

Efecto de reguladores de crecimiento en la inducción de callo embriogénico en láminas foliares de cacao (*Theobroma cacao* L.) variedad CCN 51 establecidas *in vitro*

Fernando Augusto Fernández Leal

**Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano
Honduras**

Noviembre, 2018

ZAMORANO
CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

Efecto de reguladores de crecimiento en la inducción de callo embriogénico en láminas foliares de cacao (*Theobroma cacao* L.) variedad CCN 51 establecidas *in vitro*

Proyecto especial de graduación presentado como requisito parcial para optar al título de Ingeniero Agrónomo en el Grado Académico de Licenciatura

Presentado por

Fernando Augusto Fernández Leal

Zamorano, Honduras

Noviembre, 2018

Efecto de reguladores de crecimiento en la inducción de callo embriogénico en láminas foliares de cacao (*Theobroma cacao* L.) variedad CCN 51 establecidas *in vitro*

Fernando Augusto Fernández Leal

Resumen. El cacao es una planta leñosa originaria del trópico americano y domesticada en mesoamericana. Este cultivo es propagado generalmente de forma asexual mediante injerto. Las técnicas de micropropagación se usan exitosamente para producir masivamente plantas élite, pero estos protocolos tienen baja repetitividad. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de reguladores de crecimiento en la formación de callo embriogénico en explantes foliares de cacao CCN 51. Estos se establecieron en el medio de Murashige y Skoog suplementado con 1 mg/L AIA + 1 mg/L BAP; 2 mg/L 2,4-D, Thidiazuron (TDZ) a 2 mg/L, 0.2 mg/L y 0.002 mg/L y un testigo sin reguladores. La respuesta de la lámina foliar se determinó mediante la escala de Santana (1982). Se observó que no hubo respuesta de los explantes en los medios sin fitohormonas, con TDZ a 0.2 mg/L, 2.0 mg/L, y 2,4-D 2 mg/L. En contraste a los explantes en medio con TDZ 0.002mg/L en los que se observó desarrollo de callo embriogénico a partir del día 15 y logró proliferarse. El callo obtenido con la combinación de 1 mg/L AIA + 1 mg/L BAP, sufrió muerte celular a partir del día 50 sin lograr proliferarse. Siendo TDZ 0.002mg/L el mejor tratamiento para formación de callo embriogénico en láminas foliares de cacao CCN 51.

Palabras clave: Callogénesis, embriogénesis somática, hojas, Thidiazuron.

Abstract. Cocoa is a woody plant native to the American tropics and domesticated in Mesoamerica. This crop generally it is propagated asexually by grafting. Micropropagation techniques were successfully use as a massive reproduction of elite plants, but they have low repeatability. The objective of this study was evaluate the effect of growth regulators on embryogenic call formation in cocoa foliar explants CCN 51. These were established in Murashige and Skoog medium supplemented with 1 mg / L AIA + 1 mg/L BAP; 2 mg/L 2,4-D, Thidiazuron (TDZ) at 2 mg/L, 0.2 mg/L and 0.002 mg/L and a control without regulators. The response of the sheet was determined by climbing Santana (1982). It was observe that there was no response of the explants in the media without phytohormones, with TDZ at 0.2 mg/L, 2.0 mg/L, and 2.4-D 2 mg/L. In contrast to the explants in the medium with TDZ, 0.002 mg/L in which you see the development of the embryogenic call from day 15 and proliferate. The callus obtained with the combination of 1 mg/L AIA + 1 mg/L BAP, suffered cell death from day 50 without being able to proliferate. TDZ being 0.002 mg/L the best treatment for the formation of embryogenic callus in foliar sheets of cocoa CCN 51.

Key Words: Callogenesis, leaves, somatic embryogenesis, Thidiazuron.

CONTENIDO

Portadilla	i
Página de firmas.....	ii
Resumen.....	iii
Contenido.....	iv
Índice de cuadros y Figuras.....	v
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	3
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	7
4. CONCLUSIONES	13
5. RECOMENDACIONES	14
6. LITERATURA CITADA.....	15

ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

Cuadros	Página
1. Medio de cultivo basal de Murashige y Skoog modificado para el establecimiento <i>in vitro</i> de cacao (<i>Theobroma cacao</i> L.).	4
2. Escala propuesta por Santana (1982) modificada para la evaluación de la inducción de callo embriogénico en hojas de cacao CCN 51 (<i>Theobroma cacao</i> L.)	6
3. Porcentaje de láminas foliares de cacao CCN 51 con callo embriogénico como respuesta a reguladores de crecimiento	8

