóticos por tanto parece que la especificidad celular en la expresión de los distintos genes se retiene durante la embriogénesis somática.

### 1.8.7 El explante

Mojica (2012), manifiesta que el concepto de explante se refiere a cualquier parte vegetal que ha sido separada de la planta, que puede ser un tejido (fragmentos de hojas, tallos, raíces, pétalos, etc.). Con excepción de los óvulos y el polen, los explantes están constituidos por tejidos y/o células somáticas. Cuando se extrae un explante de la planta se debe tener en cuenta el tamaño, la fuente, la edad fisiológica del mismo.

Levitus et al., (2012), menciona que la posibilidad de contaminación con microorganismos. De ser posible, se deben cultivar explantes de plantas donantes que crecen en condiciones de invernadero, con ello se reduce sustancialmente las tasas de contaminación. Por otra parte, es recomendable evitar el uso de «explantes sucios» (raíces, rizomas) que provienen de plantas crecidas en macetas o en el campo, dado que en la mayoría de los casos no es posible conseguir una buena desinfección de estos.

- ✓ **Edad fisiológica.** Este es un aspecto de gran influencia en la morfogénesis. Como regla general se puede decir que cuando más joven e indiferenciado se encuentre el explante a cultivar, mejor será su respuesta *in vitro*. Es por ello que los meristemas apicales y axilares son ampliamente usados en numerosas especies. En el caso de la micropropagación de plantas leñosas, la edad del explante es un factor crítico. Si los tejidos son jóvenes, la micropropagación tiene mayores posibilidades de ser exitosa que con tejidos maduros. Este hecho

genera la necesidad de realizar tratamientos de rejuvenecimiento de las plantas donantes de explantes.

- ✓ **Tamaño.** En general, cuanto más grande sea el explante mayores serán las posibilidades de inducir la proliferación de callos o la regeneración directa de órganos. Sin embargo, a mayor tamaño de explante también son mayores las probabilidades de que los cultivos se contaminen con microorganismos. También es necesario tener en cuenta que existe un tamaño mínimo del explante, que depende de la especie y del material vegetal, por debajo del cual no es fácil lograr el establecimiento de los cultivos. Los explantes muy pequeños suelen requerir del empleo de medios más complejos o de los denominados medios acondicionados.
- ✓ **Época del año.** Es un factor que suelen tener mucha importancia en la micropropagación y que generalmente está asociado al grado de dormición que presentan ciertos explantes (yemas, por ejemplo) y también con la posibilidad de mayor o menor proliferación de microorganismos.

Ovando (s. a.), menciona que el concepto de explante se refiere a cualquier parte vegetal que ha sido separada de la planta, que puede ser un tejido (fragmentos de hojas, tallos, raíces, pétalos, etc.), un órgano (semillas, anteras, ovarios, botones florales, hojas y raíces completas, etc.), estructuras como las anteras y los ovarios, o bien células individuales (como en el caso de los protoplastos<sup>3</sup>). Con excepción de los óvulos y el polen, los explantes están constituidos por tejidos y/o células somáticas.

#### **1.8.8 Desinfección superficial del explante**

La concentración más liviana de desinfectante que sea efectiva contra la contaminación de determinado explante es la más adecuada, si es más diluida que esta, no se eliminarán los microorganismos y si es más concentrada se dañará el explante. Para facilitar la limpieza del explante es importante considerar que los brotes

nuevos sean más limpios que los viejos, materiales que crecen en el invernadero son más limpios que los viejos, materiales que crecen en el invernadero son más limpios que los que se encuentran en el campo, y entre más pequeño sea el explante a introducir al cultivo *in vitro* menor será la contaminación y eliminar. Otra recomendación que se ha formulado es el uso de antioxidantes si se observa coloración café en el explante durante el proceso de desinfección (Abdelnour, *et al.*, 1994, cit por Martínez, 2014).

Esquivel y Escalant, 1994, cit por López (2013), manifiesta que en el procedimiento de desinfección superficial del explante debe eliminarse los microorganismos, pero a la vez debe causar el menor daño posible al explante. Varios compuestos se han recomendado y entre los más usados están el hipoclorito de sodio (cloro comercial del dos al cinco por ciento) y de (del seis al doce por ciento) que se recomienda como menos toxico y el etanol (70%).

También se ha recomendado la adición de un detergente (dos a cuatro gotas de Tween-20) para romper la tensión superficial y permitir que el explante este en mejor contacto con el químico. El uso de antibióticos se recomienda como última alternativa para limpiar los explantes (Esquivel y Escalant, 1994, cit por López, 2013).

### **1.9 Medios de cultivo**

Cruz (2012), Manifiesta que el medio de cultivo es definido como una formación de sales inorgánicas y compuestos orgánicos requeridos para la nutrición y manipulación de los cultivos *in vitro*. Existen numerosas formulaciones, cada una de las cuales comprenden entre seis y 40 compuestos. Existen en reporte cerca de dos mil medios de cultivo, de los cuales los más usados son 16, además de considerar que algunos de ellos presentan particularidades en la inducción de una vía específica en la morfogénesis vegetal. El medio de cultivo es una solución acuosa que está formada por compuestos inorgánicos, compuestos orgánicos, complejos naturales y agentes de soporte y gelificación.

### 1.9.1 Componentes del medio de cultivo

Básicamente, los medios de cultivos se componen de compuestos que suministran: nutrientes minerales, vitaminas, sustancias reguladoras del crecimiento, una fuente de carbono, Agente gelificante (en caso de medios semisólidos) (Mroginski, et al., 2010, cit por Angel & Gonzales, 2013).

Según Cruz (2012), los medios de cultivos se encuentran constituidos por los siguientes componentes:

#### ❖ Sales inorgánicas

- ✓ Macronutrientes: los tejidos en cultivo requieren de una fuente continua de compuestos inorgánicos; además de carbono, hidrogeno y oxígeno. Los elementos más utilizados son principalmente N, P, K, Ca, Mg, y S.
- ✓ El nitrógeno se adiciona en grandes cantidades y se encuentra en el medio en forma de iones de amonio, o la combinación de ambos iones.
- ✓ El (P) fosforo se puede adicionar en cualquier de las formas  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  o  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ .
- ✓ El (K) potasio se encuentra en grandes cantidades en la naturaleza, es un catión que se agrega en forma de  $\text{KCl}$ ,  $\text{KNO}_3$ , o  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ .
- ✓ El (Ca) calcio se adiciona con  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  o  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  o en la forma anhidra de cualquier sal. El magnesio y el azufre satisfacen sus requerimientos con  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ .
- ✓ El (Na) sodio no es requerido en grandes cantidades por las plantas superiores: sin embargo, puede ser un elemento esencial para cultivos de hálotas y plantas  $\text{C}_4$ .
- ✓ El (Cl) cloro está presente en forma de  $\text{KCl}$  o  $\text{CaCl}_2$ .
- ✓ Micronutrientes: para una adecuada actividad metabólica, las células vegetales requieren de micronutrientes, los más esenciales son Fe, Mn, Zn, B, Cu, Co y

Mo. Los últimos cinco elementos son fundamentales para la síntesis de clorofila y la función de cloroplastos.

- ✓ El Fe (Hierro) es requerido para la formación de precursores de la clorofila.
- ✓ El Mn (Manganeso) es necesario para el mantenimiento de la ultraestructura y el proceso fotosintético (la actividad del fotosistema II es proporcional al contenido de este catión)
- ✓ El Cu (cobre) y Zn (zinc) son requeridos para la oxidación e hidroxilación de compuestos fenólicos.
- ✓ El Mo (Molibdeno) y Fe forman parte de las enzimas nitrato-reductasa y nitrogenasa.
- ✓ El boro es necesario para el mantenimiento de la actividad meristemática, está involucrado en la síntesis de bases nitrogenadas, en particular de uracilo.
- ✓ Agentes quelatos: son compuestos cuyas moléculas son capaces de detener un ion de un metal con varias uniones químicas formando un anillo complejo (quelato EDTA Acido etilendinitrotetracetato) en bajas concentraciones estimulan el crecimiento haciendo que el hierro esté disponible en bajas concentraciones.

Las concentraciones tradicionales se expresaban en mg. L<sup>-1</sup>, es preferente en mM, meq. L<sup>-1</sup> y μmol. L<sup>-1</sup>.

#### ❖ **Vitaminas**

Son necesarias para llevar a cabo una serie de reacciones catalíticas del metabolismo y son requeridas en pequeñas cantidades. Las más empleadas son las siguientes:

- Tiamina (Vit. B1): se añade como tiamina-HCl. Es considerada como la única, imprescindible o esencial para el crecimiento de las células vegetales.
- Ácido nicotínico (niacina)

- Piridoxina (Vit. B6): se añade como Piridoxina-HCl. Mio-inositol: no es propiamente una vitamina, es un azúcar-alcohol que tiene un efecto estimulante sobre la morfogénesis, participando quizá en la vía biosintética del ácido galacturónico.
- Ácido pantoténico: ayuda al crecimiento de ciertos tejidos.

#### ❖ **Hormonas de desarrollo vegetal**

Los reguladores del crecimiento hormonas no son nutrientes, sino, son los encargados de generar una respuesta en el explante, ya sea producción de brotes, inducción a callogénesis, organogénesis y embriogénesis somática. Estos son productos que se encuentran naturalmente en las plantas, aunque en su interior, estos no son generados en cantidades suficientes, por ello, es necesario la adición de auxinas, citoquininas, giberelinas, etileno y muchas otras sustancias que son empleadas como reguladores de crecimiento (Castillo A., 2004, cit por Orquera, 2013).

Existen tres grupos principales:

- **Auxinas:**

Vinculadas al alargamiento celular, inducción de callo, neoformación de meristemas radicales (AIA, AIB, 2,4D y ANA).

Existen varios tipos de auxinas, algunas son naturales y otras sintéticas, se conocen el ácido indolacético (AIA), ácido naftalacético (ANA), ácido indol butírico (AIB), 2,4,-D y 2,4,5-T. El ácido indol-3- acético o AIA es la más conocida, es una hormona natural que se produce en los ápices de los tallos, meristemas y hojas jóvenes de yemas terminales, de allí migra al resto de la planta en forma basipétala (de arriba para abajo) mediante un mecanismo activo, exhibiendo fuerte polaridad durante el transporte a través de las células del floema y del parénquima presente en el xilema; durante su circulación, la auxina reprime el desarrollo de brotes axilares laterales a lo largo del tallo, manteniendo de esta forma la dominancia apical. El movimiento de la auxina fuera de la lámina foliar hacia la base del pecíolo parece también prevenir la abscisión (Rojas, *et al.*, 2004).

Una característica sorprendente de la auxina es la fuerte polaridad exhibida en su transporte a través de la planta. La auxina es transportada por medio de un mecanismo dependiente de energía, alejándose en forma basipétala desde el punto apical de la planta hacia su base. Este flujo de auxina reprime el desarrollo de brotes axilares laterales a lo largo del tallo, manteniendo de esta forma la dominancia apical. El movimiento de la auxina fuera de la lámina foliar hacia la base del pecíolo parece también prevenir la abscisión (Aguayo *et al.*, 2006, cit por Swett, 2013).

Efectos de las auxinas en las plantas, aumentan la plasticidad de la pared celular. Participan en las reacciones mediante las cuales se depositan nuevas moléculas de celulosa dentro de las paredes. Operan como agentes catalíticos o reguladores en el metabolismo de los hidratos de carbono (Aguayo *et al.*, 2006, cit por Swett, 2013).

