

**Evaluación de dos medios de cultivo para la formación de callo en pétalos y estaminoides de cacao (*Theobroma cacao* L.) cultivados *in vitro***

**Sebastian Hidalgo Echeverria**

**Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano  
Honduras**

Noviembre, 2019

ZAMORANO  
CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

**Evaluación de dos medios de cultivo para la  
formación de callo en pétalos y estaminoides  
de cacao (*Theobroma cacao* L.) cultivados *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

**Sebastian Hidalgo Echeverria**

**Zamorano, Honduras**  
Noviembre, 2019

## **Evaluación de dos medios de cultivo para la formación de callo en pétalos y estaminoides de cacao (*Theobroma cacao* L.) cultivados *in vitro***

**Sebastian Hidalgo Echeverria**

**Resumen.** El cacao (*Theobroma cacao* L.) es originario de América del sur, pertenece a la familia de las Malvaceas. En cultivo de tejidos el uso de fitohormonas en el medio permite controlar procesos de crecimiento y desarrollo en los explantes. El objetivo de este estudio fue evaluar la respuesta en la formación de callo en pétalos y estaminoides de cacao en los medios de cultivo Murashige (MS) y Skoog y Driver-Kuniyuki Walnut, (DKW) este modificado con los macroelementos MS y ambos suplementados con 2,4-D 2 mg/L y Thidiazuron 0.025 mg/L. Se evaluó la fenolización de los pétalos y estaminoides a los siete días después de siembra, y el crecimiento de estructuras callogénicas sobre estaminoides y pétalos de cacao variedades ISC-1 y Cauca 39. No se observó fenolización de los explantes de ambas variedades. En los estaminoides se obtuvo el crecimiento de estructuras callogénicas en ambos medios. En la variedad ISC-1, el medio en el que creció un mayor porcentaje de masa callogénica sobre los estaminoides fue el DKW suplementado con 2,4-D 2 mg/L y Thidiazuron 0.025 mg/L. En los pétalos de la variedad ISC-1 se observó la formación de estructuras con potencial embriogénico. La formación de callo en cacao utilizando estaminoides es influenciada por el medio de cultivo y los reguladores de crecimiento utilizados.

**Palabras clave:** 2,4-D, Callogénesis, Driver-Kuniyuki Walnut, Murashige y Skoog, Thidiazuron.

**Abstract.** (*Theobroma cacao* L.) is native to South America, belonging to the family Malvaceae. In tissue culture *in vitro* the use of phytohormones in plant culture medium allows to control growth and development processes in explants. The objective of this study was to evaluate the response in the formation of callus in cocoa petals and staminoids in the culture media Murashige and Skoog (MS) and Driver-Kuniyuki Walnut, (DKW), the latter modified with the MS macroelements and both supplemented with 2,4-D 2 mg / L and Thidiazuron 0.025 mg / L. The phenolization of the petals and the growth of calli structures in staminoids of the varieties ISC-1 and Cauca 39 were evaluated using scale. No phenolization of the explants was observed. In the staminoids the growth of callogenic structures in both media was obtained. In the ISC-1 variety the medium in which a greater percentage of calli mass on the staminoids grew was the DKW supplemented with 2.4 -D 2 mg / L and Thidiazuron 0.025 mg / L. In the petals of the ISC-1 variety, the formation of structures with embryogenic potential was observed. The formation of callus in cocoa using staminoids is influenced by the culture medium and the growth regulators.

**Key words:** 2,4-D, Calli formation, Driver-Kuniyuki Walnut, Murashige and Skoog, Thidiazuron

## CONTENIDO

Portadilla .....	i
Página de firmas .....	ii
Resumen .....	iii
Contenido .....	iv
Índice de cuadros y figuras .....	v
<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>2. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>3</b>
<b>3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>8</b>
<b>4. CONCLUSIONES .....</b>	<b>14</b>
<b>5. RECOMENDACIONES .....</b>	<b>15</b>
<b>6. LITERATURA CITADA .....</b>	<b>16</b>

## ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

Cuadros	Página
1. Medio de cultivo basal de Murashige y Skoog modificado para la inducción a callogénesis en estaminoides y pétalos de cacao ( <i>Theobroma cacao</i> L.) .....	5
2. Medio de cultivo basal Driver Kuniyuki Walnut (DKW), modificado con macroelementos de Murashige y Skoog (MS) para la inducción de callogénesis en cacao ( <i>Theobroma cacao</i> L.) .....	6
3. Desarrollo de callo en pétalos y estaminoides de cacao variedad ICS-1 en medios de cultivo DKW y MS al día 49 después de establecidos <i>in vitro</i> ....	9
4. Desarrollo de callo en pétalos y estaminoides de cacao variedad Cauca 39 en medios de cultivo DKW y MS al día 49 después de establecidos <i>in vitro</i> .....	12
Figuras	Página
1. Partes del botón floral de cacao ( <i>Theobroma cacao</i> L.) .....	3
2. Botón floral de cacao ( <i>Theobroma cacao</i> L.) .....	4
3. Establecimiento de estaminoides y pétalos de cacao ( <i>Theobroma cacao</i> L.) <i>in vitro</i> .....	4
4. Escala de formación de callo sobre estaminoides de cacao .....	7
5. Bordes de pétalos de ( <i>Theobroma cacao</i> L.) variedades Cauca 39, e ICS-1 levemente fenolizados al día tres después de siembra .....	8
6. Aparición de estructuras callogénicas en estaminoides de cacao variedad ICS-1 al día siete después de siembra .....	9
7. Desarrollo de estructuras callogénicas en estaminoides y pétalos de cacao variedad ICS-1 al día 14 después de siembra .....	10
8. Desarrollo de callo en estaminoides de cacao variedad ICS-1 al día 28 después de siembra .....	10
9. Desarrollo de callo con potencial embriogénico en pétalos de cacao variedad ICS-1 .....	11
10. Formación de callo en base de estaminoides de cacao variedad Cauca 39 al día siete después de siembra .....	12
11. Crecimiento de estructuras callogénicas en pétalos y estaminoides de cacao variedad Cauca 39 al día 14 después de siembra .....	12
12. Desarrollo de callo en estaminoides de cacao variedad Cauca 39 al día 28 después de siembra.....	13