Figuras	Página
1. Reducción hecha al explante foliar de cacao CCN 51 previo a su establecimiento <i>in vitro</i>	4
2. Criterio para la evaluación de formación de callo embriogénico en cacao CCN 51 según Santana (1982). (A) Grado 0, (B) Grado 1, (C) Grado 2, (D) Grado 3...	6
3. Efecto de 2,4-D 2mg/L en explante foliar de cacao CCN 51 al día 60.	7
4. Efecto del AIA 1mg/L + BAP 1mg/L en explante foliar de cacao CCN 51 al día 7 (A), día 30 (B), al día 60 (C), al día 90 (D).	9
5. Efecto de Thidiazuron 0.002mg/L TDZ en explantes foliares de cacao CCN 51. (A) Día cero de establecimiento, (B) día 8, (C) día 15, (D) 30.	10
6. Respuesta del explante foliar de cacao CCN 51 a Thidiazuron 0.002 mg/L (TDZ), día uno de etapa de proliferación de callo embriogénico (A), 15 días (B), 45 días (C), 60 días (D).	11
7. Efecto de reguladores de crecimiento en la formación de callo embriogénico en cacao CCN 51 a partir de láminas foliares evaluado mediante escala donde grado 1 es el nivel mínimo de formación y grado 3 el máximo posible.	12

1. INTRODUCCIÓN

El cacao es una planta leñosa de tipo perenne nativo del trópico americano, el cual fue domesticado hace 2000 años por poblaciones mesoamericanas, responsables de cultivar un cacao de altas cualidades aromáticas denominado criollo (Motamayor *et al.* 2002). Por otra parte, se responsabiliza a los olmecas de la domesticación de este cultivo, sin embargo, los transmisores de sus funciones como alimento, medicina o hasta su uso como moneda fueron los mayas (Nisao 2007). Actualmente sus semillas son la principal materia prima para la elaboración de chocolate y derivados (Borrone *et al.* 2006).

Actualmente el cultivo de cacao ha venido tomado auge en los últimos años, teniendo crecimientos de hasta cuatro veces su valor respecto al año 1961 (FAO 2015). El precio del cacao se encuentra en constante aumento, tal como se observó en enero de 2008 donde presentó un aumento del 59% (Martinez *et al.* 2008). Actualmente se ha cotizado muy bien en el mercado internacional alcanzando un valor de \$2762/t (Anecacao 2018).

El término cultivo de tejidos o propagación *in vitro* abarca tanto el cultivo aséptico de tejidos, células y órganos. Se utiliza el término *in vitro* ya que este procedimiento se realiza en recipientes de vidrio o plástico transparentes (Abdelnour y Escalant 1994). Se basa en el principio de totipotencia, que indica que cualquier célula vegetal contiene una copia íntegra del material genético de la planta a la que pertenece. Esto sin importar su función o posición en ella, y por lo tanto tiene el potencial para regenerar una nueva planta completa (Fertl y Paul 2000).

Consecuentemente esto permite incrementar los niveles de propagación, disminuir el tiempo de multiplicación y garantizar una producción constante. De igual forma es posible multiplicar un gran número de plantas en una superficie menor, permitiendo garantizar la inocuidad y calidad de las plantas (Rojas *et al.* 2004).

Los trabajos *in vitro* realizados en cacao han sido exitosos utilizando diferentes tipos de explantes tales como cambium, embriones cigóticos, cotiledones, brotes florales y axilares (Charuvat y Kamnoon 1995). Tal fue el caso de Quimbita Guanoluisa (2011), quien logró la formación de callos de limbos foliares cultivando el tejido con 2,4-D obteniendo mejores resultados al utilizar una dosis de 2,0 mg/L de 2,4-D.

Adicionalmente, Díaz (2017) obtuvo la formación de callo a través de explantes florales de cacao variedad CCN 51 utilizando también 2,4-D. De igual forma Lázaro *et al.* (2015) obtuvieron formación de estructuras embriogénicas a partir de explantes florales a través de la utilización de fitohormonas como 2,4-D y Thidiazuron.

Las citoquininas fueron descubiertas alrededor de 1950 como los factores encargados de la proliferación celular y promotores de crecimiento de tejidos vegetales cultivados *in vitro*. En cultivos de tabaco, se demostró que un balance alto de auxinas favorecía la formación de raíces, mientras que un balance alto de citoquininas favorecía la formación de tallos (Mok y Mok 2001). Aparte de su papel como reguladores de la formación de nuevos órganos, las citoquininas también intervienen en la apertura de estomas, supresión de la dominancia apical e inhibición de la senescencia de las hojas entre otros procesos. *In vitro* la citoquinina más utilizada es la 6- Bencilaminopurina (BAP) (Azcón y Talón 1993).

El término auxina, proviene del griego “auxein” significa “crecer”. La hormona vegetal fue aislada desde maíz y hongos e identificada más tarde como ácido indol-3- acético (Thimann 1977). Las auxinas son clasificadas como un conjunto natural de hormonas vegetales que regulan muchos aspectos del desarrollo y crecimiento de plantas. La forma predominante en las plantas es el ácido indolacético (AIA) (Ludwig y Cohen 2002).

En los últimos años se han desarrollado varios compuestos sintéticos de gran impacto e importancia para su utilización en la propagación *in vitro* de plantas con gran importancia comercial. Un claro ejemplo de esto fue la utilización de fenil urea la cual con el pasar de los años ha sido esporádicamente reemplazada por la molécula de Thidiazuron (TDZ), (Murthy *et al.* 1995).