Se atribuye a las auxinas un efecto inhibitorio de los ápices vegetativos terminales (extremos superiores en crecimiento) sobre los brotes laterales. Antes se creía que este efecto inhibitorio se debía a un desvío de sustancias nutritivas desde los ápices vegetativos laterales a los terminales. Si se corta este último y se aplican vestigios de esa sustancia al extremo cortado, las yemas laterales permanecen latentes, como si no se hubiese cortado el extremo terminal (Melgar, R. 2006, cit por Swett, 2013).

- **Citocininas:**

Promueven la división celular, la organización, la diferenciación de callos y estimulan la proliferación. Las hormonas más utilizadas son BA, Kin, 2ip, Zeatina, Thidiazurón.

De acuerdo con, Rojas, M. 1987, cit por Swett, (2013), manifiesta que las citoquininas son derivados de la adenina, poseen la propiedad específica de provocar el crecimiento de cultivos de tejidos en forma de callosidad, y en algunas plantas si se hacen flotar secciones o discos de hojas sobre soluciones de citoquininas en la oscuridad, estas retrasan la pérdida de clorofila de la hoja.

Los efectos de la citoquinina sobre las plantas son las siguientes: Inducción de partenocarpio en algunos frutos, activación de la división celular en algunos microorganismos, formación de yemas en hojas separadas de la planta y en algunos musgos, estimulación de la formación de tubérculo en la papa, inducción de iniciación del crecimiento en los tallos y ramas, rompimiento del letargo de las yemas y semillas en muchas especies (Rojas, M. 1987, cit por Swett, 2013).

Para Rojas *et al.*, (2004), mencionan que se encuentran en forma natural y sintética, las más conocidas son: zeatina, kinetina y benzilaminopurina (BAP). Son producidas en las zonas de crecimiento, como los meristemos, en la punta de las raíces (zonas próximas del ápice) y son transportadas vía acropétala (de abajo hacia arriba), moviéndose a través de la savia en los vasos correspondientes al xilema desde el ápice de la raíz hasta el tallo o brote, estimulando la división celular en tejidos no meristemáticos.

Las citoquininas paradójicamente son inhibidoras de la rizogénesis a fuertes dosis; sin embargo, su presencia es positiva porque actúan en interacción con las auxinas en el papel que ellas ejercen sobre la dediferenciación y sobre la división celular. Así pues, es importante realizar un justo equilibrio auxinas/citoquininas >1. Este equilibrio existe naturalmente en la mayor parte de los vegetales. Es igualmente importante su efecto de romper la latencia en yemas axilares (Rojas, *et al.*, 2004).

- **Giberelinas:**

Promueven el alargamiento celular, además de utilizar ácido abscísico, poliaminas, entre otros. Las giberelinas son importantes en el cultivo de tejidos ya que presentan un espectro de actividad biológica muy variado, con un papel regulatorio principal en el crecimiento, ya que este puede producir una elongación extraordinaria del tallo en enanos genéticos (Hurtado y Merino, 1994, cit por Cisne, *et al.*, s. a.).

Las giberelinas son sustancias activas, estimulantes, presentes principalmente en las semillas, los tubérculos y las raíces. Estimulan la germinación de las semillas, acelerando la aparición de las plántulas en las primeras etapas de desarrollo. En las

plantas adultas, las giberelinas provocan el aumento inusual de la superficie foliar y de la altura de las plantas. Aplicadas en concentraciones bajas, pueden ayudar a obtener plantas mutantes, enormes (Ramírez *et al.*, 2005, cit por Swett, 2013).

Otro efecto interesante es que provocan el florecimiento, sobre todo en las plantas bienales. Por la pulverización de las plantas con soluciones que contienen cantidades minúsculas de giberelinas se induce un crecimiento intensivo de la parte aérea de las plantas. Se encuentran naturalmente en las plantas y existen varios tipos, siendo las más comunes: GA1, GA3, GA4, GA7, GA9. Las giberelinas son sintetizadas en los primordios apicales de las hojas, en las puntas de las raíces y en semillas en desarrollo (Rojas, *et al.*, 2004).

No muestra el mismo transporte fuertemente polarizado como el observado para la auxina, aunque en algunas especies existe un movimiento basipétalo en el tallo. Además de ser encontradas en el floema, las giberelinas también han sido aisladas de exudados del xilema, lo que sugiere un movimiento bidireccional de la molécula en la planta (Rojas, *et al.*, 2004).

Su principal función es incrementar la tasa de división celular (mitosis) estimulando la división y elongación celular, lo que influye en el incremento del crecimiento en los tallos, interrumpen el período de latencia de las semillas, haciéndolas germinar y movilizando las reservas en azúcares, inducen la brotación de yemas, estimulan la síntesis de ARN mensajero y promueven la floración y el desarrollo de los frutos (Rojas, *et al.*, 2004).

En la mayoría de los cultivos, los niveles de AG<sub>3</sub> superiores a 1.0 mg/l son tóxicos por lo que es recomendable utilizarlo en bajas concentraciones (Van Braga y Pierik, 1971, cit por Cisne, *et al.*, s. a.).

#### ✓ **Aminoácidos**

Son una fuente adicional e inmediata de nitrógeno, su asimilación puede ser más rápida que el nitrógeno inorgánico aportado el medio, pueden actuar como

agentes quelantes. La L-glutamina y la L-asparagina son transportadores de nitrógeno, L-arginina estimula las raíces y L-cisteína es un agente reductor.

✓ **Carbohidratos**

Son utilizados como fuente de energía y osmo-reguladores. La sacarosa es el azúcar empleado universalmente, la siguen en importancia la glucosa, fructosa, maltosa, ramosa, galactosa, manosa, lactosa. La concentración a la que se emplea la sacarosa es de 20 a 45 g.l-1.

✓ **Agua**

El agua para preparar medios de cultivo deberá ser destilada, bidestilada, tridestilada, desionizada o desminarizada, el agua potable contiene sales en solución que pueden modificar la respuesta de los tejidos en cultivo.

✓ **Agentes gelificantes o solidificantes**

Se emplean en el caso de medios semisólidos, se ha utilizado el agar como un sistema de “soporte” para la preparación de medios sólidos o semisólidos. Las ventajas que representa el agar es que con el agua forma geles que se derriten a 100 °C, se solidifican a 45 °C, por lo que es estable a las temperaturas de incubación, además no es alterado por enzimas vegetales, ni reacciona con los constituyentes del medio y no interfiere con la movilización de los componentes del medio de cultivo.

✓ **Otros compuestos**

Muchos compuestos o suplementos no definidos de composición química variable como albumen de coco, endospermo de maíz, extracto de levadura, jugos y extractos de frutas (plátano, tomate, papaya), caseína hidrolizada (como fuente proteínica), antioxidantes (ácido ascórbico, cítrico) y adsorbentes como el carbón activado.

### **1.9.2 Fuente de energía en el medio de cultivo**

Originalmente las plantas pueden producir azúcar como fuente de energía a través de la fotosíntesis, sin embargo, las vitroplantas casi no realizan fotosíntesis

debido a la baja intensidad de luz en la que se desarrollan, y aunque lo hagan, producen muy poca azúcar como fuente de energía al medio nutritivo (Usui *et al.*, 1996, cit por Rumaldo, 2016).

La sacarosa, en concentraciones del 2 al 4 % (p/v), constituye la fuente de carbono más utilizada en los medios de cultivo ya que es sintetizada, transportada y metabolizada de manera natural en las plantas. Además de la sacarosa otros azúcares como la glucosa, maltosa, fructosa y sorbitol se han utilizado en el cultivo *in vitro* sin embargo éstas suelen funcionar solo para determinadas especies (Pierik, 1990, cit por Márquez, 2013).

### **1.9.3 Factores físicos que intervienen en el cultivo de tejidos**

Aun cuando muchos factores pueden influir en la Micropropagación los factores físicos juegan un papel determinante; la luz y la temperatura han sido los factores físicos más extensivamente estudiados. La temperatura de incubación para la propagación de la mayoría de las familias entre 24 y 28 °C (Chee *et al.*, 1982, cit por Villalobos & Thorpe, s. a.).

De acuerdo con, Martínez (2014), menciona que la humedad, en condiciones *in vitro* la humedad dentro de los recipientes es cercana al 100% por lo que la planta *in vitro* no desarrolla un adecuado sistema de regulación hídrica.

Según, Rey (2012), la cantidad de luz que incide sobre las superficies fotosintéticas de las plantas determinara en gran medida la capacidad fotosintética las necesidades de luz de los cultivos *in vitro* son inferiores a las de la planta *in vivo*, dado que el medio de cultivo contiene cantidades importantes de sacarosa, los cultivos *in vitro* se comportan solo parcialmente de forma autotrófica. La irradiación en cultivo *in vitro* es de un 10% o incluso menos del valor de plena insolación.

Martínez (2014), manifiesta que el pH, la acidez o alcalinidad del medio de cultivo es importante y diferente para cada tipo de planta, por lo que se hace necesario

ajustarlo a los requerimientos de cada especie, sin embargo, el pH adecuado para las plantas generalmente oscila entre 4.5 a 7.0.

#### **1.9.4 Investigaciones de Embriogénesis somática en cacao.**

Esan (1977), cit. Por Castillo Herrera, (2004), reporta por primera vez la obtención de embriones somáticos en cacao, a partir de embriones cigóticos inmaduros, aunque sin lograr el desarrollo a plántula.

Según Pence *et al* (1980), cit. Por Castillo Herrera, (2004), también obtuvieron embriones somáticos a partir de embriones sexuales inmaduros, cultivados en medio basal MS por Murashige & skoog, completando con ANA (ácido 1- naftalen acético) y agua de coco, obteniendo embriones somáticos, los cuales fueron transferidos de un medio sólido a líquido desarrollando raíces, pero sin completar el desarrollo normal a plántulas.

Litz (1986), cit. Por Castillo Herrera, (2004), desarrolló un método de embriogénesis somática a partir de tejidos no sexuales tales como hojas, logrando obtener callos, de estos se obtuvieron embriones que llegaron a estado globular, pero sin terminar su desarrollo.

Resultados de, Charlet y Dufour (19899), cit. Por Castillo Herrera, (2004), estudiaron varios tipos de ex plantas obteniendo mejores resultados a partir de embriones cigóticos inmaduros, pero con problemas aún en la fase de multiplicación e instalación de micro-plántulas, poniendo en evidencia la influencia del ambiente del cultivo como aspecto vital del proceso.

Sin embargo, de estos resultados, Alemanno *et al.* (1996), cit. Por Castillo Herrera, (2004), señalan que la aplicación de este protocolo bajo condiciones de los países productores de cacao y con genotipos diferentes ha resultado difícil, por lo que se considera de vital importancia desarrollar investigaciones para su perfeccionamiento.

Según los resultados de Alemano *et al.* (1996), cit. Por Castillo Herrera, (2004), en la embriogénesis primaria las células meristemáticas de los explantes iniciales (bases de pétalos y estaminodios), cambian su competencia para seguir la vía de la expresión embriogénica, ocurriendo múltiples divisiones celulares, misma que se aíslan en grupos de células embrionarias de las otras células circuncidantes, los cuales debido a su evolución subsiguiente pueden ser considerados como jóvenes embriones somáticos globulares, los cuales pasan por los estadios de corazón y torpedo llegando a embrión maduro con desarrollo de cotiledón con carencia de material significativo de almacenamiento (reservas de almidón).

Guiltilian *et al.* (1997), cit. Por Castillo Herrera, (2004), determinaron que el uso de la citoquinina Thidiazuron (TDZ) y la auxina 2,4-D (2,4 diclorofenoxiacético), añadida a los medios de inducción y mantenimiento en diferentes concentraciones originó una alta frecuencia de producción de embriones somáticos y regeneración de plántulas. En un ejemplo señala que el explante floral (estaminodio) produjo arriba de 140 embriones somáticos con un promedio de 46 al final de la embriogénesis primaria, posteriormente en la embriogénesis secundaria alcanza un potencial teórico de 7.000 embriones a partir de un solo estaminodio.