## 1. INTRODUCCIÓN

El cacao (*Theobroma cacao* L.) es originario de América del sur, pertenece a la familia de las Malvaceas. El género *Theobroma* comprende alrededor de 22 especies, todas originarias de los bosques húmedos tropicales de la América Ecuatorial (Mossu 1990). De acuerdo con Motamayor *et al.* (2002), el cacao fue cultivado por los Mayas, quienes lo utilizaban como moneda y símbolo de poder en su cultura hace más de 15,000 años, es en este tiempo donde se origina el cacao criollo en América Central, el cual evolucionó de manera independiente en la cuenca del Amazonas (Zarrillo *et al.* 2018).

Luego de su propagación y domesticación en el continente americano se originan dos variedades importantes, las cuales son la base genética de la mayoría de cultivares, estas son el forastero y el criollo (ANACAFE 2004). El forastero es de menor calidad en relación con el sabor y aroma, pero lo compensa con rendimiento y contenido de grasa, esta grasa es un subproducto importante en la elaboración de productos farmacéuticos, el árbol de esta variedad es vigoroso, con tendencia a la ramificación lateral, mientras que el criollo es de calidad más fina, lo cual caracteriza su sabor y exquisito aroma, tiene un tronco erecto con poca ramificación lateral y tiende a un crecimiento vertical (ANACAFE 2004).

La propagación convencional en cacao se realiza mediante semillas, este es un método poco recomendado, ya que las plantaciones provenientes de semilla presentan gran variedad de características entre sí, lo cual es problema, ya que influye en los niveles de producción de la plantación (Dubón y Sánchez 2016). Es por eso que la propagación por injertos ha tenido éxito y demanda a través del tiempo, porque mediante esta técnica se pueden reproducir las características deseadas del árbol donde se obtuvieron las yemas y tener plantaciones uniformes (Palencia y Mejía 2000).

Con el fin de obtener clones de cultivares de alta calidad y de mejor producción, la demanda de plántulas de cacao producidas a través de técnicas de cultivo de tejidos ha aumentado, debido a que esta es una herramienta que brinda excelentes resultados sin utilizar mucho espacio y material vegetativo. Los explantes establecidos *in vitro* deben estar en condiciones controladas, tales como medio de cultivo, asepsia, humedad relativa, temperatura y luz (Dublin 1991).

El cultivo de tejidos se basa en la capacidad de regeneración o totipotencia que tienen las plantas, la cual indica que cualquier célula vegetal puede dar origen a una planta completa ya que contiene una copia idéntica del material genético de la planta a la que pertenece, esto sin importar el lugar de procedencia o la forma en la que se plante en el medio (Ferl y Paul 2000). Así con las técnicas *in vitro* se provoca la reanudación de la mitosis y favorece la

desdiferenciación celular la cual genera la potencialidad que tiene la célula de expresar todo su genoma (Portillo y Santacruz- Ruvalcaba 2004).

En cultivo de tejidos el uso de fitohormonas en medio de cultivo permite controlar procesos de crecimiento y desarrollo en los explantes. Estas pueden ser de origen natural o sintético (Abdelnour y Escalant 1994). Las citoquininas son consideradas derivadas de adeninas y purinas debido a su forma estructural, tienen como función inhibir el crecimiento de la raíz principal y estimular la división celular de los tejidos, son las encargadas de la aparición de floración (Quilambaqui Reinoso 2003), y en altas concentraciones en el medio de cultivo influyen en la formación de yemas múltiples (García *et al.* 2008).

Las auxinas fueron las primeras fitohormonas en ser identificadas, y precisamente el ácido indol acético (AIA), conocido como la principal auxina endógena en la mayoría de las plantas (Torres Cordero 2015). Estas tienen como función regular el crecimiento y desarrollo de las plantas, mediante el alargamiento radicular, crecimiento de hojas y floración. Estas se localizan en altas concentraciones en las partes meristemáticas de las plantas donde son sintetizadas en el ápice del tallo. También existen auxinas sintéticas, como el ácido indolacético y el ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D), este último usado para la inducción a callogénesis *in vitro* (Ludwig y Cohen 2002).

Se han desarrollado compuestos sintéticos de gran importancia para la propagación *in vitro*, ya que tienen efectos de reguladores de crecimientos, ejemplo de estos compuestos es el Thidiazuron (TDZ). La acción que tiene este compuesto en la embriogénesis somática fue descubierta por Murthy *et al.* (2016) quienes señalan que la hormona puede actuar como reemplazo de auxinas y citoquininas en procesos de organogénesis y embriogénesis somática.

En cultivo *in vitro* de cacao los experimentos que se han realizado, los explantes más utilizados han sido los del botón floral (pétalos y estaminoides) (López Báez *et al.* 2001). Estos experimentos se han hecho para dar paso a la generación de plantas mediante embriogénesis somática, utilizando ácido indol butírico (Urrea Trujillo *et al.* 2011), probando diferentes concentraciones de fuentes de carbono tales como glucosa y sacarosa (Chanatásig Vaca 2004) y 2,4-D para la inducción a formación de callo (Calderón y Montes 2017).