La acción del TDZ como inductor de procesos de embriogénesis somática fue señalada por (Murthy *et al.* 2016), quienes indican que esta hormona actúa como un reemplazo de las citoquininas y auxinas que son necesarias para la organogénesis y embriogénesis somática, promoviendo el crecimiento y la diferenciación del tejido del explante.

Debido a lo planteado anteriormente es fundamental encontrar un método adecuado que permita la multiplicación *in vitro* de cacao usando explantes foliares. Por lo que el objetivo de este estudio fue:

- Evaluar el efecto de reguladores de crecimiento en la formación de callo embriogénico en explantes foliares de cacao CCN 51.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación del estudio.

La presente investigación fue desarrollada en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos del Departamento de Ciencia y Producción Agropecuaria de la Escuela Agrícola Panamericana Zamorano, Honduras.

Fuentes del material vegetal.

Los explantes utilizados fueron hojas de cacao variedad CCN 51 de nueve meses de edad del huerto clonal de cacao establecido por la unidad de Frutales de la Escuela Agrícola Panamericana Zamorano, establecido en el lote denominado Vega 1, en la zona de las Vegas, Monte Redondo. Este huerto clonal proviene de los viveros de la FHIA del Centro Experimental Demostrativo de Cacao (CEDEC), La Másica, Atlántida, Honduras.

Desinfección del material vegetal.

Previo a la desinfección de los explantes se eliminó 2 cm de la parte distal y proximal de la hoja. Para la desinfección del material vegetativo se inició con un lavado con agua y jabón, posteriormente se realizó una inmersión en alcohol al 70% por 10 segundos. A continuación, se sumergieron los explantes en una solución de hipoclorito de sodio (NaClO) al 20% v/v (Ingrediente activo 4.72 %), con 2 gotas/100 mL de Tween 80[®] por 20 minutos. Transcurridos los 20 minutos los explantes fueron llevados a la cámara de flujo laminar, donde se realizó un triple lavado con agua destilada estéril con el fin de remover el NaClO residual.

Reducción y establecimiento de los explantes.

Previo al establecimiento se realizó una reducción a las hojas con ayuda de un bisturí, tomando como referencia la nervadura central, se realizó un corte dejando aproximadamente un centímetro a cada lado de la nervadura central. Posteriormente se inoculó el explante en el medio de cultivo estéril (Figura 1).



Figura 1. Reducción hecha al explante foliar de cacao CCN 51 previo a su establecimiento *in vitro*.

Medio de cultivo.

Para el establecimiento *in vitro* de los explantes foliares de cacao se utilizó el medio Murashige y Skoog (MS) modificado (Cuadro 1) agregándole fitohormonas según el tratamiento a evaluar. El medio se ajustó a un pH de 5.8 y se solidificó con Phytigel® 1.8 g/L.

Cuadro 1. Medio de cultivo basal de Murashige y Skoog modificado para el establecimiento *in vitro* de cacao (*Theobroma cacao* L.).

Componentes	Formula	Nombre	mg/L
Macroelementos	NH ₄ NO ₃	Nitrato de Amonio	1650.000
	KNO ₃	Nitrato de Potasio	1900.000
	MgSO ₄ .7H ₂ O	Sulfato de magnesio heptahidratado	370.000
	CaCl ₂ .2H ₂ O	Cloruro de calcio bihidratado	440.000
	KH ₂ PO ₄	Fosfato monobásico de potasio	170.000
Microelementos	H ₃ BO ₃	Ácido bórico	6.200
	CoCl ₂ .6H ₂ O	Cloruro de cobalto hexahidratado	0.025
	CuSO ₄ .5H ₂ O	Sulfato de cobre pentahidratado	0.025
	KI	Yoduro de potasio	0.830
	MnSO ₄ .4H ₂ O	Sulfato de Manganeso tetrahidratado	22.300
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	Molibdato de sodio bihidratado	0.250
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	Sulfato de zinc heptahidratado	8.600
	FeNa EDTA	Sal férrica sódica de ácido Etilendiaminotetraacético	50.000
Vitaminas		Inositol	100.000
		Tiamina	0.500
		Piridoxina	0.500
		Ácido Nicotínico	0.400
Carbohidrato		Sacarosa	30000.000

Fuente: Kyte 1987

Tratamientos evaluados.

Con los siguientes tratamientos se evaluó el efecto de reguladores de crecimiento en la primera fase de la embriogénesis somática que consiste en la inducción de callo embriogénico a partir de porciones de lámina foliar de cacao clon CCN 51, siguiendo las recomendaciones de Chanatasig (2004) y Quimbita Guanoluisa (2011).

Tratamiento 1: AIA 1 mg/L + BAP 1 mg/L

Tratamiento 2: 2,4-D 2.0 mg/L

Tratamiento 3: TDZ 2.0 mg/L

Tratamiento 4: TDZ 0.2 mg/L

Tratamiento 5: TDZ 0.002 mg/L

Testigo: sin fitohormonas

Todos los explantes establecidos en medios suplementados con Thidiazuron (TDZ) se cambiaron a medio sin fitohormonas al día 11 del establecimiento y los demás tratamientos se cambiaron a medio sin hormonas al día 21 y posteriormente cada 21 días se refrescó el medio.