Según Alemanno *et al.* (1997), cit. Por Castillo Herrera, (2004), señala que en la embriogénesis secundaria los explantes de cotiledones están compuestos por células epidermales, parenquimatosas y procambiales, las células epidermales y embriogénicas se dividen y luego dan origen a embriones.

Para Li *et al.* (1998), cit. Por Castillo Herrera, (2004), relatan avances substanciales utilizando Thidiazuron en la metodología de embriogénesis a partir de estaminodios por medio del cual fueron evaluados 19 genotipos, los cuales respondieron al protocolo con una tasa de inducción embriogénica que vario de 0.8 a 100% de los explantes inoculados.

Según Alemano *et al.* (2001), cit. Por Castillo Herrera, (2004), reportaron una notable diferencia en el número de embriones producidos por el explante en cada

sistema, produciéndose embriones secundarios en proporciones más altas promedio de 70 por cotiledón y los embriones primarios un promedio de 17 por estaminodio, igualmente los embriones secundarios producidos de un origen unicelular presentan mayor conformidad de embriones normales (aproximadamente el 85%), respecto a los embriones primarios (aproximadamente 18%).

De acuerdo con López *et al.* (2002), cit. Por Castillo Herrera, (2004), dicen que, dada la variabilidad genotípica en respuesta a la multiplicación de cacao vía embriogénesis somática, actualmente las investigaciones se orientan a la adopción de esta técnica hacia clones seleccionados, a la producción de embriones en medio líquidos, mantenimiento del potencial embriogénico a lo largo plazo y a la evaluación de la conformidad de las plantas regeneradas por esta vía.

## CAPITULO II: MARCO METODOLÓGICO

### 2.1 Método, tipo y diseño

#### 2.1.1 Método, tipo y diseño de la investigación.

La investigación se fundamentó con un enfoque mixto. Esto porque se evaluaron variables a nivel cualitativo: coloración de callo y textura de callo; y variables a nivel cuantitativo: número de explantes con formación de callo y número de embriones somáticos formados. De igual manera fue experimental por que se indujo la formación de callo embriogénico por medio de la siembra de un explante floral en un medio de cultivo específico.

### 2.2 Descripción del área de estudio

El estudio se realizó en la Universidad de El Salvador Fn. Av. Martíres Estudiantes del 30 de Julio San Salvador, El Salvador. C.A. específicamente en el banco de germoplasma de *Theobroma cacao*, perteneciente a la Facultad de Ciencias Agronómicas.

### 2.3 Universo, población y muestra

#### 2.3.1 Universo

Plantación de árboles de cacao (*Theobroma cacao* L.) del banco de germoplasma de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de El Salvador.

#### 2.3.2 Población

Accesiones de cacao (*Theobroma cacao* L.) Del Banco de Germoplasma del tipo genético criollo, amelonado e híbridos trinitarios. Las accesiones seleccionadas fueron 6 árboles que cumplieron con las características fueron las siguientes: TSH 539, IMC 67, CCN51, ICS 95, Amelonado y Cáceres (Criollo) atendiendo a la nomenclatura de los árboles en el banco de germoplasma.

### **2.3.3 Muestra**

Doce botones sin abrir de cojines florales de 3.5-6 mm de longitud, (2 por accesión de cacao) ubicados en tronco y ramas pleiotrópicas de cada accesión evaluada.

## **2.4 Recolección de datos**

### **2.4.1 Ensayo preliminar**

Se desarrollo un ensayo preliminar con el genotipoTSH539, para obtener datos de como este se desarrolla en los medios de cultivo utilizados para la fase final, donde se obtuvieron datos comparativos con respecto a resultados finales, el ensayo preliminar también tuvo como finalidad la manipulación optima del material vegetativo, manipulación de la siembra del material vegetativo, aplicación de la Técnicas para el material vegetativo, cambios de medios de cultivo y observación de explantes y manipulación de ellos.

### **2.4.2 Fase de campo**

Para la obtención del material vegetativo de cacao (*Theobroma cacao* L.) se realizaron 3 viajes de campo. Se visitó el banco de germoplasma de la Universidad de El Salvador y se extrajeron los botones florales de las accesiones de cacao seleccionadas (el material vegetativo se marcó previamente para diferenciar las accesiones seleccionadas de los demás árboles de cacao, aparte se utilizó un mapa brindado por la Facultad de Ciencias Agronómicas para su ubicación)

#### **2.4.2.1 Colección del material vegetal.**

Se colectaron 12 botones florales de cacao, sanos totalmente cerrados, y de longitud de 3.5 -6 mm, color rosado claro de forma puntiaguda, de los extremos de las ramas a una altura de uno a uno punto cinco metros de altura, en horas de la mañana de 8:00 - 9:00 am. Teniendo en cuenta el botón más sobresaliente del cojinete floral.

### **2.4.3 Fase de laboratorio**

Para esta fase se utilizó la metodología de Penn State modificado (College of Agricultural Sciences) elaborado por Gultinan y Maximova y col., 2010, este protocolo es implementado para cultivo “*in vitro*” de cacao (*Theobroma cacao* L.).

#### **2.4.3.1 Medios de cultivo**

Para los primeros 20 días de cultivo se utilizó el medio de cultivo PCG (Primary Callus Growth = Crecimiento de Callo Primario) a una temperatura de 26-28 °C en obscuridad completa, posteriormente a los siguientes 14 días los explantes (pétalo y estaminodio) se cambiaron de medio de cultivo SCG (Secondary Callus Growth = Crecimiento de Callo Secundario), luego que trascurrieron los primeros 14 días del medio SCG, después se pasaron al medio ED (Embryo Development Medium =Medio de Desarrollo Embrionario) donde se mantuvo por 11 días, próximamente en dos sub-cultivos frescos en el mismo medio ED por 11 días cada uno; donde se tendría la aparición de embriones somáticos, y sus diferentes estadios (globular, de corazón y torpedo). Se siguieron las indicaciones de preparación de Penn State, Gultinan y Maximova (2010); Tal como muestra la tabla 1.

**Tabla 1: Medios de cultivo según los días transcurridos.**

Días	Explante		volumen medio	Condiciones de cultivo
	Pétalo	estaminodio		
1-20	Medio PCG	Medio PCG	40 ml	Oscuridad 26º - 28º C
21-34	Medio SCG	Medio SCG	40 ml	Oscuridad 26º - 28º C
35-45	Medio ED 1	Medio ED	40 ml	Oscuridad 26º - 28º C
46-56	ED 2	ED 2	40 ml	“
57-67	ED 3	ED 3	40 ml	“

#### **2.4.3.2 Preparación del medio de cultivo**

Para la preparación del medio de cultivo se utilizaron soluciones madres de diferentes componentes que conforman el medio nutritivo formulado y descrito compuesto por sales inorgánicas como macronutrientes y micronutrientes, sales orgánicas como vitaminas y azúcar. Tal como muestra la tabla 2, 3 y 4.

**Tabla 2: Composición para medio de cultivo PCG (Primary Callus Growth Medium)**

<b>Medio de cultivo para embriones somáticos primarios (PCG)</b>	<b>Volumen final (1L)</b>
DKW macro A (10X)	100 ml
DKW macro B (10X)	100 ml
DKW micro (100X)	10 ml
DKW vitaminas (1000 X)	1 ml
Glucosa	20 g
Glutamina	250 mg
Mio-Inositol	100 mg
2,4-D (1 mg / ml stock)	2 ml
TDZ (0.2 mg / ml stock)	25 ul
Agua de coco	400 ml
PVP	250 mg
Phytigel	2 g
Autoclave	18 minutos
Ajuste de Ph	5.8 (1M KOH)

Fuente extraída de: (Guiltinan y Maximova 2010) modificado.

**Tabla 3: Composición para medio de cultivo SCG (Secondary Callus Growth Medium)**

<b>SCG (Secondary Callus Growth Medium)</b>	<b>Volumen final (1 L)</b>
Mc,Cown`s salts	2.3 g
B5 vitaminas (1000X Stock)	1 ml
Glucosa	20 g
2,4-D (1mg / ml Stock)	2 ml
6- BAP (1mg / ml Stock)	50 ul
Agua de coco	400 ml
DMSO	0.2 ml
Kinetina (1mg / ml Stock)	300 ul
PVP	250 mg
Phytigel	2.2 g
Autoclave	18 minutos
Ph	5.7 (1M KOH)

Fuente extraída de: (Guiltinan y Maximova 2010) modificado.

**Tabla 4: Composición para medio de cultivo ED (Embryo Development Medium)**

<b>ED (Embryo Development Medium)</b>	<b>Volumen final (1 L)</b>
DKW macro A (10X)	100 ml
DKW micro B (10X)	100 ml
DKW micro (100X)	10 ml
DKW vitaminas (1000X)	1 ml
Sucrosa	30 gr
Glucosa	1 gr
Agua de Coco	400 ml
PVP	250 mg
PH	5.7 (1M KOH)
Phytigel	2 g
Autoclave	18 minutos

Fuente extraída de: (Guiltinan y Maximova 2010) modificado

#### **2.4.3.3 Esterilización del material vegetativo en el laboratorio.**

Se siguió lo indicado en el protocolo de desinfección estandarizado por (Guiltinan y Maximova 2010); para esterilización en laboratorio antes de la disección, el cual se detalla a continuación:

1. Se decantó la solución de transporte del vial que contenía los botones florales y se lavaron 3 veces con agua estéril.
2. Posteriormente los botones se transfirieron a tubos de 50 ml (con tapa rosca) con 40 ml de solución de hipoclorito de sodio al 3 %, se aseguró que los botones florales estuvieran completamente sumergidos en la solución de hipoclorito; se dejó esterilizar durante 10 min. Con inversión ocasional de 2 minutos.

3. Se eliminó completamente la solución de hipoclorito de sodio y se agregó 40 ml, a 22-25 °C, de agua Milli-Q auto-clavada para enjuagar los botones. Se invirtió el tubo varias veces y se decantó el agua. Se repitió el enjuague con agua estéril fresca dos veces más. Se decantó el agua del último enjuague y se eliminó la mayor cantidad de agua posible. Se le aplicó un último enjuague con 40ml de agua auto-clavada y se le agregó 1 gota de tween 20, dejando reposar por 2 minutos, luego se dio dos enjuagues con agua estéril e inversiones suaves al tubo para no dañar el tejido de los botones en su etapa final del lavado con agua auto-clavada a temperatura ambiente

4. Posteriormente, utilizando pinzas estériles se transfirieron los botones florales a una placa de Petri estéril dentro de la campana de transferencia.

5. Se cerró la placa de Petri para evitar la desecación de los botones florales y se mantuvieron en su lugar fresco hasta la disección en cámara de flujo laminar horizontal.

#### **2.4.3.4 Disección y siembra del material vegetativo en el laboratorio.**

La disección de la muestra tiene que ser rigurosa debido a que este es un paso fundamental para la extracción de los explantes, estos no deben sufrir daños, Guiltinan y Maximova, 2010: desarrollaron un protocolo para disección de botones florales e inducción de callos para SE (Embriogénesis Somática) primaria, que se desglosa a continuación:

1. Se transfirió entre 4-10 botones florales a una placa de Petri estéril.

2. Se cortaron los botones florales 1/3 de la longitud de la flor desde la base con una hoja de bisturí estéril

3. Se extrajeron las partes florales, incluidos los estaminodios y los tejidos de los pétalos, a través de la abertura en el extremo de corte, utilizando un fórceps estéril de punta fina.

4. Se transfirieron las partes florales a una placa de Petri de 100 x 15 mm conteniendo 40 ml de medio PCG (Primary Callus Growth).