El objetivo de esta investigación fue: Evaluar el efecto de dos medios de cultivo en la inducción a callo embriogénico en pétalos y estaminoides de cacao variedades ICS-1 y Cauca 39 cultivados *in vitro*.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### Ubicación.

La investigación se realizó en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales, del Departamento de Ciencia y Producción Agropecuaria de la Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano, Honduras.

### Material Vegetal.

Se utilizaron pétalos y estaminoides de cacao (*Theobroma cacao* L.) variedades Cauca 39, e ICS-1, los cuales fueron obtenidos de botones florales (Figura 1). Los botones se obtuvieron de plantas jóvenes del huerto clonal de cacao, establecido por la unidad de Ornamentales de la Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano. Las plantas de este huerto provienen de los viveros experimentales de la Fundación Hondureña de Investigación Agrícola (FHIA), del Centro Experimental Demostrativo de Cacao (CEDEC), La Másica, Atlántida, Honduras.

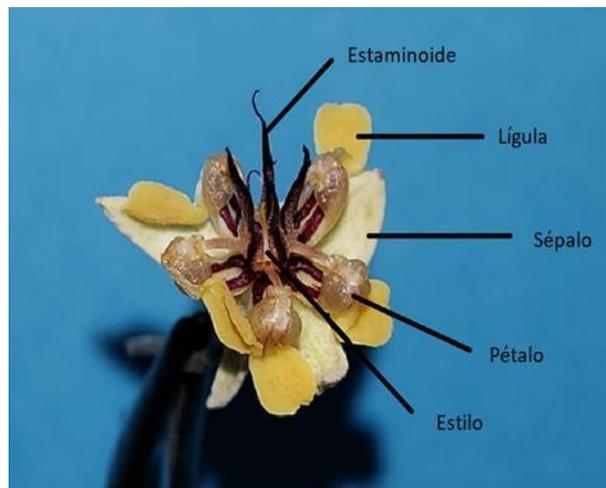


Figura 1. Partes del botón floral de cacao (*Theobroma cacao* L.)

### Preparación y desinfección de explantes.

El proceso para la desinfección de los botones florales inició con lavado con agua potable, la desinfección superficial se realizó durante 10 minutos en NaOCl al 25% volumen/volumen (Cloro comercial con 4.72% ingrediente activo) + Tween<sup>TM</sup>80, y a continuación se enjuagaron con agua estéril tres veces. Los botones se colocaron en plato

Petri estéril, el cual sirvió de soporte, para la disección de los explantes se utilizó bisturí y pinzas estériles.

### **Establecimiento *in vitro* de los explantes.**

El proceso consistió en tomar un botón individual con ayuda de las pinzas, y luego empezar la eliminación de los sépalos con ayuda del bisturí, se hizo un corte en la base del botón para facilitar la extracción de los explantes, luego de realizar el corte se procedió a separar los pétalos y los estaminoides (Figura 2). Los explantes se colocaron en el medio de cultivo estéril, cinco pétalos a la derecha del plato, y cinco estaminoides del lado izquierdo (Figura 3).

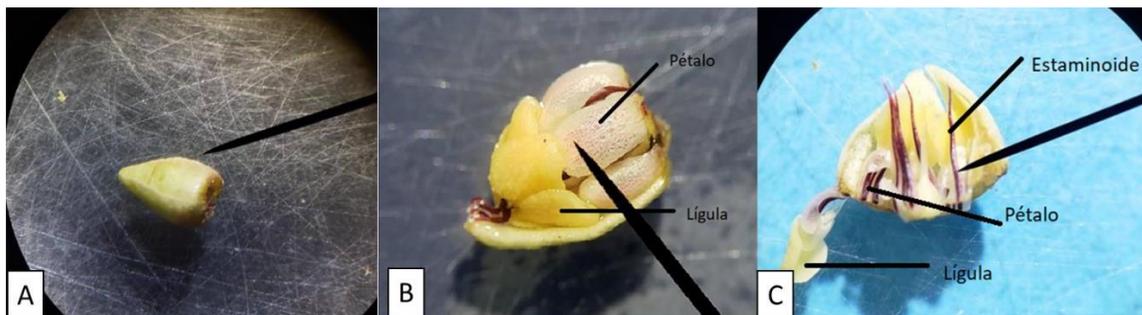


Figura 2. Botón floral de cacao (*Theobroma cacao* L.). A) Botón floral con sépalos intactos B). Botón floral de cacao con pétalos y lígulas expuestos. C) Separación de pétalos, estaminoides y lígulas ubicados dentro del botón floral.



Figura 3. Establecimiento de estaminoides y pétalos de cacao (*Theobroma cacao* L.) *in vitro*.

### **Medio de cultivo.**

Se evaluaron los medios Murashige y Skoog (MS) (Cuadro 1) y Driver-Kuniyuki Walnut (DKW) al que se modificó con los macroelementos MS y se sustituyó Glutamina por L-Aspargina (Cuadro 2). Ambos medios fueron ajustados a un pH de 5.8 con KOH y HCl. Para la solidificación de los medios se utilizó Phytigel® (1.8 g/L). El medio se esterilizó en

el autoclave a 121 °C y 1kg/cm<sup>2</sup>, durante 20 minutos. Se colocó 30 mL de medio de cultivo por plato Petri.

Cuadro 1. Medio de cultivo basal de Murashige y Skoog modificado para la inducción a callogénesis en estaminoides y pétalos de cacao (*Theobroma cacao* L.).