Condiciones de incubación.

Todos los explantes crecieron bajo condiciones controladas a 24 °C con HR al 70 %, una intensidad de 2000 lux y fotoperiodos de 16 horas de luz y ocho de oscuridad con excepción del tratamiento con 2,4-D que estuvo sus primeros cinco días en oscuridad total, debido a que esta fitohormona es fotosensible.

Variables medidas.

Se evaluó la zona de inicio de la formación de callo y nivel de desarrollo por medio de la escala propuesta por Santana (1982), esto se realizó el día 7, 15, 30 y 60 tomando como referencia lo descrito en el Cuadro 2 y Figura 2.

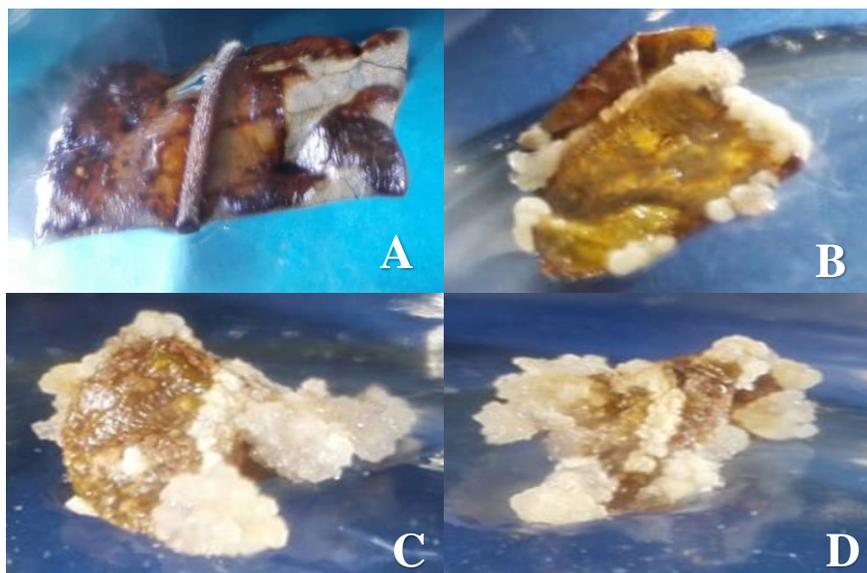


Figura 2 Criterio para la evaluación de formación de callo embriogénico en cacao CCN 51. (A) Grado 0, (B) Grado 1, (C) Grado 2, (D) Grado 3.

Cuadro 2 Escala propuesta por Santana (1982) modificada para la evaluación de la inducción de callo embriogénico en hojas de cacao CCN 51 (*Theobroma cacao* L.)

Grado de desarrollo	Descripción	Cantidad de callo en bordes del explante (%)
0	No hay formación de callo.	0
1	Ligera formación de callo (Débil proliferación en los bordes).	1- 50
2	Buena Formación de Callo: proliferación en todo el borde del explante sin formar una masa.	51-75
3	Abundante Formación de callo, Masas voluminosas en varias partes del explante.	76-100

Diseño experimental.

Se utilizó un diseño completamente al azar con cinco tratamientos y un testigo libre de fitohormonas y 50 repeticiones por tratamiento.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los explantes de cacao CCN 51 no tuvieron ninguna respuesta a los tratamientos con Thidiazuron (TDZ) 0.2 mg/L y 2.0 mg/L, no se observó cambios en tamaño o forma del explante. Es importante recalcar que estos explantes también fueron sometidos a un cambio de medio fresco sin hormonas al día 11 y refrescamiento al día 21 sin respuesta alguna. Por consecuente se concluyó que el balance en un medio de cultivo Murashige y Skoog para inducción de callo embriogénico con TDZ entre 0.2 mg/L y 2.0 mg/L, no es el adecuado para estos procesos, ya que este inhibió toda respuesta posible de láminas foliares de la variedad CCN 51.

En el tratamiento con 2,4-D al día ocho inició con cambios en la coloración del explante y al día 15 se observó cambios en el tamaño y forma. En los siguientes días no se observó una respuesta diferente respecto a los días anteriores, a pesar que inicialmente este fue incubado con cinco días de oscuridad y fue sometido tres veces a cambios de medio de cultivo (Figura 3). Diaz (2017) evaluó el tiempo y porcentaje a formación de callo en cacao CCN 51 el cual se estableció al día 26 en el 90% de los explantes. Esto no concuerda con los resultados obtenidos en este experimento, debido a que no se observó formación de callo en ninguna lamina foliar de este tratamiento.

Se comprobó que el genotipo no es el único factor limitante en la respuesta de los diferentes explantes en la propagación *in vitro*, sino también el explante. Esto porque los resultados obtenidos en este experimento no concuerdan con los obtenidos por Quimbita Guanoluisa (2011) donde utilizando 2 mg/L de 2,4-D obtuvo callo en el 100% de sus explantes florales al día 20.