5. Se sellaron las placas de Petri con una doble capa de "parafilm" y se mantuvieron los cultivos con la tapa hacia arriba en oscuridad a 26 - 28 ° C durante 14 días.

6. Después de 14 días, se transfirieron los explantes a una placa de Petri de 100 x 15 mm con 40 ml de medio SCG (Secondary Callus Growth). Se colocaron los explantes en el mismo orden de siembra y se sellaron las placas, los cultivos se mantuvieron en oscuridad durante otros 14 días.

7. Después de haber transcurrido los 14 días anteriores se cambiaron a medio ED (Embryo Development Medium) para el desarrollo total del callo.

#### **2.4.4 Diseño Experimental.**

Tal como se muestra en la tabla 5, este diseño presento las siguientes características:

- 1- Se utilizaron 120 explantes ,20 de cada genotipo (10 de estaminodio y 10 de pétalo), la cual se distribuyeron 10 explantes por caja de Petri, basándose en el estudio realizado por Aura Trujillo et al.,( 2011). Se utilizó la mitad del número de explantes utilizados en esta investigación.
- 2- Cada genotipo que se selecciono estaba conformado por dos repeticiones (1R: replica uno, 2R: replica dos).se utilizaron dos replicas por el motivo económico, ya que a mayor número de réplicas mayor costo de la investigación, por lo tanto, hubiese más demanda de reactivos y materiales. Aparte de falta de manipulación de los explantes por falta del investigador.
- 3- Tanto para los genotipos TSH539 , IMC67, CCN51, ICS95, Amelonado, Cáceres (criollo) cada replica estuvo formada por dos cajas de Petri (en una caja se sembró los cinco explantes de pétalo y en otra los cinco explantes de estaminodio)

- 4- Se sembraron cinco explantes por cada caja y se establecieron dos cajas por cada botón floral, (en una caja se sembraron los estaminodios y en otra los pétalos del mismo botón floral). Se realizaron dos replicas por cada genotipo, siendo así una réplica=un botón floral, y se evaluaron dos botones florales por cada uno de ellos sumando en total un total de 24 cajas y 120 explantes.
- 5- Se rotuló cada caja de Petri con los datos respectivos; genotipo, tipo de explante (P=pétalo, E=estaminodio)

**Tabla 5: Diseño experimental**

Genotipos	TSH539	IMC67	CCN51	ICS95	AMELONADO	CACERES (CRIOLLO)	TOTAL
Replica 1	● ○	● ○	● ○	● ○	● ○	● ○	60
Replica 2	● ○	● ○	● ○	● ○	● ○	● ○	60
Total	20	20	20	20	20	20	120

○ Caja con explantes de pétalo.

● Caja con explantes de estaminodio.

#### 2.4.4.1 Variables evaluadas

Las variables evaluadas en cada una de las etapas de la embriogénesis somática durante la investigación fueron las siguientes:

Primeros 20 días en medio PCG (Primary Callus Growth).

- ✓ **Presencia de callo:** se observó y contabilizó cuantos explantes formaron callo de cada genotipo.

A los 14 días en medio SCG (Secondary Callus Growth).

- ✓ **Coloración del callo:** se observó la coloración del callo formado en la etapa I, donde se determinó si fue: blanco-café, blanco o café.
- ✓ **Textura del callo: friable, compacto y mixto (friable-compacta):** esta variable se midió por medio de la observación directa de los callos a través de la caja de Petri, se determinó qué tipo de textura presentaban los callos formados.

Desarrollo de embriones a los 45 días en medio ED (Embryo Development Medium)

- ✓ **Formación de callo embriogénico:** se observaron los callos directamente para ver si presentaba estructuras globulares formadas a partir de los explantes que habían desarrollado callo, se contaron cuántas estructuras poseía cada explante.

#### 2.5 Procesamiento y tabulación de datos

Los datos se procesaron por medio del programa Excel (hoja electrónica del programa Excel) y se graficaron para su interpretación.

### 2.5.1. Formación de callo en explantes

- **Porcentaje de explantes que formaron callo en pétalos:** este dato se obtuvo con la ecuación siguiente:

$$\% \text{ E.p.c.C} = \text{N}^\circ \text{ E.p.c.C} / \text{T.E.P} \times 100 \quad \text{donde:}$$

**% E.p.c.C:** Porcentaje de explantes de pétalo con callo

**Nº E.p.c.C:** número de explantes de pétalos con callo

**T.E.P:** total de explantes de pétalos

- **% de explantes que formaron callo en estaminodio:** este dato se obtuvo con la ecuación siguiente:

$$\% \text{ E.e.c.C} = \text{N}^\circ \text{ E.e.c.C} / \text{T.E.E} \times 100 \quad \% \text{ donde:}$$

**% E.e.c.C:** Porcentaje de explantes de estaminodio con callo.

**T.E.E:** Total de explantes de estaminodio.

**Nº E.p.c.C:** Número de explantes de estaminodio con callo

### 2.5.2. Coloración de callo en el explante

Para la coloración del callo, se visualizó y diferenciaron los callos obtenidos en cada tipo de explante por cada accesión de cacao, por su coloración blanco, café y mixto (café-blanco) y se totalizaron para cada coloración llevándose los datos a una matriz de tabulación de datos en hoja electrónica del programa Excel para graficar los resultados.

### 2.5.3. Textura del callo

Para la variable textura del callo= friable, compacto o mixto (friable compacto) los datos se analizaron mediante los siguientes pasos:

- Se totalizaron los explantes por cada tipo de textura y tipo (pétalo y estaminodio) en una matriz de recolección de datos.

- Se tabularon los resultados e introdujeron a (hoja electrónica del programa Excel) para generar la gráfica, los resultados de todos los genotipos se presentaron en una sola gráfica.
- Esta variable fue comparativa entre cada genotipo con el control (TSH 539). Para obtener un dato certero de qué tipo de textura en el callo fue más abundante con respecto a tipo de explante (pétalo, estaminodio) y genotipo.

#### **2.5.4. Formación de estructuras globulares pro-embriogénicas.**

Para esta variable los datos fueron analizados mediante los siguientes pasos:

- Se totalizaron los explantes que formaron estructuras globulares.
- Se tabularon los resultados obtenidos en los sub-cultivos en los últimos medios ED de la cual se obtuvo la media de estructuras globulares por cada genotipo.
- Para la obtención de la media se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{Media de estructuras Globulares} = \text{TEG} / \text{NTEx}$$

**TEG:** total de estructuras globulares

**NTEx:** número total de explantes

- Se tabularon los resultados e introdujeron a (hoja electrónica del programa Excel) los resultados de todos los genotipos fueron presentados en una sola gráfica.

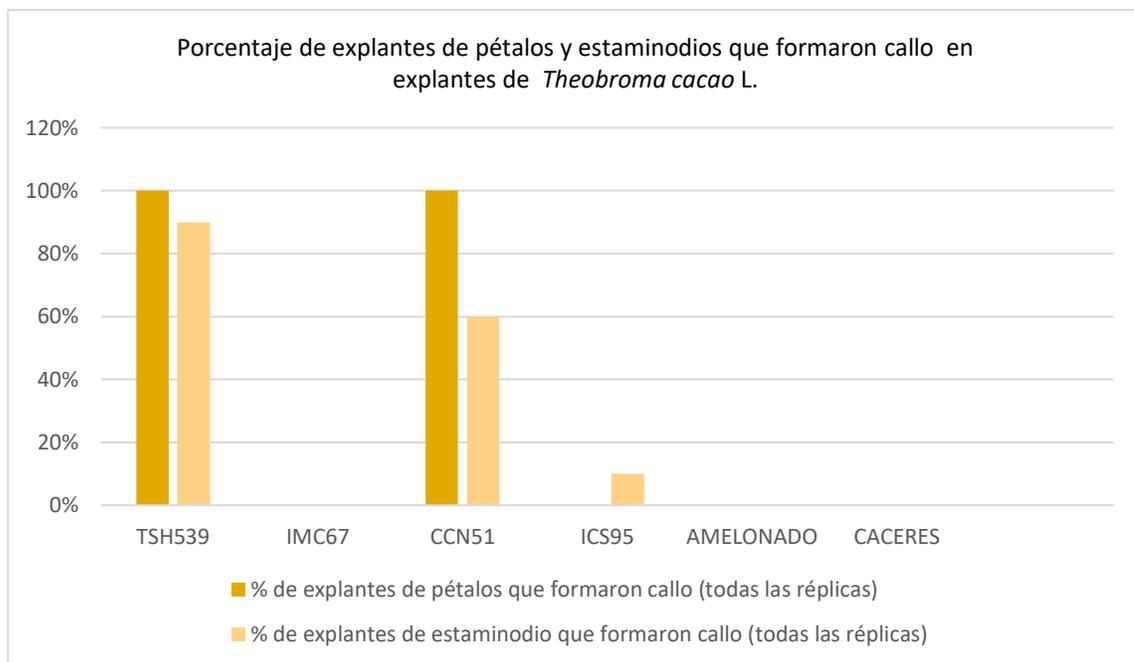
## CAPITULO III: RESULTADOS Y DISCUSION

### 3.1. Formación de callo en explante de pétalo y estaminodio en acesiones de *Theobroma cacao* L.

El porcentaje de callo en explantes de estaminodio y pétalo en medio PCG (Tal como se muestra en la tabla 6 y figura 2) fue visible a partir del día siete y a los 20 días de su siembra, presentando inicialmente el engrosamiento del explante luego el crecimiento de células superficiales, dando indicios a formación de callos con una apariencia de granos muy pequeños la cual se desarrollaron sobre la superficie del explante, unos de forma seccionada y otras de forma total.

**Tabla 6: Matriz de congruencia de datos generales de explantes que formaron callo.**

	GENOTIPOS					
	TSH539	IMC67	CCN51	ICS95	AMELONADO	CACERES
No de explantes de pétalos que formaron callo (todas las réplicas)	10	0	10	0	0	0
No de explantes de estaminodio que formaron callo (todas las réplicas)	9	0	6	1	0	0



**Figura 2.** Porcentaje de explantes de pétalos y estaminodios de *Theobroma cacao* L. 20 días después de la siembra en medio de cultivo PCG con el protocolo de Gultinan y Maximova diseñado en el año 2010 (Modificado).

Para el genotipo TSH 539, tuvo el mayor porcentaje de formación de callo 100% y 90% para pétalo, estaminodio respectivamente.

Para el genotipo CCN51, el cual obtuvo el mayor porcentaje de formación de callo con respecto a los genotipos restantes, donde se obtuvo 100% y 60% para pétalo y estaminodio respectivamente para dicho genotipo.

Para el genotipo ICS95, se obtuvo que el 10% de los explantes de estaminodio formaron callo, en contraste los explantes de pétalo no formaron callo.

Para los genotipos IMC67, Amelonado y Criollo (Cáceres) no formaron callo en los explantes de pétalo y estaminodio siendo así los genotipos que no presentaron ningún engrosamiento ni crecimiento de tejido en medio PCG.

De acuerdo con los datos obtenidos, los genotipos que respondieron positivamente para formación de callo en medio de cultivo PCG fueron; TSH539, CCN51 Y ICS95, de los tres genotipos que formaron callos, el que menos cantidad de callos

formo fue presentado por el genotipo ICS95 y fue exclusivamente en explantes provenientes de estaminodio, a comparación de los otros dos genotipos que formaron callo en explantes provenientes de pétalo y estaminodio.