Componentes	Fórmula	Nombre común	mg/L
<b>Macroelementos</b>	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	Nitrato de amonio	1650.000
	KNO <sub>3</sub>	Nitrato de potasio	1900.000
	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	Sulfato de magnesio heptahidratado	370.000
	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	Cloruro de calcio bihidratado	440.000
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Fosfato monobásico de potasio	170.000
<b>Microelementos</b>	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	Ácido bórico	6.200
	CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	Cloruro de cobalto hexahidratado	0.025
	CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	Sulfato de cobre pentahidratado	0.025
	KI	Yoduro de potasio	0.830
	MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	Sulfato de manganeso tetrahidratado	22.300
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	Molibdato de sodio bihidratado	0.250
	ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	Sulfato de zinc heptahidratado	8.600
	FeNaEDTA	Etilendiaminotetraacético	50.000
<b>Componentes orgánicos</b>		Inositol	100.000
		Tiamina	2.000
		Ácido nicotínico	1.000
		Glicina	2.000
		2,4-D	2.000
		TDZ	0.025
		L-Asparagina	250.000
	Glucosa	20000.000	

Fuente: Calderón y Montes 2017

Cuadro 2. Medio de cultivo basal Driver-Kuniyuki Walnut (DKW), modificado con los macroelementos de Murashige y Skoog (MS) para la inducción a callogénesis en cacao (*Theobroma cacao* L.).

Componentes	Fórmula	Nombre común	mg/L
<b>Macroelementos MS</b>	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	Nitrato de amonio	1650.000
	KNO <sub>3</sub>	Nitrato de potasio	1900.000
	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	Sulfato de magnesio heptahidratado	370.000
	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	Cloruro de calcio bihidratado	440.000
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Fosfato monobásico de potasio	170.000
<b>Microelementos</b>	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	Ácido Bórico	4.800
	MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	Sulfato de magnesio tetrahidratado	33.500
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	Molibdato de sodio bihidratado	0.390
	CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	Sulfato de cobre pentahidratado	0.250
	Na <sub>2</sub> EDTA	Sal bisodica de Ácido Etilendiaminotetraacético	45.400
	FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	Sulfato de hierro heptahidratado	33.800
	NiSO <sub>4</sub> .6H <sub>2</sub> O	Sulfato de nickel hexahidratado	0.005
	Zn(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	Nitrato de zinc hexahidratado	17.000
<b>Componentes orgánicos</b>		Mioniositol	100.000
		Tiamina	2.000
		Acido Nicotínico	1.000
		Glicina	2.000
		2,4-D	2.000
		TDZ	0.025
		L-Asparagina	250.000
	Glucosa	20000.000	

Fuente: Chanatásig Vaca 2004

### **Incubación.**

Los cultivos pasaron 49 días en el cuarto de crecimiento en oscuridad completa, a 24 °C y 70% de humedad relativa.

### **Variables evaluadas.**

Las variables medidas durante el experimento fueron fenolización, la cual consistió en observar el cambio en la coloración del explante a los siete días después del establecimiento; y el crecimiento del callo embriogénico en los estaminoides. Se elaboró una escala para medir este crecimiento (Figura 4), esta con el fin determinar el porcentaje de callo que creció a cada siete días. Los explantes fueron observados durante 49 días.

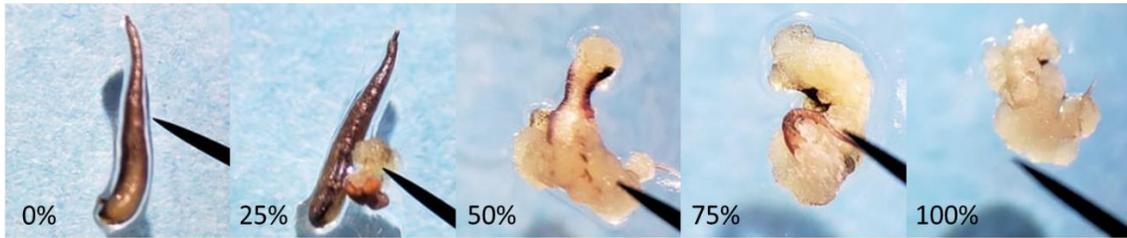


Figura 4. Escala de formación de callo sobre estaminoides de cacao.

**Diseño experimental.**

Se utilizó un diseño completamente al azar. Para cada variedad se evaluó dos medios de cultivo, con 20 repeticiones por tratamiento.

**Análisis estadístico.**

Se realizó para cada variedad una prueba t de Student con nivel de significancia ( $P \leq 0.05$ ), utilizando el paquete estadístico Infostat<sup>®</sup>.

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### **Fenolización.**

La fenolización u oxidación de los fenoles que oxidan los explantes después de ser cortados, es un proceso el cual influye, en combinación con la edad del explante, en la rediferenciación de los tejidos (Narváez y González 1983). La fenolización en los explantes durante los primeros siete días fue diferente para cada explante. Los pétalos de ambas variedades fueron los que más cambios mostraron (Figura 5), empezando el cambio de coloración café oscuro en la base durante los primeros dos días después de siembra, luego se expandió a los bordes del explante. En los estaminoides de ambas variedades no se observó ningún cambio en su tonalidad durante los primeros siete días.

Los exudados de los explantes no alcanzaron el medio de cultivo durante el tiempo del experimento. La fenolización no es un factor que afecte a los explantes a partir de pétalos o estaminoides de cacao de las variedades ICS-1 y Cauca 39.