Figura 3. Efecto de 2,4-D 2mg/L en explante foliar de cacao CCN 51 al día 60.

En el tratamiento con AIA 1 mg/L + BAP 1 mg/L los cambios observados en el color de las hojas se presentaron hasta el día cinco además de presentar una reducción en los niveles de oxidación en las hojas. Sin embargo, los cambios en la forma y desarrollo del explante fueron notables a partir del día 15, donde el 100% presentaron un grado de formación de

callo grado uno, donde se observó un leve aumento en el tamaño de las láminas foliares y la masa callogénica formada levemente en bordes y nervadura central. Posteriormente crecieron lentamente con escaso aumento en su masa celular, localizándose este crecimiento principalmente en la superficie de los bordes, el cual se encontró en el 100% de los explantes con un grado dos de formación de callo al día 30 del establecimiento (Figura 4).

Los explantes en el medio AIA 1 mg/L + BAP 1 mg/L desde el día 60 presentaron muerte celular en el 100% de las láminas foliares iniciando por la nervadura central, el crecimiento se detuvo a partir de este día y se observó que dieron inicio los procesos de muerte celular (Figura 4). Con esto se comprueba el efecto que genera en el medio de cultivo la interacción de AIA + BAP en el cual al ser suplementado en dosis iguales de 1 mg/L, genera un medio endógeno en láminas foliares de cacao CCN 51, el cual limitó el crecimiento y promovió la muerte celular temprana.

Cuadro 3 Porcentaje de láminas foliares de cacao CCN 51 con callo embriogénico como respuesta a reguladores de crecimiento.

Grado de formación de callo (Santana 1982)	Testigo				TDZ 0.002 mg/L Días				AIA+ BAP			
	7	15	30	60	7	15	30	60	7	15	30	60
Nulo	100	100	100	100	100	0	0	0	100	0	0	0
Grado 1	0	0	0	0	0	25	0	0	0	100	0	0
Grado 2	0	0	0	0	0	75	10	0	0	0	100	100
Grado 3	0	0	0	0	0	0	90	100	0	0	0	0

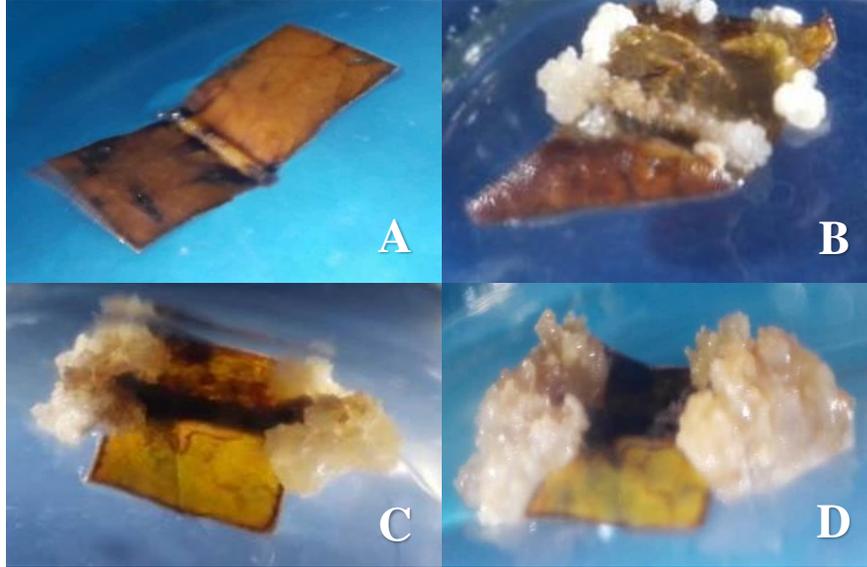


Figura 4. Efecto del AIA 1mg/L + BAP 1mg/L en explante foliar de cacao CCN 51 al día 7 (A), día 30 (B), al día 60 (C), al día 90 (D).

En el medio con Thidiazuron (TDZ) a 0.002 mg/L los cambios en el color iniciaron al día cinco de establecimiento, se observó clorosis y una tendencia a la curvatura dejando únicamente en contacto los bordes de la lámina foliar con el medio de cultivo. El inicio de la formación de pequeñas protuberancias en la nervadura central color blanco se dio desde el día 8 en el 100% de las láminas foliares, donde al día 15 del establecimiento el 25% se encontraba con formación de callo grado 1 y el 75% aceleradamente alcanzó el grado 2. Este aumento acelerado en el grado de formación de callo permitió observar la importancia del cambio a medio de cultivo sin fitohormonas que se realizó al día 11 del establecimiento en los tratamientos suplementados con TDZ.

Posteriormente, al día 30 únicamente 10% de las láminas foliares presentaron grado 2, en contraste al 90% restante el cual se encontraba en grado 3. Finalmente, el grado 3 de formación de callo se obtuvo en el 100% de las hojas establecidas en este tratamiento al día 60, los cuales ya habían iniciado la etapa de proliferación (Figura 5). La respuesta del material vegetal obtenido de TDZ 0.002 mg/L a los procesos de proliferación fue casi inmediata, debido a que, al cuarto día del cambio a medio de cultivo libre de fitohormonas, ya presentaba aumento en el desarrollo del callo y cambios a una coloración blanca.

