

**Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano**  
**Departamento de Ciencia y Producción Agropecuaria**  
**Ingeniería Agronómica**



Proyecto Especial de Graduación  
**Embriogénesis somática a partir de explantes foliares de cacao**  
**(*Theobroma cacao* L.) cultivar CCN-51**

Estudiante

Vidal Enrique Sánchez Reinoso

Asesores

María Alexandra Bravo, M.Sc.

Cinthya Martínez, MAE

Honduras, Junio 2023

**Autoridades**

**SERGIO RODRIGUEZ ROYO**

Rector

**ANA MARGARITA MAIER**

Vicepresidenta y Decana Académica

**CELIA O. TREJO RAMOS**

Directora Departamento Ciencia y Producción Agropecuaria

**HUGO ZAVALA MEMBREÑO**

Secretario General

## Contenido

Índice de Cuadros.....	4
Índice de Figuras .....	5
Índice de Anexos.....	6
Resumen .....	7
Abstract.....	8
Introducción.....	9
Materiales y Métodos .....	13
Localización .....	13
Fuente de Material Vegetal .....	13
Establecimiento de Explantes .....	13
Proliferación de Callo .....	13
Inducción de Embriones.....	14
Medios de Cultivo .....	15
Tratamientos Evaluados.....	18
VARIABLES MEDIDAS.....	19
Diseño Experimental y Análisis Estadístico .....	21
Resultados y Discusión.....	22
Establecimiento de los Explantes Foliares .....	22
Proliferación de Callo .....	24
Desarrollo de Embriones.....	25
Conclusiones .....	26
Recomendaciones.....	27
Referencias.....	28
Anexos.....	32

### Índice de Cuadros

Cuadro 1 Medio de cultivo Murashige y Skoog (MS) modificado para establecimiento de explantes foliares de cacao CCN-51. ....	16
Cuadro 2 Medio de cultivo de Lloyd y McCown (WPM) para la proliferación de callo a partir de láminas foliares de cacao CCN-51 .....	17
Cuadro 3 Medio de cultivo de Driver Kuniyuki Walnut (DKW) suplementado con macroelementos de MS para formación de embriones a partir de callo de cacao CCN-51. ....	18
Cuadro 4 Reguladores de crecimiento añadidos al medio MS para formación callo a partir de láminas foliares de cacao CCN-51 .....	19
Cuadro 5 Reguladores de crecimiento añadidos al medio WPM para proliferación de callo de cacao CCN-51 .....	19
Cuadro 6 Porcentaje de formación de callo a partir de hojas jóvenes de cacao CCN-51 establecidas in vitro en medio de cultivo Murashige y Skoog modificado. ....	23
Cuadro 7 Porcentaje de proliferación de callo a partir de callo primario de cacao CCN-51 establecido in vitro en medio de cultivo Lloyd y McCown (WPM) modificado. ....	25

### Índice de Figuras

Figura 1. Callo de cacao CCN-51 producido a partir de explantes foliares: A) Callo recién retirado del medio, B) callo fragmentado, C) callo colocado en medio con tratamiento. ....	14
Figura 2 Callo de cacao CCN-51 producido a partir de explantes foliares tras su multiplicación: A) Callo recién retirado del medio, B) callo fragmentado, C) callo colocado en medio líquido con tratamiento, D) medio con callo en mesa orbital. ....	15
Figura 3 Escala de 4 niveles la evaluación de proliferación de callo en explantes foliares de cacao CCN-51 siendo A nivel menor (25%) y D el nivel mayor (100%). ....	20
Figura 4 Escala de 4 niveles la para evaluación de proliferación de callo secundario de cacao CCN-51 siendo A nivel menor (25%) y D nivel mayor (100%). ....	20
Figura 5 Hojas de cacao CCN-51 en medio MS modificado y suplementado con 0.002 mg/L de TDZ a los diez días de establecimiento A) observación de arrugas en hoja B) indicios de callo en hoja. ....	22
Figura 6 Hoja de cacao CCN-51 en medio MS modificado y suplementado con 0.005 mg/L TDZ, a los 42 días de establecimiento in vitro. ....	23
Figura 7 Callo secundario formado a partir de hojas jóvenes de cacao CCN-51 en tratamiento 0.530 mg/L 2,4-D a los 43 días de inicio de fase de proliferación. ....	24
Figura 8 Callo de cacao CCN-51 a partir de explante foliares en medio líquido para inducción de embriones sin formación de estos. ....	25

**Índice de Anexos**

Anexo A Experimento Inducción a callogénesis, variable porcentaje de desarrollo de callo en la superficie del explante.....	32
---	----