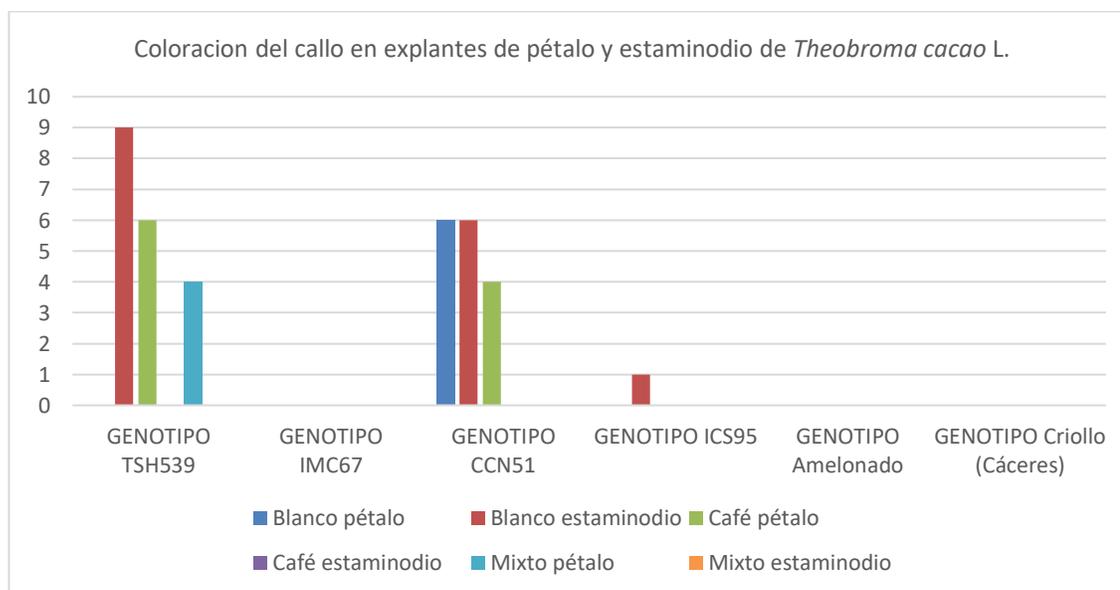
Agregando que los genotipos restantes no presentaron ninguna formación de callo. Comparando con los resultados reportados por (Aura T et al., 2011) que obtuvieron menores resultados en los explantes de estaminodio con respecto a la formación de callo, mencionando que esto ocurre por la forma peculiar recta del estaminodio favoreciendo a una división mitótica temprana del explante no obstante con el explante del pétalo que tiene una curvatura en forma de cuello de cisne disminuyendo el contacto con el medio de cultivo. En el estudio realizado por (Chanatasig, 2004) reporta que todos los explantes utilizados tuvieron respuesta callogénica, pero difirieron en el desarrollo y tipo de explante, no obstante, en esta investigación realizada el genotipo IMC67 no presentó ninguna respuesta, pudiendo ser negativo para responder a desarrollo de callo en el medio de cultivo utilizado, pero los genotipos de Cáceres y Amelonado estos posiblemente no respondieron por ser cacaos de origen criollo.

### **3.2. Coloración del callo en explantes de pétalo y estaminodio de *Theobroma cacao* L.**

La coloración de callo en los explantes de estaminodio y pétalo *in vitro* (Tal como se muestra en la tabla 7) de *Theobroma cacao* L., fue visible a partir del primer medio de cultivo a los 15 días de su siembra, el cambio de medio PCG a medio SCG profundiza más la tonalidad de su color, teniendo así una mejor observación de su coloración al finalizar los 34 días después de su siembra (Tal como se muestra en la figura 3).

**Tabla 7: Matriz de congruencia de datos generales de los colores que presentaron los explantes de pétalos y estaminodio de *Theobroma cacao* L.**

Color callo	EXPLANTE	GENOTIPO TSH539	GENOTIPO IMC67	GENOTIPO CCN51	GENOTIPO ICS95	GENOTIPO Amelonado	GENOTIPO Criollo (Cáceres)
<b>Blanco</b>	pétalo	0	0	6	0	0	0
	estaminodio	9	0	6	1	0	0
<b>Café</b>	pétalo	6	0	4	0	0	0
	estaminodio	0	0	0	0	0	0
<b>Mixto</b>	pétalo	4	0	0	0	0	0
	estaminodio	0	0	0	0	0	0



**Figura 3:** Coloración de callos de explantes de pétalos y estaminodios de *Theobroma cacao* L. 34 días después de la siembra en medio del cultivo PCG con el protocolo de Gultinan y Maximova diseñado en el año 2010 (Modificado).

Para el genotipo TSH539, obtuvo el mayor número de callos (9/10) con coloración blanca para el explante de estaminodio, callo coloración café (6/10) para el explante pétalo y (4/10) explantes de pétalo con coloración mixta (café-blanco).

Para el genotipo CCN51, Las coloraciones más dominantes fueron blanca para los explantes de estaminodio (6/10) y para pétalo (6/10), agregando que (4/10) explantes de pétalo presentaron coloración café en su totalidad.

Para el genotipo ICS95 (1/10) explantes de estaminodio presentaron coloración blanca siendo así el único callo crecido en el medio PCG.

Para los genotipos IMC67, Amelonado y Criollo (Cáceres), no se registraron datos de coloración de callo debido a que estos no formaron callos.

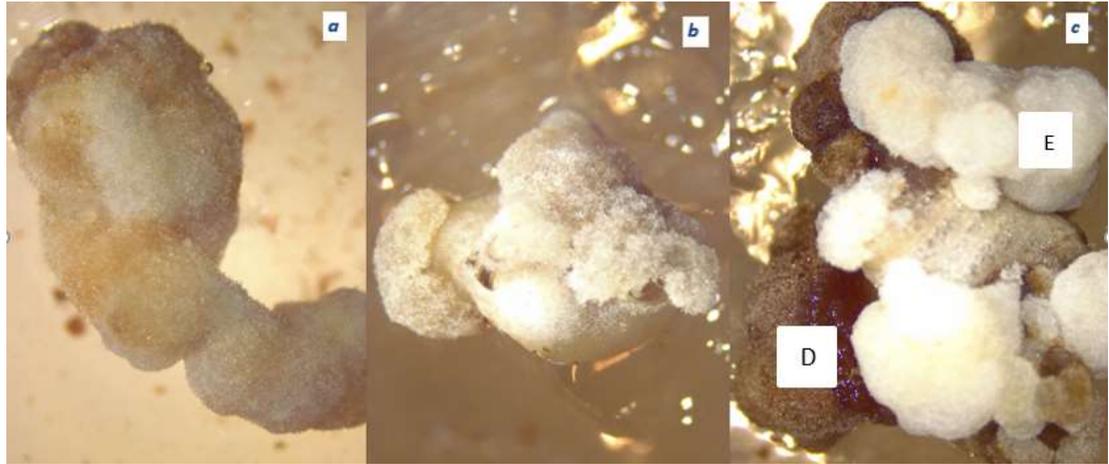
De acuerdo con los datos obtenidos el color que presentaron los callos provenientes de explantes de estaminodios fueron; coloración blanca y los explantes provenientes de pétalo presentaron las coloraciones siguientes en forma descendente; coloración blanca, coloración mixta y coloración café. El genotipo TSH539 presento mayor porcentaje de coloración blanca para callo proveniente de estaminodio y coloración mixta (en menor porcentaje) y café para callo proveniente de explante de pétalo, según con los datos obtenidos por (Chanatasig, 2004) el color café se debe por una acumulación de compuestos fenólicos que dan la apariencia de un tejido necrotizado, y menciona que estos cambios de color café proceden a explantes con formación de embriones somáticos, para el genotipo CCN51 presento coloración blanca para callo proveniente de estaminodio con un porcentaje igualitario con coloración blanca para callo proveniente de explante de pétalo, y en menor porcentaje en coloración café para callo proveniente de explante de pétalo, haciendo contraste con los resultados obtenidos por (boutchouanget al., 2016) mencionando que los callos que presentaron coloración blanca no desarrollaron embriones, más sí los que presentaron coloración café debido a la alta fenolización..

### **3.3. Textura del callo en explante de pétalo y estaminodio de *Theobroma cacao* L.**

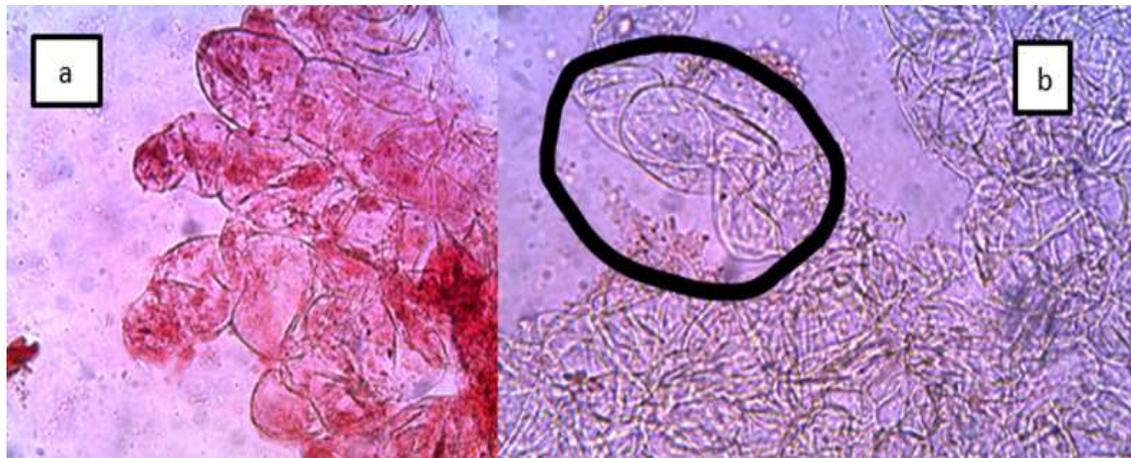
La textura de los callos provenientes de los explantes de estaminodio y pétalo *in vitro* de *Theobroma cacao* L. fue visible a partir de la resiembra en el día cinco, a los 25 días de su siembra, el cambio de medio PCG a medio SCG profundiza más la visualización de la textura de los callos y los hace más notorios a través de las cajas de Petri (Tal como se muestra en la figura 4,8 y tabla 8).

Se realizaron muestras de algunos callos y se llevaron al microscopio a 40x con el objetivo de observar la forma celular de cada textura, al momento de observar las muestras en el microscopio se visualizó diferencia entre la textura friable y la textura compacta ya que este tiene diferente desarrollo celular con respecto al crecimiento de ellas, dando así una diferencia en muestras totalmente visibles, la textura suave o friable tiende a tener células parcial o totalmente adheridas una a la otra y al momento de realizar la muestra estas no presentaban ruptura de la pared celular y se puede apreciar exactamente la forma de ellas (Tal como se muestra en la figura 5 y 6).

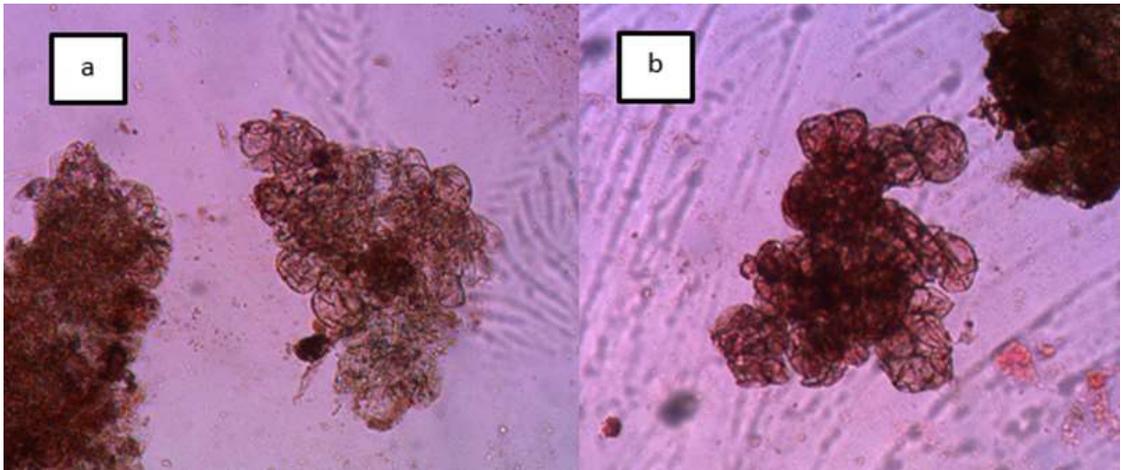
Mientras que en la textura compacta las células son adheridas totalmente una a la otra lo cual se visualizan con rupturas de la pared celular en las periferias de los cortes. (Tal como se muestra en la figura 7).