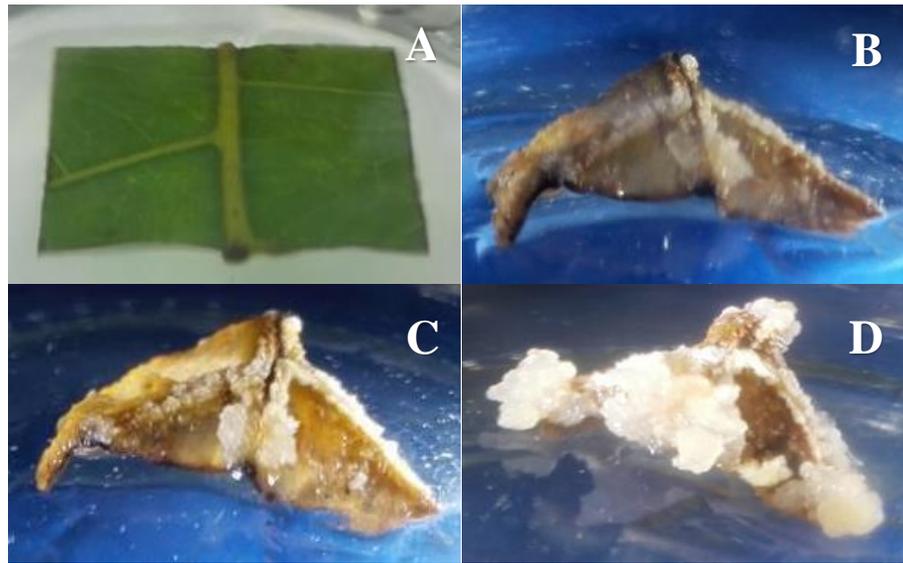


Figura 5. Efecto de Thidiazuron 0.002mg/L TDZ en explantes foliares de cacao CCN 51. (A) Día cero de establecimiento, (B) día 8, (C) día 15, (D) 30.

Proliferación de callo embriogénico.

La etapa de proliferación de los callos se realizó en el estado de formación de callo 3 en el cual se encontraron el 100% de las láminas foliares al día 52 del establecimiento. Donde se observó que la masa celular con características embriogénicas cinco días después de realizado el cambio de medio, pasó de blanco brillante a una coloración cremosa suave. Además, se observó que a partir del proceso de división se promovió el aumento en la cantidad y tamaño de las estructuras callogénicas. Consecuentemente se repitió el proceso de refrescamiento de medio y división de los callos cada 21 días. Donde nuevamente se obtuvo la misma respuesta, un aumento de estructuras globulares de color cristalino y crecimiento de la masa callogénica con potencial embriogénico.

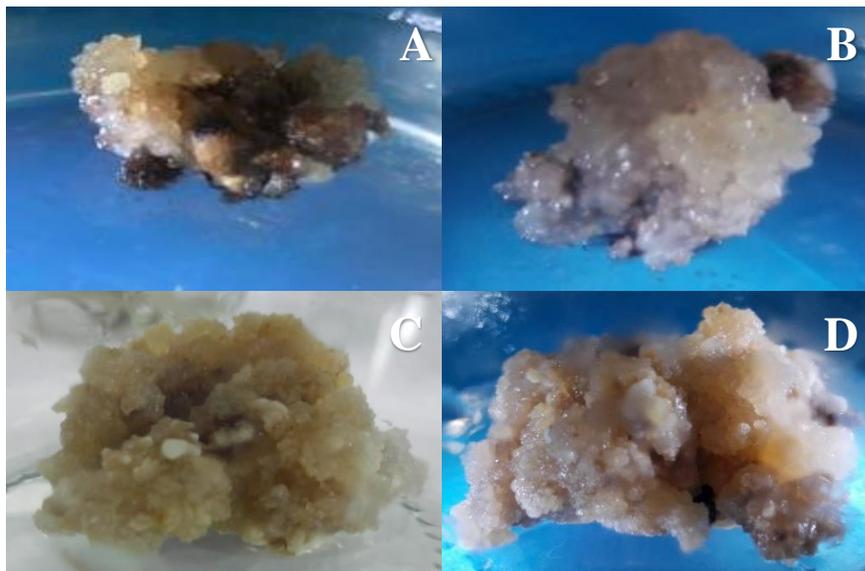


Figura 6. Respuesta del explante foliar de cacao CCN 51 a Thidiazuron 0.002 mg/L (TDZ), día uno de etapa de proliferación de callo embriogénico (A), 15 días (B), 45 días (C), 60 días (D).