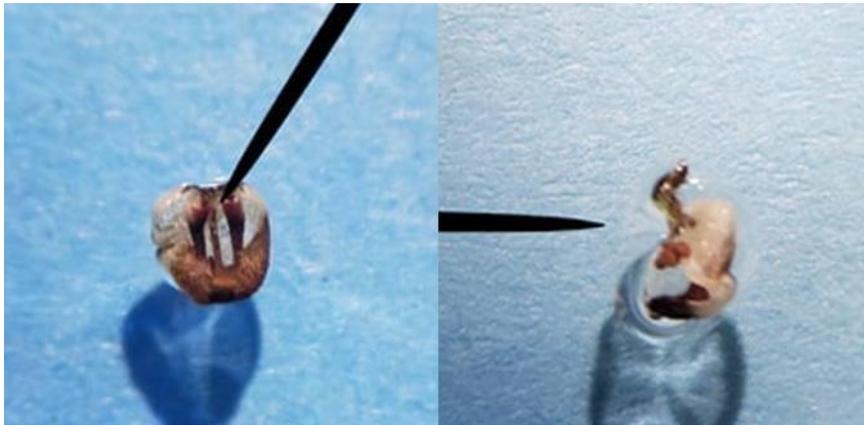


Figura 5. Bordes de pétalos de *Theobroma cacao* L. variedades Cauca 39, e ICS-1 levemente fenolizados al día tres después de establecimiento.

#### **Formación de estructuras callogénicas.**

##### **Variedad ICS-1.**

Los explantes de ICS-1 desarrollaron estructuras callogénicas compactas de color amarillo (Figura 6). La aparición de las primeras estructuras callogénicas ocurrió el día siete después de siembra, ambos medios indujeron la formación de callo. En los explantes de pétalos no se observó formación de callo.

Calderón y Montes (2017) registraron los mismos resultados al día 15 después de siembra, utilizando diferentes concentraciones de glucosa y 2,4-D. Después de 14 días de siembra en los explantes de estaminoides se incrementó la masa callogénica. En el medio DKW las estructuras callogénicas crecieron sobre toda la superficie del estaminoide (Figura 7).

Después de 28 días de siembra los estaminoides de la variedad ICS-1 formaron una mayor masa de callo en ellos, este crecimiento incrementó en las áreas del explante que tuvieron mayor contacto con el medio de cultivo (Figura 8), el desarrollo de callo fue homogéneo de coloración blancuzca y transparente, cubriéndolo parcialmente. Al día 49 de la investigación la mayoría de los estaminoides de ICS-1 formaron callo sobre su superficie, el medio DKW fue el que mejor indujo esta formación (Cuadro 3). Los resultados observados concuerdan con lo mencionado por Li *et al.* (1998) quienes indican que la suplementación de TDZ en los medios de cultivo influye sobre la regeneración de embriones somáticos a partir de botones florales.

**Cuadro 3. Desarrollo de callo en pétalos y estaminoides de cacao variedad ICS-1 en medios de cultivo DKW y MS al día 49 después de establecidos *in vitro*.**

Medio de cultivo	n	Formación de callo (%)	
		Pétalo	Estaminoide
Driver-Kuniyuki Walnut	20	0	51.25 <sup>‡</sup>
Murashige y Skoog	20	0	38.97
Valor t			1.96
Probabilidad			0.0463

<sup>‡</sup> Significativo, según la prueba t de student ( $P \leq 0.05$ ).

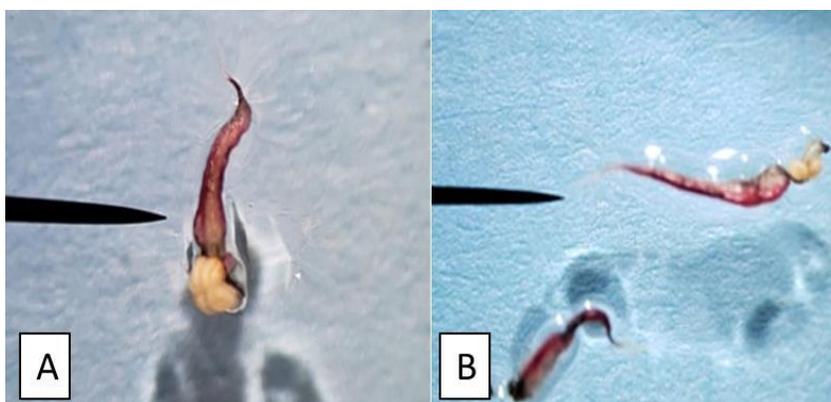


Figura 6. Aparición de estructuras callogénicas en estaminoides de cacao variedad ICS-1 al día siete después de siembra. A) Callo formado en medio DKW. B) Formación de callo en medio MS.