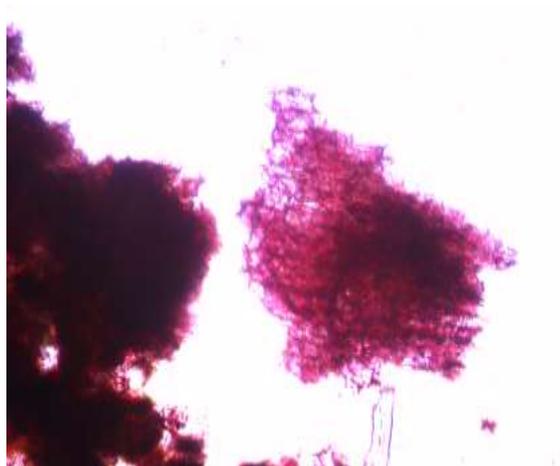
**Figura 4.** Tipos de texturas en callos de explantes de *Theobroma cacao* L. a: explante de estaminodio con textura compacta. b: explante de pétalo con textura friable o suave c: explante de pétalo con textura friable-compacta o mixta, D) Textura friable, E) Textura compacta. Fotografías tomadas a 4X (panorámico) con cámara electrónica adaptada a microscopio óptico Leica.



**Figura 5.** Textura friable en explante color blanco de *Theobroma cacao* L. Observado a 40X en microscopio óptico Leica. a) Teñido con safranina al 1%, b) sin tinción, se observa que las células son hialinas y ovoides sobrepuesta una sobre otra como especie de dedos.



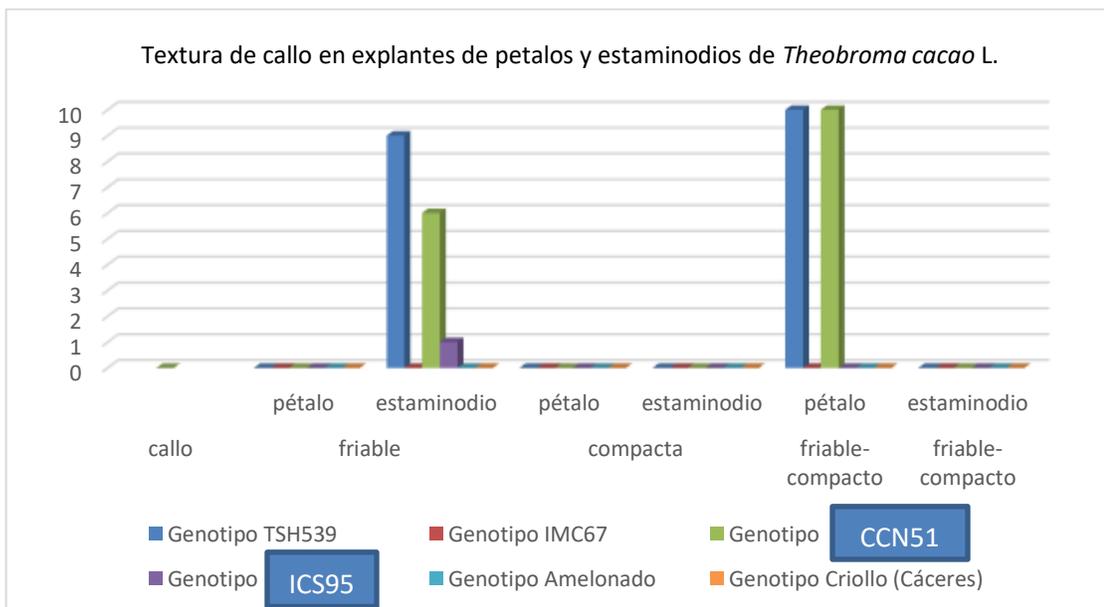
**Figura 6.** Textura friable en explante color café de *Theobroma cacao* L. Observado a A 40X en microscopio óptico Leica. a) Sin tinción, b) teñido con safranina al 1%, se observa que estas células tienen una cantidad alta de polifenoles que les da el color característico café destacando que la forma de las células es más poligonales y uniformes.



**Figura 7.** Explante con textura compacta color blanco, teñido con safranina al 1%, donde se observan irregulares de la pared celular alrededor del corte. Observado a 40X en microscopio óptico Leica.

**Tabla 8: Matriz de congruencia de datos generales de textura que presentaron los explantes de pétalos y estaminodio de *Theobroma de cacao* L.**

Textura Callo	Tipo de explante	Genotipo TSH539	Genotipo IMC67	Genotipo CCN51	Genotipo ICS95	Genotipo Amelonado	Genotipo Criollo (Cáceres)
Friable	pétalo	0	0	0	0	0	0
	estaminodio	9	0	6	1	0	0
Compacta	pétalo	0	0	0	0	0	0
	estaminodio	0	0	0	0	0	0
friable-compacto	pétalo	10	0	10	0	0	0
friable-compacto	estaminodio	0	0	0	0	0	0



**Figura 8.** Textura de callos de explantes de pétalos y estaminodios de *Theobroma cacao* L. 34 días después de la siembra en medio de cultivo PCG con el protocolo de Gultinan y Maximova diseñado en el año 2010 (Modificado).

Para el genotipo TSH539, el 100% de los callos formados por los explantes de pétalo desarrollaron textura mixta (friable-compacta), mientras que el 100% de los callos de explantes del estaminodio desarrollaron textura friable.

Para el genotipo CCN51, el 100% de los callos formados por los explantes de pétalo desarrollaron textura mixta (friable-compacta), mientras que el 100% de los callos de los explantes del estaminodio desarrollaron textura friable.

Para el genotipo ICS95, El 100% de los callos formados por los explantes de estaminodio desarrollaron textura friable.

Para los genotipos IMC67 Amelonado y Criollo (Cáceres), no se registraron datos de textura de callo debido a que estos no formaron callos.

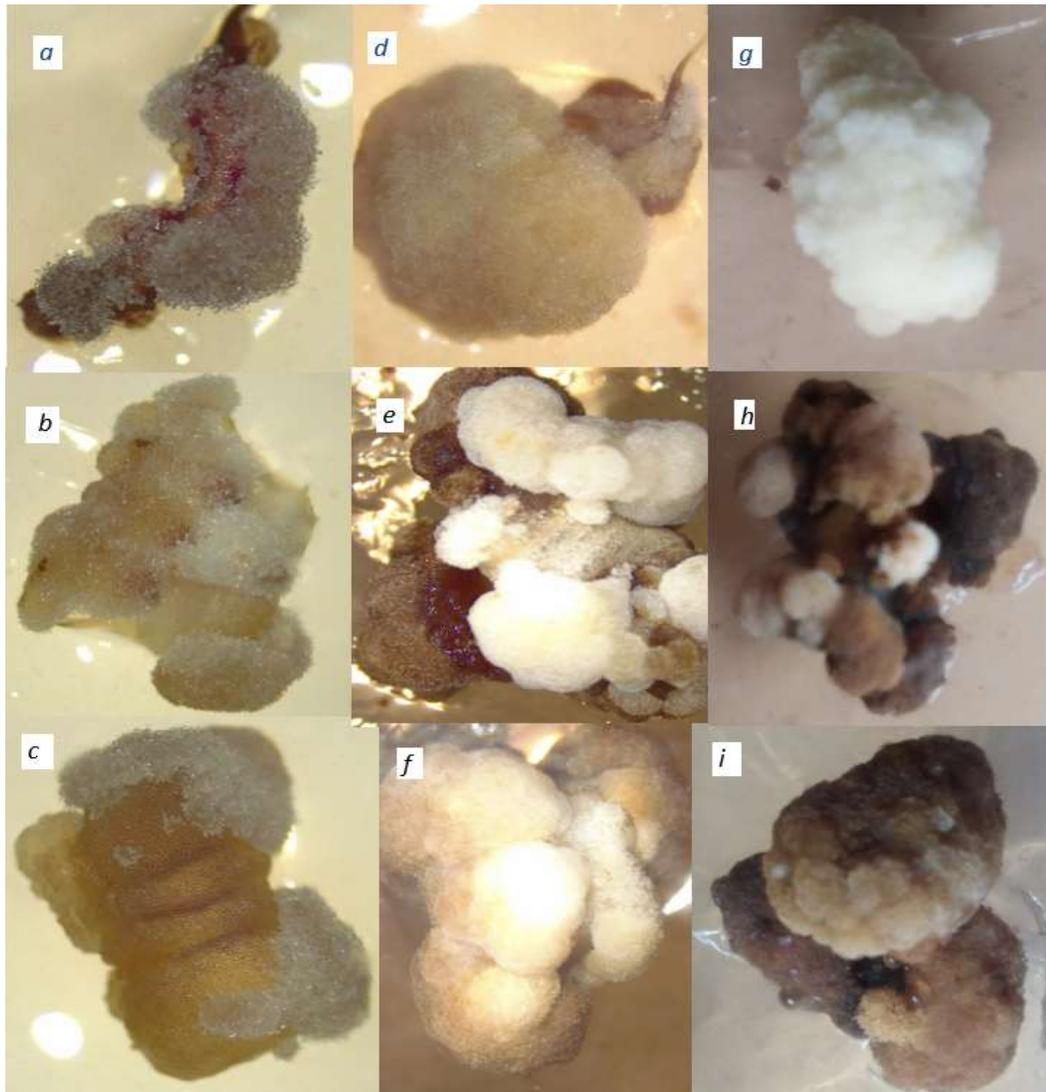
De acuerdo con los datos obtenidos la textura más abundante para los explantes de pétalo fue; textura mixta (friable-compacta) y para los explantes de estaminodios fue; textura friable, destacando que ninguno de los explantes formo callo con textura completamente compacta contrarrestando con los datos obtenidos con (Boutchouang et al., 2006), que obtuvieron embriones somáticos de aquellos explantes que formaron textura friable. Dando con mayor porcentaje de formación de callo con textura mixta para los explantes de pétalo en los genotipos TSH539 Y CCN51, los explantes de estaminodio presentaron una formación de callo con textura friable para los genotipos TSH539, CCN51 y ICS95, Esto puede ser posiblemente por la naturaleza de las células que los conforman ,en el cojín floral los estaminodios se encuentran fundidos en la base, en contacto con la zona meristemáticas , en comparación con los pétalos que están más externos en la estructura floral.