Los explantes foliares de cacao CCN 51 en un medio con Thidiazuron (TDZ) 0.002 mg/L tienen un crecimiento y desarrollo más acelerado, en contraste al uso de AIA 1mg/L + BAP 1mg/L como fitohormonas. Esto se debe a la respuesta al TDZ 0.002 mg/L el cual a esta dosis promovió la división celular y el aumento de tamaño permitiendo llegar a obtener al día 60 del establecimiento múltiples masas callogénicas en grado 3 (Figura 7). Esto respalda lo estipulado por Li *et al.* (1998), “el Thidiazuron en algunos medios ha mostrado su efecto al incrementar el tamaño y peso fresco de diferentes genotipos de cacao”.

Es importante mencionar que se ha comprobado que los procesos de embriogénesis somática primaria en el clon de cacao CCN 51 por medio de explantes foliares son posibles con TDZ 0.002 mg/L, lo cual confirma que todo explante tiene la habilidad de producir o formar callos *in vitro* (Litz y Jarret 1991). Sin embargo, es importante evaluar y determinar si TDZ en concentraciones superiores a 0.002 mg/L en el medio de cultivo inhibe los procesos de formación de callo embriogénico en cacao CCN 51 a partir de hojas.

Los explantes foliares de cacao clon CCN 51 no son capaces de generar callo en un medio MS con ausencia de hormonas, ya que se observó que naturalmente no hubo forma de inducir o iniciar los procesos de callogénesis. Por consiguiente para la primera etapa de embriogénesis somática en el clon de cacao CCN 51 es fundamental el uso de fitohormonas para la formación y desarrollo de callo en láminas foliares. Además de ser dependiente del uso de fitohormonas la expresión del potencial embriogénico de los explantes foliares de CCN 51 está limitado a fitohormonas específicas y un correcto balance de las mismas en el medio de cultivo.

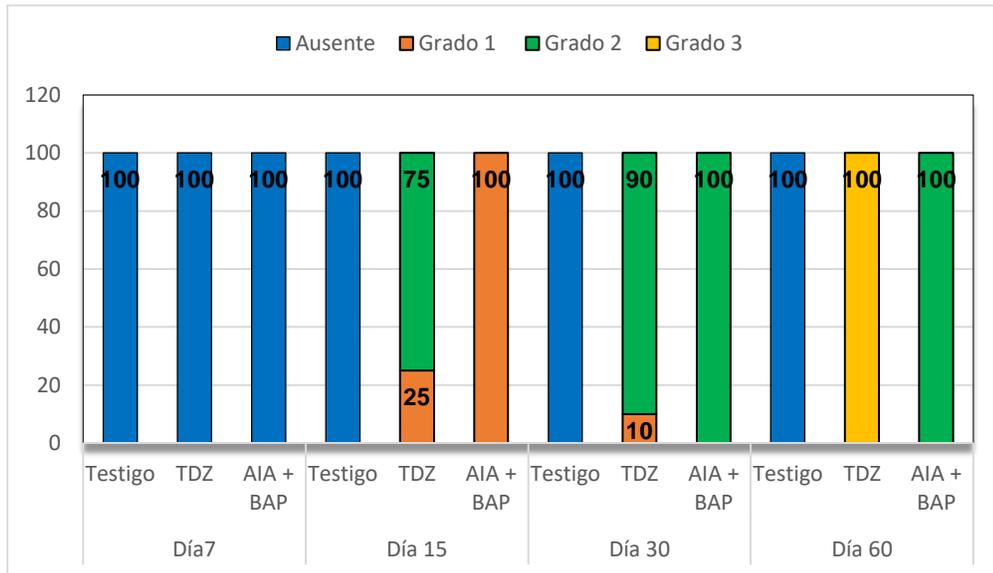


Figura 7. Efecto de reguladores de crecimiento en la formación de callo embriogénico en cacao CCN 51 a partir de láminas foliares evaluado mediante escala donde grado 1 es el nivel mínimo de formación y grado 3 el máximo posible.

4. CONCLUSIONES

- El potencial embriogénico de la variedad CCN 51 es determinado por el tipo de hormona utilizada.
- Los explantes foliares de cacao CCN 51 producen callo embriogénico en medio MS suplementado con Thidiazuron 0.002 mg/L.

5. RECOMENDACIONES

- Repetir el experimento probando diferentes dosis de TDZ en rangos entre 0.002-0.0002 mg/L.
- Replicar las pruebas en diferentes variedades de este cultivo con las que cuenta Zamorano.
- Continuar con la investigación para lograr obtener embriones somáticos a partir de láminas foliar de cacao clon CCN 51.