## Resumen

El cacao (*Theobroma cacao* L.) es un cultivo de alta importancia en varios países de África, América, y el Sudeste Asiático; su propagación puede ser por método sexual y asexual. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de diferentes concentraciones y combinaciones de los reguladores de crecimiento 2,4-D, TDZ y BAP en la inducción y proliferación de callo embriogénico en láminas foliares de cacao cultivar CCN-51. Se utilizaron hojas del cultivar CCN-51 establecidas en medios suplementados con 2 µg/L TDZ, 2 µg/L TDZ + 1.98 mg/L 2,4-D, 5 µg/L TDZ y 5 µg/L TDZ + 1.98 mg/L 2,4-D en fase de establecimiento; en proliferación se suministró: 0.53 mg/L 2,4-D + 0.315 mg/L BAP y 1.98 mg/L 2,4-D; y para embriogénesis 5 mg/L BAP y medio sin reguladores. Se evaluó el callo formado sobre los explantes en las dos primeras etapas. Se usó un diseño completo al azar; se realizó la prueba de Kruskal Wallis ( $p \leq 0.05$ ) la fase de establecimiento y la de Wilcoxon (U de Mann Whitney) ( $p \leq 0.05$ ) para la de proliferación. Los explantes que presentaron mayor formación de callo fueron los establecidos en los tratamientos en 2 µg/L TDZ y 5 µg/L TDZ ( $p \leq 0.02$ ). En la fase de proliferación la formación de callo fue igual en los tratamientos. No se observaron estructuras embriogénicas durante el tiempo del estudio. En la etapa de establecimiento el incremento de TDZ no aumenta la formación de callo, tampoco las combinaciones TDZ con 2,4-D.

*Palabras clave:* Auxina, callo, citoquinina, *Malvaceae*

### Abstract

Cocoa (*Theobroma cacao* L.) is a crop of high economic importance in several countries in Africa, America and Southeast Asia. It can be propagated by sexual and asexual methods. The objective of this study was to evaluate the effect of different concentrations and combinations of the growth regulators 2,4-D, TDZ and BAP on the induction and proliferation of embryogenic callus in leaf blades of cocoa cultivar CCN-51. Leaves of cultivar CCN-51 were used for this study. These were established in media supplemented with 2 µg/L TDZ, 2 µg/L TDZ + 1.98 mg/L 2,4-D, 5 µg/L TDZ and 5 µg/L TDZ + 1.98 mg/L 2,4-D in the establishment phase; in proliferation, 0.53 mg/L 2,4-D + 0.315 mg/L BAP and 1.98 mg/L 2,4-D were supplied; for embryogenesis, 5 mg/L BAP and medium without regulators were supplied. The callus formed on the explants in the first two stages was evaluated. A complete randomized design was used; a Kruskal Wallis test ( $p \leq 0.05$ ) was performed for leaves and a Wilcoxon (Mann Whitney U) test ( $p \leq 0.05$ ) for callus. The explants that presented greater callus formation were those established in the treatments at 2 µg/L TDZ and 5 µg/L TDZ ( $p \leq 0.02$ ). In the proliferation phase, callus formation was equal in the treatments. No embryogenic structures were observed during the time of the study. In the establishment stage, the increase of TDZ did not increase callus formation, nor did the combinations of TDZ with 2,4-D.

*Keywords:* Auxin, callus, cytokinin, *Malvaceae*

## Introducción

El cacao (*Theobroma cacao* L.) forma parte de la familia de las Malváceas es una planta nativa de los trópicos húmedos de Centroamérica y del norte de Sudamérica, es cultivado comúnmente en la zona ecuatorial entre en trópico de cáncer y capricornio con su máxima incidencia en las latitudes 10° norte y 10° sur. El fruto de esta planta tiene como uso principal la creación de chocolate y derivados para pastelería como manteca, polvo e incluso licor de cacao (Bhattacharjee y Lava Kumar 2010).

El cultivo del cacao es de importancia en varios países a nivel mundial especialmente en África, América y el Sudeste Asiático teniendo en cuenta que entre el año 2019 y 2020 los cinco países con mayor producción fueron: Costa de Marfil, Ghana, Indonesia, Nigeria y Ecuador formando aproximadamente el 77% de la producción mundial. A nivel centroamericano los principales productores son México, Guatemala, Nicaragua, Panamá y Honduras este último produciendo 926 toneladas en el año 2020 (FAO 2022).

El centro de origen del cacao, según el estudio genético de Motamayor et al. (2002), es la región norte del Amazonas. Comúnmente se conocen tres tipos genéticos de cacao Criollo, Forastero y Trinitario. El Criollo, originario de América central, con cotiledones de color principalmente violeta y con flores verdes o rojizas, es conocido por su chocolate de alta calidad. El Forastero, originario del norte de Sudamérica, presenta mazorcas inmaduras verdes con forma variable, es usado por su resistencia y tolerancia a patógenos; el Trinitario, un híbrido natural de Forastero y Criollo que presenta características morfológicas de ambos grupos: número de semillas, color y forma de fruto (Monteiro et al. 2009; Bhattacharjee y Lava Kumar 2010; López et al. 2017). Otra investigación de Motamayor et al. (2008) propone una nueva clasificación de diez grupos genéticos que poco a poco está siendo adoptada.