Esto puede ser que difieran en algunos genes entre los explantes de pétalo y estaminodio siendo así que el resultado dependerá del tipo de explante así será la respuesta en la textura que presente el callo formado, ya que se desarrollaron en un mismo medio de cultivo pero sin embargo difieren en su respuesta con respecto a la

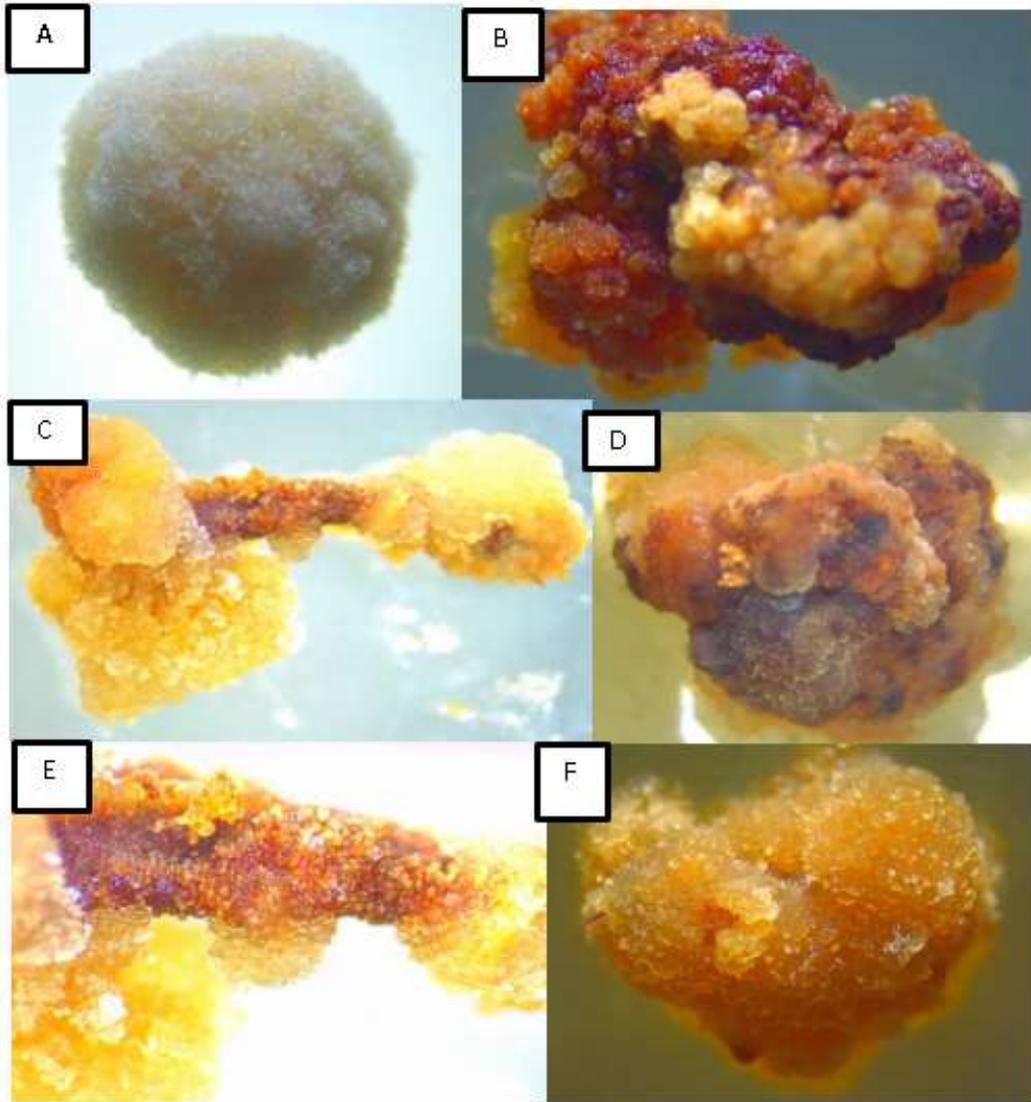
textura que desarrollada, esto puede ser por varios factores que afectan la textura del callo.

### **3.4 Formación de estructuras globulares en callos provenientes de explantes pétalos y estaminodio de *Theobroma cacao* L.**

De acuerdo con los datos obtenidos el número de estructuras globulares para todos los explantes (pétalos y estaminodios) fue cero, al finalizar en los sub-cultivos del medio ED, los datos registrados para todos los genotipos fue cero ya que ninguno de los genotipos desarrollo estructuras globulares. (Tal como se muestra en la figura 9 en ensayo preliminar con el genotipo TSH539 y figura 10 con todos los genotipos en el desarrollo de la investigación final) Asimismo, Omokolo et al. (1997), consideran que la actividad de algunas enzimas como la peroxidasa y la AIA oxidasa está envuelta en muchos mecanismos fisiológicos, por lo que podría ser un marcador del potencial embriogénico en varias especies; por lo tanto, la alta concentración de compuestos fenólicos en los callos y que modifican la actividad enzimática, podrían reducir la respuesta embriogénica. En contraste con los resultados reportados que se obtuvo que muchos de los callos formados presentaron fenolización, pudiendo estos afectar a la aparición de dichos embriones somáticos, destacando que Quirós (2013) reporta que el genotipo ICS 95 no posee capacidad embriogénica obteniéndose respuesta similar con los datos obtenidos en esta evaluación, Chantásig (2004) manifiesta que hay una relación entre la callogénesis y embriogénesis, contrarrestando que la formación de callogénesis no determina si un material es embriogénico, pero no descarta la relación entre ellas ya que sus variables fueron realizadas al mes y medio de cultivo, cuando todavía no se expresaba la embriogénesis somática, los genotipos Cáceres y Amelonado su respuesta fue negativa desde un inicio de la evaluación, esto podría ser efecto de algunos genes que reprimen la división celular en el crecimiento primario del callo.



**Figura 9** .Crecimiento de explantes de pétalo y estaminodio para el genotipo TSH539, en ensayo preliminar **a**: formación de callo en explante de estaminodio finalizando medio de cultivo PCG. **b, c**: formación de callo en explante de pétalo finalizando medio de cultivo PCG. **d**: crecimiento de callo en explante de estaminodio finalizando medio de cultivo SCG. **e, f**: crecimiento de callo en explantes de pétalo finalizando medio de cultivo SCG. **g**: iniciación de maduración de callo para formación de embrión en estado globular en explante de estaminodio. **h, i**: iniciación de maduración de callos para formación de embriones en estado globular en explantes de pétalos. (Explantes de *Theobroma cacao* L.) Fotografías tomadas con cámara electrónica adaptada a microscopio óptico Leica. Observada a 4X (panorámico).



**Figura 10.** Etapa final en subcultivo en medio ED de *Theobroma cacao* L. **A)** Explante de estaminodio de TSH539, **B)** Explante de pétalo de TSH539, **C, E)** Explante de estaminodio de CCN51, **D)** Explante de pétalo de CCN51, **F)** Explante de estaminodio de ICS95. Fotografías tomadas con cámara electrónica adaptada a microscopio óptico Leica. Observada a 4X (panorámico), NINGUNO DE LOS GENOTIPOS DESARROLLO ENBRIONES SOMATICOS.

## CAPITULO IV: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### 4.1 CONCLUSIONES

- El genotipo de cada variedad de *Theobroma cacao* L. evaluados durante el desarrollo de esta investigación difieren en su respuesta ante el mismo tipo de medio de cultivo y mismas concentraciones hormonales, siendo los genotipos TSH539, CCN51 Y ICS95 los que desarrollaron un tipo de respuesta.
- Las variables morfológicas en estos genotipos no son determinantes para predecir si tienen o no tiene capacidad embriogénica.
- Los genotipos con mayor porcentaje de explantes que desarrollaron callo son; TSH539 con el 95% y CCN51 con el 80%.
- La coloración más abundante en los callos de todos los explantes fue blanca, dados para el tipo estaminodio, y coloración café para explantes de pétalo.
- La textura más abundante para los genotipos CCN51 y TSH539 fue friable-compacta para los explantes de pétalo.
- Los genotipos IMC67, Amelonado y Criollo (Cáceres) no presentaron respuesta.
- Ninguno de los genotipos seleccionados desarrollo embriones somáticos.

## 4.2 RECOMENDACIONES

- Para los futuros o investigaciones similares a realizar, se deberá hacer una nueva caracterización molecular de los genotipos del banco de germoplasma de la Facultad de Ciencias Agronómicas para garantizar que el genotipo utilizado sea el descrito
- Emplear el protocolo con variantes en el medio de cultivo para determinar si difieren en su respuesta y poder obtener un modelo indicado a seguir para cada genotipo.
- Emplear estudios pre-evaluativos con respecto a la fenología de estos genotipos y determinar si este afecta al momento de la siembra y colecta del material en los explantes para embriogénesis somática.
- Desarrollar estudios citológicos de células, utilizando callo micropropagable y no micropropagable para establecer diferencias entre estas células y así tener un parámetro para predecir si dichos explantes desarrollaran embriones somáticos.
- La micropropagación es un proceso empírico que involucra jugar con diferentes parámetros como; tipo de explante, fenología, medio de cultivo, condiciones físicas y la genética de cada una de ellas.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1- Angel ,J X. & J.Gonzales, 2013 Evaluación de dos métodos de micropropagación masal de Piña (*Ananas comosus* L. Merr) variedad Golden. Tesis de ingenieros agrónomos, San Salvador, SV, Universidad de El Salvador.
- 2- Aura T, Lucía Garcés, Adriana Rúa. Rev. colomb. Biotecnol. Vol. XII  
Diciembre 2011.Rúa Regeneración vía embriogénesis somática de una variedad colombiana élite de *Theobroma cacao* L.
- 3- Bartley, B, 2005 The genetic diversity of cocoa and its utilization CABI publishing. Cab international, Wallingford Oxfordshire.
- 4- Batista, L. 2009 Guía Técnica el Cultivo de Cacao en la República Dominicana. Santo Domingo, República Dominicana. CEDAF.
- 5- Bhattacharjee, R. 2018 International Institute of Tropical Agriculture (IITA) Nigeria
- 6- Boutchouang et al., 2016, Influence of the position of flowers buds on the tree on somatic embryogenesis of cacao (*Theobroma cacao* L.). University of yaounde I
- 7- Castillo, Behtty G., 2004 Determinación de la capacidad embriogénica de 22 clases de cacao tipo nacional multiplicados in vitro vía embriogénesis somática, Ecuador- Guayaquil
- 8- Cristina Isabel Chanatásig Vaca 2004 Costa Rica .Inducción de la Embriogénesis somática en clones superiores de cacao (*Theobroma cacao* L.), con resistencia a enfermedades fungosas.

- 9- Cisne, J. D., I. Muñoz & H. Reyes, s. a. Reguladores de crecimiento L-Cisteína y Ácido ascórbico en el cultivo *in vitro* de Mora (*Rubus glaucus* Benth). Tesis de ingenieros agrónomos, Universidad Nacional Agraria, Nicaragua.
- 10- F., 2012 Cultivo de tejidos vegetales. manual de practicas
- 11- Cuatrecasas, J. (1964). Cacao and its allies. A taxonomic revision of the Genus *Theobroma*. *Contributions to the United States National Herbarium*.
- 12- Dosert, José Roque, Asunción Cano, María I. La Torre y Maximilian Weigend 2011 hoja botánica: cacao *Theobroma cacao* L.
- 13- Gómez Medrano, Sergio Rolando. Guatemala, mayo de 2010.EVALUACIÓN, La propagación *in vitro* en cinco clones promisorios de cacao (*Theobroma cacao* L.).
- 14- Guiltinan y Maxinova, PENN STATE, 2010, integrated system for vegetative propagation of cacao, protocol book
- 15- Levitus, G., Echenique, V., Rubinstein, C., Hopp, E., Mroginski, L. Biotecnología y mejoramiento vegetal II. 2010. INTA-ArgenBIO
- 16- López, O. M., 2013 Establecimiento de un protocolo para el inicio del cultivo *in vitro* de *Agave letonas* (henequén) a partir de yemas axilares. Tesis de licenciatura en biología .Universidad de El Salvador.
- 17- Márquez, M., 2013 conservación *in vitro* bajo condiciones de crecimiento lento y estabilidad genética de crisantemo (*Dendranthema grandiflorum* Kitam)
- 18- Mojica , A., 2012 Biotecnología ,Explante. México
- 19- Martínez, N., 2014 Establecimiento *in vitro* de café (*Coffea arabica*) variedad cuscatleca por medio de micro esquejes . Tesis de licenciatura en biología Universidad de El Salvador.