6. LITERATURA CITADA

- Anecacao. 2018. Precios del cacao en el mercado internacional [Internet]. Ecuador: Anecacao; [Consultado 2018 May 12]. <http://www.anecacao.com/index.php/es/estadisticas/precios.html>.
- Abdelnour E, Escalant V. (1994). Conceptos Básicos del cultivo de tejidos vegetales; 1ra ed Turriaiba (Costa Rica): CATIE [Consultado 2018 May 12].
- Azcon BJ, Talon M. 1993. Fundamentos de Fisiología Vegetal. 2da ed Madrid (España): McGraw Hill. 669 p.
- Borrone J, James W, Brown S, Kuhn D, Motamayor J, Raymond J. 2006. Microsatellite markers developed from *Theobroma cacao* L. expressed sequence tags. Willey. 7 (2): 236-239. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2006.01561.x>.
- Chanatasig V. 2004. Inducción de la embriogénesis somática en clones superiores de cacao (*Theobroma cacao* L.), con resistencia a enfermedades fungosas [Tesis]. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza CATIE-Costa Rica. 97 P
- Charuvat C, Kamnoon K. 1995. Somatic embryo formation from cotyledonary culture of *Theobroma cacao* L. Haad-Yai Songlela 90112 Thailand. Department of Biology, Faculty of Science, Prince of Songlela University.
- Díaz M. 2017. Implementación de un protocolo para la obtención de callos de cacao CCN 51 (*Theobroma cacao* L.) con interés comercial [Tesis]. Universidad de las Américas, Quito-Ecuador. 70 p.
- FAO. 2015. Chocolate: facts and figures. [Internet]. [Consultado 2018 May 12]. <http://www.fao.org/resources/infographics/infographics-details/en/c/277756/>.
- Ferl R, Paul A. 2000. Genome organization and expression. In: Buchanan B, Grissem W, Jones R. Biochemistry and Molecular Biology of Plants. USA: American Society of Plant Physiologists. p. 312-357.
- Kyte L. 1987. Plants from test tubes an introduction to micropropagation. 3a ed. Portland, Oregon: Colorcraft. 239 p.

- Lázaro AA, Morales AA, Carbonell SL, Hernandez MF. 2015. Embriogénesis somática secundaria en el genotipo de cacao (*Theobroma cacao L*) Inipaf 1 y su descripción histológica. Nova Scientia. [Consultado 2018 ago 20]. 14(7):1-20. <http://www.scielo.org.mx/pdf/ns/v7n14/2007-0705-ns-7-14-00398.pdf>.
- Li Z, Traore A, Maximova S, Guiltinan M. 1998. Somatic embryogenesis and plant regeneration from floral explants of (*Theobroma cacao L.*) using Thidiazuron. Springer. [Consultado 2018 ago 21]. 34(4): 293-299. <https://doi.org/10.1007/BF02822737>
- Litz R, Jarret R.1991. Regeneración de Plantas en el Cultivo de Tejidos: Embriogénesis Somática y Organogénesis. In: CIAT, Roca W, Mroginski eds. Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones. Colombia. p 111-120.
- Ludwig M, Cohen J. 2002. Identification and quantification of three active auxins in different tissues of *Tropaeolum majus*. Physiologia Plantarum. Ncbi [Consultado 2018 ago 21]; 115(2): 320–329. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12060252>.
- Martínez A, Fonseca A, Berlío G. 2008. Diagnóstico sobre la situación actual del Cacao (*Theobroma cacao L.*) y perspectivas sobre la producción de Cacao fino de aroma en Honduras. [Tesis] Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano-Honduras. 61 p.
- Mok D, Mok M. 2001. Cytokinin Metabolism and Action. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology. USA: Oregon state university vol. 52:89-118.
- Motamayor J, Risterucci A, Lopez P, Ortiz C, Moreno A, Lanaud C. 2002. Cacao domestication I: the origin of the cacao cultivated by the Mayas. NCBI. [Consultado 2018 ago 21]: 89(5):380-386. <https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6800156>
- Murthy BN, Murch J, Praveen K, 1995. Thidiazuron-induced somatic embryogenesis in intact seedlings of peanut (*Arachis hypogaea*): Endogenous growth regulator levels and significance of cotyledons. Wiley.[Citado 2018 ago 21]. 94(2): 268-276. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1995.tb05311.x>.
- Murthy S, Murch J, Saxena K. 2016. Thidiazuron: A potent regulator of *in vitro* plant morphogenesis. Scirp. [Citado 2018 ago 21]: 7(3): 267-275. <http://dx.doi.org/10.1007/BF02822732>.
- Nisao O. 2007. El cacao. Conabio [Consultado 2018 ago. 21]: 72: 1-5. <https://www.biodiversidad.gob.mx/Biodiversitas/Articulos/biodiv72art1.pdf>.
- Quimbita Guanoluisa B. 2011. Efecto de la concentración de 2,4-D y el tipo de explante en la formación de callos embriogénicos en el cultivo *in vitro* de cacao (*Theobroma cacao L*) [Tesis]. Unidad Académica de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales. Universidad de Granma. Cuba. 58 p.

- Rojas G, Garcia J, Alarcon R. 2004. Propagación asexual de plantas. Ed Marzo 2004 (Colombia): Editorial Produmedios; [Consultado 2018 ago 21]. <https://ecojardines.files.wordpress.com/2013/12/propagacinasexualdeplantas.pdf>.
- Santana N. 1982. Determinación de un medio adecuado para la obtención de callos en variedades de caña de azúcar (*Saccharum* sp.) *in vitro*. Cultivos Tropicales 4 (3): 35-40.
- Thimann K. 1977. Hormone action in the whole life of plants. Amherst (USA): University of Massachusetts Press. 448 p.