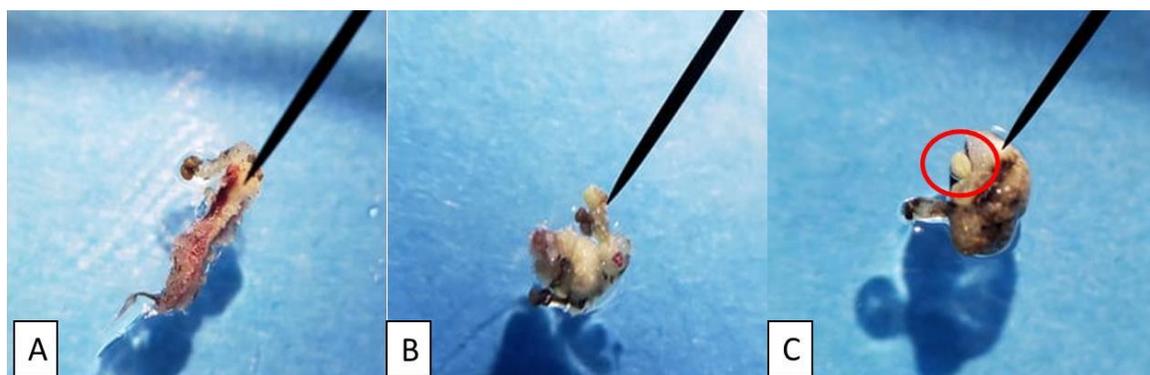


Figura 7. Desarrollo de estructuras calogénicas en estaminoides y pétalos de cacao variedad ICS-1 al día 14 después de siembra. A) y B) Estaminoide cubierto de callo en medio DKW. C) Formación de callo en pétalo de cacao en medio MS.

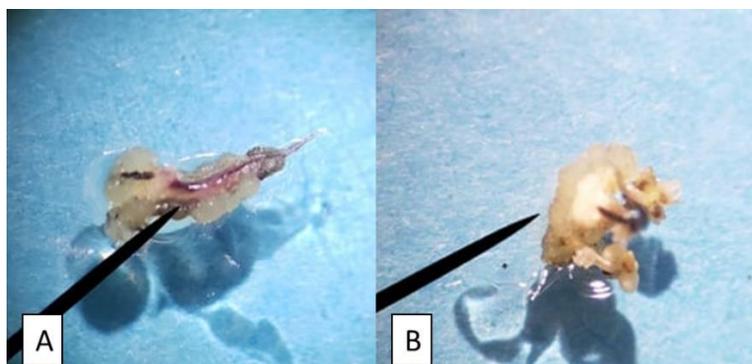


Figura 8. Desarrollo de callo en estaminoides de cacao variedad ICS-1 al día 28 después de siembra. A) y B) Callo cubriendo bordes y superficie de estaminoide en medio DKW variedad ICS-1.

En el borde de los pétalos, se observó estructuras redondas al día 56, estas estructuras se dieron sin una fase previa de calogénesis en el explante (Figura 9). De acuerdo con Parrot (2002) es necesaria la presencia de auxinas en el medio de cultivo para la inducción del estado embriogénico en los tejidos, para luego lograr la histodiferenciación, la cual se logra cuando las concentraciones de auxinas en el medio de cultivo son menores a las iniciales.



Figura 9. Desarrollo de estructuras con potencial embriogénico en pétalos de cacao variedad ICS-1.

### **Variedad Cauca 39.**

Después de 14 días de haber sido sembrados, los estaminoides de Cauca 39 que estaban en medio MS iniciaron la formación de estructuras callogénicas, las cuales crecieron en su mayoría en la base de los explantes. En los explantes de estaminoides de Cauca 39 se desarrollaron estructuras callogénicas compactas de color amarillo pálido (Figura 10). El crecimiento en la base de los explantes predominó en los estaminoides, mientras que las estructuras de los pétalos tuvieron un crecimiento en el centro del explante, con una coloración transparente (Figura 11).

Después de 28 días de siembra, los estaminoides de Cauca 39 que estaban en medio DKW y MS respectivamente, tuvieron un crecimiento en las bases del explante, áreas en las cuales el contacto con el medio fue mayor debido al comportamiento del estaminoide en los días previos. La coloración de la masa callogénica en estos explantes fue amarillo pálido, y blanquizco en el explante de estaminoide (Figura 12). Chantásig Vaca (2004) obtuvo resultados iguales utilizando glucosa como fuente de carbono en su medio.

La respuesta de los estaminoides de la variedad Cauca 39 al día 49 fue igual en los dos medios (Cuadro 4). Los estaminoides de Cauca 39 mostraron mejor formación de callo. El contacto que tienen los explantes con el medio de cultivo es otro factor que influye en el crecimiento del callo, y esto se debe a que los estaminoides por su forma alargada y erecta tiene 100% de contacto con el medio, mientras que la curvatura que presenta el pétalo hace que el contacto con el medio sea menor.

Cuadro 4. Desarrollo de callo en pétalos y estaminoides de cacao variedad Cauca 39 en medios de cultivo DKW y MS al día 49 después de establecidos *in vitro*.

Medio de cultivo	n	Formación de callo en variedad Cauca 39 (%)	
		Pétalo	Estaminoide
Driver-Kuniyuki Walnut	20	0	36.25 <sup>ns</sup>
Murashige y Skoog	25	0	29.00
Valor t			1.05
Probabilidad			0.2987

<sup>ns</sup> No es significativo, según la prueba t de student ( $P \leq 0.05$ ).

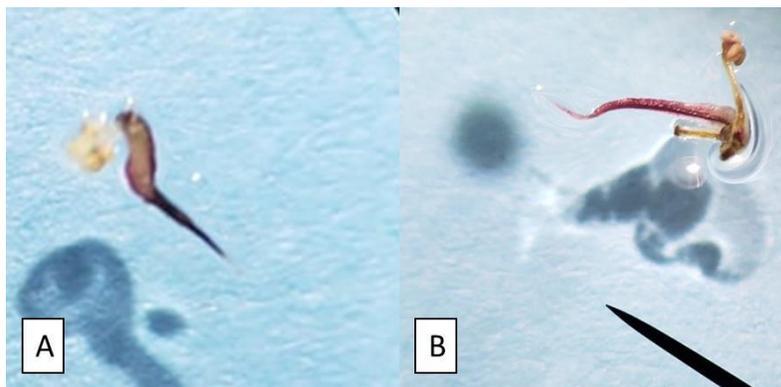


Figura 10. Formación de callo en base de estaminoides de cacao variedad Cauca 39 al día siete después de siembra. A) Formación de callo en estaminoide en medio DKW. B) Formación de callo en base de estaminoide en medio MS.