- 20- Monroy V, Fabio H, Lizzette H, Gladys Q, Amy M 2016 Guía de conceptos básicos de genética en cacao, para su aplicación en la caracterización de germoplasma de cacao en el salvador. CENSALUD, El Salvador.
- 21- Omokolo, D; Tsala, G; Niemenak, N. 1997. Phenol content, acidic peroxidase and IAA- oxidase during somatic embryogenesis in *Theobroma cacao* L. *Biologia Plantarum*
- 22- Orquera, G. X., 2013 Establecimiento de un protocolo para el cultivo *in vitro* de Chuquiragua (*Chuquiraga Jussieu*) a partir de yemas apicales y axilares. Tesis de Ingeniero en Biotecnología, Sangolquí. Universidad de Fuerzas Armadas-ESPE.
- 23- Ovando, I., s. a. Manual de cultivo de tejidos para ingenieros biotecnólogos.
- 24- Rey, A. E., 2012 Generalidades del cultivo *in vitro*
- 25- Rojas, S., J. García & M. Alarcón, 2004 propagación asexual de plantas. 1° ed. Colombia, Ed. Produmedios, 56 p.
- 26- Rumaldo, J. E., 2016 multiplicación *in vitro* de plátano *Musa paradisiaca* (var. Cucare enano) a partir de ápices meristemáticos, utilizando dos concentraciones de 6-Benzilaminopurina y diferentes volúmenes de solución madre en medio líquido. Tesis de Licenciatura en Biología, Universidad de El Salvador.
- 27- Swett, N. G., 2013 Efecto de Bio estimulantes en vivero de papaya hawaiana (*Carica papaya*) en la zona de Santo Domingo de los Tsachilas.
- 28- Quirós 2013, Evaluación de dos protocolos para inducción de embriogénesis somática en clones de cacao (*Theobroma cacao* L.) seleccionados por el programa de mejoramiento genético de cacao del CATIE. Turrialba, Costa Rica.
- 29- Villalobos, V. M. & Thorpe s. a. Micropropagación, conceptos, metodología y resultados.

## LITERATURA CONSULTADA

- 1- A.Fontanel, S.Gire-Bodin, G.Labbé, P.Favereau, M.Alvarez, S.Von Rutte, V.Petiard, *In vitro* multiplication and plant regeneration of *Theobroma cacao* L. via stable embryogenic calli, center de recherch  Nestlé Tours, Quito- Ecuador.
- 2- Alejandro-Lázaro. Azpeitia-Morales, Sáenz-Carbonell, Mirafuentes Hernández .Embriogénesis somática secundaria en el genotipo de cacao (*Theobroma cacao* L.) inifap 1 y su descripción histológica.
- 3-Angel, J.x & J. Gonzales, 2013 Evaluación de dos métodos de Micropropagación masal en piña (*Ananas comosus* L. Merr) variedad Golden. Tesis de ingenieros Agrónomos, san salvador, SV .Universidad de El Salvador
- 4 -Cope, F. W, 1976 The mechanism of pollen incompatibility in *Theobroma cacao* L. Regional Research Centre, University College of the West Indies, Imperial College of Tropical Agriculture, Trinidad
- 5-Donald Juarez Gómez, Somatic embryogenesis and long term conservation of cocoa (*Theobroma cacao* L.) germplasm, department of Agriculture Sciences, September 2012.
- 6-García Escobar & Martinez Ramirez, 2018 Determinacio del perfil de sabor de doce cacaos autóctonos (*Theobroma cacao* L.) producidos en siete fincas cacaoteras de el salvador. Tesis de ingenieros agroindustrial, San Salvador, SV, Universidad de El Salvador.
- 7-García Claudia, Corría Fabio, Findley Seth, Almeida Alex-Alan, Costa Marcio, Motamayor Juan Carlos, Schnell Ray and Marelli Jean-Philippe Optimization of somatic embryogenesis procedure for commercial clones of *Theobroma cacao* L.

- 8-Gómez-Pompa, A., Flores, J. S. & Fernandez, M. A, 1990 The sacred cacao groves of the Maya. Latin American Antiquity
- 9- Laurent, V., Risterucci, A. M. & Lanaud, C, 1994 Genetic diversity in cocoa revealed by cDNA probes. Theoretical and Applied Genetics, Francia
- 10- Monsalve González L. E., Claudia Yanet García Rojas, Alina K. Sigarroa Rieche OBTENCIÓN DE EMBRIONES SOMÁTICOS PRIMARIOS DE *Theobroma cacao* EN CLONES DE INTERÉS REGIONAL PARA EL DEPARTAMENTO NORTE DE SANTANDER, COLOMBIA.
- 11- María Henao Ramírez, Tatiana de la Hoz Vázquez, Tatiana Marcela Ospina Osorio, Lucía Atehortúa Garcés, Aura Inés Urrea Trujillo. (SCIENTIA HORTICULTURAE) Evaluation of the potential of regeneration of different Colombian and commercial genotypes of cocoa (*Theobroma cacao* L.) via somatic embryogenesis.
- 12-R. Hernández Sampieri, C. Fernández Collado y P. Baptista, 2006 Metodología de la Investigación, México.
- 13- Salazar, Yanet Sandrea, Carmen Betancourt, Jonás Mata y Félix García. Vol. 56 – 2006. EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN CULTIVARES DE CACAO VENEZOLANOS,
- 14-Whitkus, R., De la Cruz, M. and Mota-Bravo, L, 1998 Genetic diversity and relationships of cocoa (*Theobroma cacao* L.) in southern Mexico. Theoretical and Applied Genetics

# ANEXOS

## ANEXO 1. SOLUCIONES MADRES Y REACTIVOS



a. SOLUCIONES MADRES PARA MEDIOS DE CULTIVO

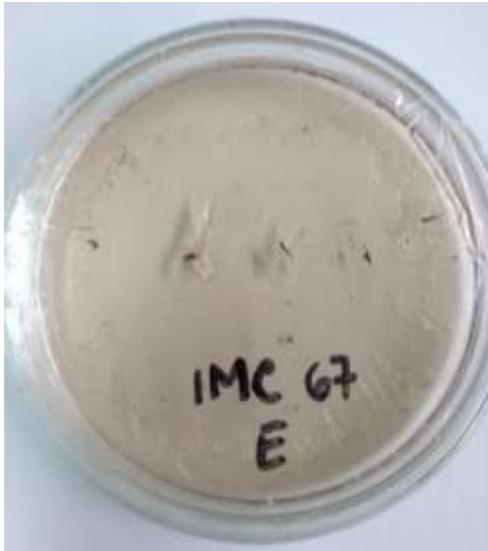


b. REACTIVOS UTILIZADOS PARA LAS SOLUCIONES MADRES

**ANEXO 2. EXPLANTES EN MEDIO DE CULTIVO ED (DESARROLLO DE EMBRIONES).**



**ANEXO 3 .CAJAS DE PETRI CON EXPLANTES EN MEDIO DE CULTIVO ED2 (DESARROLLO DE EMBRIONES 2 )**



a .Exp. de estaminodio de genotipo IMC 67



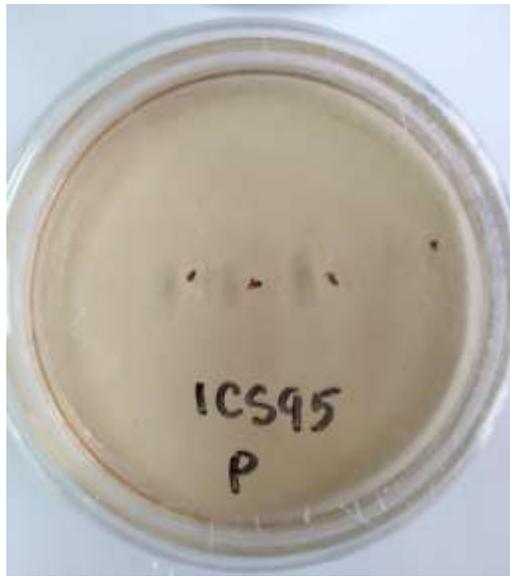
b .Exp. de petalo de genotipo CCN51



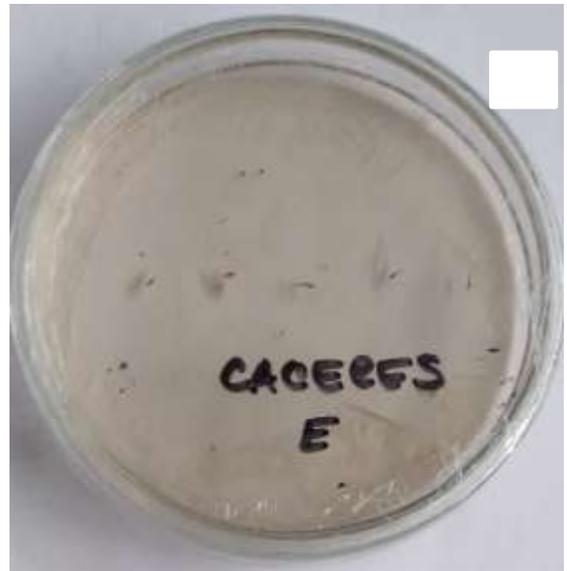
c . Exp. de estaminodio de genotipo CCN 51



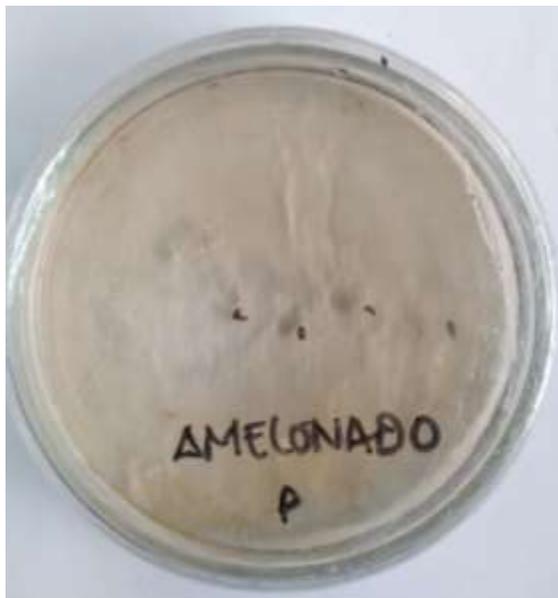
d . Exp. de estaminodio de genotipo ICS



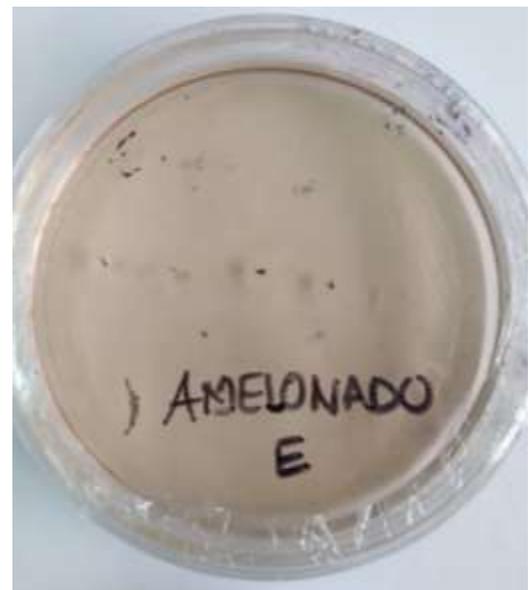
e . Exp. de petalo de genotipo ICS 95



f . Exp. de estaminodio de genotipo CACERES



g . Exp. de petalo de genotipo AMELONADO



h. Exp. de estaminodio de genotipo

AMELONADO