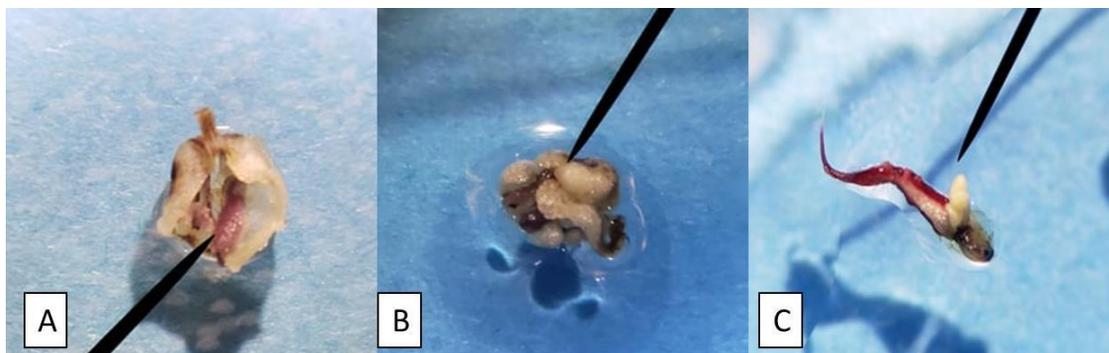


Figura 11. Crecimiento de estructuras callogénicas en pétalos y estaminoides de cacao variedad Cauca 39, 14 días después de siembra. A) Formación de callo en pétalos en medio DKW. B) Formación de callo en pétalos en medio MS. C) Crecimiento de callo en base de estaminoide.

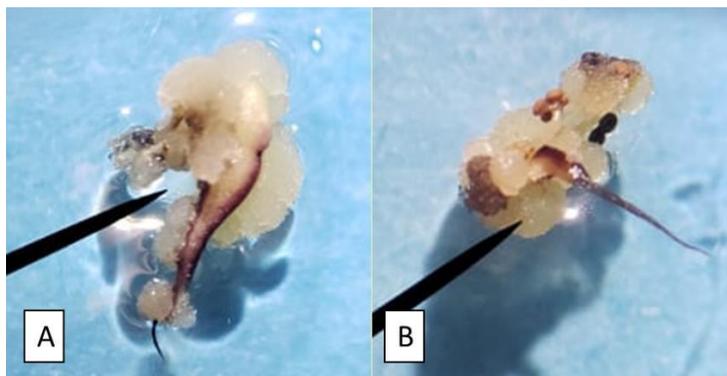


Figura 12. Desarrollo de callo en estaminoides de cacao variedad Cauca 39 al día 28 después de siembra. A) Crecimiento de masa callogénica en estaminoide en medio DKW. B) Crecimiento de masa callogénica en estaminoide en medio MS.

Chanatásig Vaca (2004) y Dublin (1991) resaltan que la variedad y el tipo de explante influyen directamente en el crecimiento de las estructuras callogénicas. La respuesta callogénica está directamente relacionada al genotipo de la planta, esto lo generan las distintas variedades, ya que algunas tienen la capacidad de regenerarse fácilmente en un medio específico.

#### **4. CONCLUSIONES**

- El medio de cultivo DKW suplementado con 2,4-D y TDZ es el mejor para la inducción a callogénesis en explantes de estaminoides de cacao de la variedad ICS-1, mientras que en la variedad Cauca 39 no mostró diferencia con el medio MS.
- Los explantes de pétalos de la variedad ICS-1 en medios DKW presentaron crecimiento de estructuras pre-embionarias, sin antes haber formación de callo.

## **5. RECOMENDACIONES**

- Repetir el experimento utilizando estaminoides como explantes principales y modificar el medio de cultivo para la inducción de embriogénesis somática.
- Evaluar métodos que promuevan el desarrollo de estructuras embrionarias en pétalos de cacao cultivados in vitro Realizar una evaluación del efecto del sorbitol en una dosis menor y utilizando el medio MS con sus elementos completos.

## 6. LITERATURA CITADA

- Abdelnour Esquivel AE. 1994. Conceptos Básicos del cultivo de tejidos vegetales. edit. por Turriaiba. CATIE. Costa Rica
- Aguilar ME. 1990. Obtención de Plantas de Cacao (*Theobroma cacao* L.) a partir de Microinjerto de Embriones Somáticos. Tesis, Costa Rica (Turrialba). Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. [consultado el 09 de sep. de 2019]. [sidalc.net/REPDOCA/A1380E/A1380E.PDF](http://sidalc.net/REPDOCA/A1380E/A1380E.PDF).
- ANACAFE (Asociación Nacional de Café). 2004. Programa de Diversificación de Ingresos en la Empresa Cafetalera. Guatemala: ANACAFE.
- Calderón O, Montes M. 2017. Micropropagación de variedades nativas de cacao (*Theobroma cacao* L.) mediante embriogénesis somática. En: Producción Agropecuaria y Desarrollo Sostenible 6. [consultado el 10 de ago. de 2019]. <https://www.lamjol.info/index.php/PAyDS/article/view/5721>.
- Chanatásig Vaca I. 2004. Inducción de la embriogénesis somática en clones superiores de cacao (*Theobroma cacao* L.), con resistencia a enfermedades fungosas. Tesis, Costa Rica (Turrialba). Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE). [consultado 15 de jul. de 2019]. [http://repositorio.bibliotecaorton.catie.ac.cr/bitstream/handle/11554/2391/Induccion\\_de\\_la\\_embriogenesis\\_somatica.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://repositorio.bibliotecaorton.catie.ac.cr/bitstream/handle/11554/2391/Induccion_de_la_embriogenesis_somatica.pdf?sequence=1&isAllowed=y).
- Dublin P. 1991. Multiplicación vegetativa de café, hevea y cacao. En: Roca W, Mroginski L. Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones. Colombia (Cali).
- Dubón A, Sánchez J. 2016. Manual de Producción de Cacao. En: Producción de cacao en sistemas agroforestales, pág. 264–265. [consultado el 25 de may. de 2019]. [http://www.fhia.org.hn/downloads/cacao\\_pdfs/Guia\\_Tecnica\\_cacao\\_en\\_SAF.pdf](http://www.fhia.org.hn/downloads/cacao_pdfs/Guia_Tecnica_cacao_en_SAF.pdf).
- Ferl R, Paul A. 2000. Genome organization and expression. En: Buchanan B, Grissem W, Jones R. Biochemistry and Molecular Biology of Plants. En: American Society of Plant Physiologists, 312-357 p.
- García L, Collado R, Bermúdez-Caraballosa I, Veitía N, Torres D, Romero C. 2008. Regeneración de plantas vía organogénesis directa en *Phaseolus vulgaris* L. En: Biotecnología Vegetal 8 (2).

- Li Z, Traore A, Maximova S, Guiltinan M. 1998. Somatic embryogenesis and plant regeneration from floral explants of cacao (*Theobroma cacao* L.) using Thidiazuron. En: *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 34 (4), 293–299 p.
- López-Báez O, Moreno J, Pacheco, S. 2001. Avances en Propagación de Cacao- *Theobroma cacao*- por Embriogénesis Somática en México. En: *Proceedings of the International Workshop on new Technologies and Cocoa Breeding*, 163–176 p.
- Ludwig M, Cohen J. 2002. Identification and quantification of three active auxins in different tissues of *Tropaeolum majus*. *Physiologia Plantarum*. En: *Physiologia Plantarum* 115 (2), 320–329 p. [consultado el 21 de ago. de 2019]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12060252>.
- Mossu G. 1990. Pests and diseases in agroforestry systems of the humid tropics. En: *Agroforestry Systems* 50 (3), 159–241 p.
- Motamayor J, Risterucci A, Lopez P, Ortiz C, Moreno A, Lanaud C. 2002. Cacao domestication I. En: the origin of the cacao cultivated by the Mayas 89 (5), 380–386 p. [consultado el 09 de jul. de 2019]. <https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6800156>.
- Murthy S, Murch J, Saxena K. 2016. Thidiazuron: A potent regulator of in vitro plant morphogenesis. En: *In Vitro Cellular & Developmental Biology* 7 (7), 267–275 p. [consultado el 21 de mayo de 2019]. <http://dx.doi.org/10.1007/BF02822732>.
- Narváez J, González J. 1983. Cultivo de tejidos del arroz, *Oryza sativa* L.: Inducción de callo y regeneración de plantas. 33 (1), 5–24 p. [consultado el 24 de jun. de 2019]. [https://revistas.unal.edu.co/index.php/acta\\_agronomica/article/view/48340](https://revistas.unal.edu.co/index.php/acta_agronomica/article/view/48340).
- Palencia C, Mejía L. 2000. Manejo integrado del cultivo de cacao. edit. por CORPOICA. Colombia (Bogotá). [consultado el 18 de jun. de 2019]. <http://www.sidalc.net/cgi-bin/wxis.exe/?IsisScript=bac.xis&method=post&formato=2&cantidad=1&expression=mfn=041419>.
- Parrott W. 2002. La embriogénesis somática en las angiospermas. VI Simposio Internacional de Biotecnología Vegetal. edit. por COEDITOR. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Cuba (Villa Clara).
- Portillo L, Santacruz-Ruvalcaba F. 2004. Totipotencia celular: Una revisión y aplicación del concepto. México (Guadalajara). [consultado el 12 de may. de 2019]. [http://www.floradejalisco.cucba.udg.mx/sites/default/files/publicaciones1/page\\_scientia\\_cucba/scientia\\_1.pdf#page=17](http://www.floradejalisco.cucba.udg.mx/sites/default/files/publicaciones1/page_scientia_cucba/scientia_1.pdf#page=17).
- Quilambaqui Reinoso, J. 2003. El efecto de las Fitohormonas en la fruticultura. En: *Ciencias de la Vida* 2 (1), 29–30 p. [consultado el 22 de jul. de 2019]. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=5969773>

Torres Cordero A. 2015. Propagación asexual de pitahaya (*Hylocereus undatus*) mediante estacas empleando enraizadores ANA y AIB en el canton Puerto Quito. Tesis. Universidad Técnica Estatal de Quevedo, Ecuador (Quevedo). [consultado el 15 de jun. de 2019]. <http://repositorio.uteq.edu.ec/handle/43000/483>.

Urrea Trujillo A, Garcés A, Rúa, G (2011): Regeneración vía embriogénesis somática de una variedad colombiana élite de *Theobroma cacao* L. En: Colombiana de Biotecnología 13 (2), 39–50 p.

Zarrillo S, Gaikwad N, Lanaud C, Powis T, Viot C, Lesur I, Solorzano RL. 1879. The use and domestication of *Theobroma cacao* during the mid-Holocene in the upper Amazon. Nature ecology & evolution