El cultivar CCN-51, obtenido por Homero Castro Zurita en los años 60 en Naranjal, provincia de Guayas, Ecuador, es conocido por poseer una alta productividad debido a su autocompatibilidad y

calidad de mazorca a la vez que presenta una resistencia a condiciones ambientales variables, así como a varias enfermedades fúngicas como la escoba de bruja (*Moniliophthora perniciosa*) o monilia (*Moniliophthora roreri*) (Bailey 2016; Branco et al. 2018; Jaimez et al. 2022).

El cacao puede ser propagado de forma sexual y asexual. El método sexual consta de usar la semilla del fruto, comúnmente certificada, sembrada en viveros para luego trasplantar a campo. La propagación sexual es beneficiosa en cuanto a la facilidad de producción y manejo de nuevas plantas, pero tiene la desventaja que tarda considerablemente más tiempo, aproximadamente tres años hasta la primera floración y cinco meses hasta que la mazorca este madura, además las plantas poseen una mayor variabilidad en su productividad, lo que resulta en rendimientos menos estables (Johnson et al. 2008; Hidalgo Campos 2014; Arvelo y González 2017).

Los métodos asexuales son más variados, englobando principalmente injertos, acodos, estacas enraizadas y micropropagación, estos son usados para mantener un cultivo fiel a la planta original (Hidalgo Campos 2014). Los clones procedentes de propagación asexual poseen una mayor uniformidad además de ser más precoces en producción, entre 6 y 8 meses si se injerta en una plantación ya establecida, manteniendo cinco meses de desarrollo de mazorca, o alrededor de dos años si se comienza el cultivo. Las plantaciones o huertos clonales necesitan un mayor cuidado fitosanitario ya que son poblaciones uniformes o con una muy baja diversidad genética lo que aumentaría el daño causado por una enfermedad a la que no es resistente el cultivo (Sodré y Gomes 2019; Gárate Navarro et al. 2020)

La micropropagación es la ciencia del crecimiento de células, tejidos u órganos vegetales aislado de la planta madre, en un medio de cultivo (George et al. 2008b). En el cultivo de cacao han sido aplicadas varias técnicas de micropropagación como la organogénesis (Santana M et al. 2010), cultivo de meristemas (Acuña y Martínez 2019), obtención de lípidos *in vitro* (Tsai y Kinsella 1982), sin embargo el método más estudiado ha sido la embriogénesis somática.

La embriogénesis somática es la técnica con la cual se generan clones genéticamente idénticos a la planta madre con la misma capacidad y forma de crecimiento que un embrión proveniente de una semilla; el proceso se da gracias a la capacidad del explante de desdiferenciar sus células en tejido callogénico para después formar embriones por estresores como choques osmóticos o de temperatura y reguladores de crecimiento (Henaó-Ramírez y Urrea-Trujillo 2020). Este método tiene ventaja sobre otros como la organogénesis directa en que tiene un mayor potencial de multiplicación junto con un desarrollo ortotrópico y plagiotrópico idéntico al de la planta madre tanto en ramas como raíces (Gárate Navarro y Delgado Haya 2020; Henaó-Ramírez y Urrea-Trujillo 2020).

Para el cultivo de tejidos de cacao los medios MS (Murashige y Skoog), DKW (Juglans Medium) y WPM (Woody plant médium) de Lloyd y McCown son los más comúnmente usados (George et al. 2008a; Henaó-Ramírez y Urrea-Trujillo 2020). Dilworth et al. (2017) menciona que las fitohormonas son químicos producidos por plantas que regulan su reproducción, desarrollo, longevidad e incluso muerte, en campo las plantas los usan para responder a estímulos externos mientras que en laboratorio son necesarios para inducir distintas respuestas. Entre las más comunes se encuentran las auxinas que son producidas en los meristemas apicales y transportadas por el floema, junto con las citoquininas que son producidas en las puntas de las raíces y transportadas por el xilema.

Los reguladores de crecimiento Thidiazuron (TDZ) y 6-Bencilaminopurina (BAP) son usados como citoquininas promoviendo la división y crecimiento celular (Engels et al. 2012; Henaó-Ramírez y Urrea-Trujillo 2020). En cultivo de cacao, el TDZ ha sido usado para la etapa de crecimiento de callo primario por Li et al. (1998), Maximova et al. (2008), Niemenak et al. (2008), Minyaka et al. (2008) y Guillou et al. (2018); mientras que el BAP ha sido aplicado en las etapas de crecimiento de callo secundario y embriogénesis somática secundaria por Niemenak et al. (2008) y Garcia et al. (2016).

El 2,4-D (2,4 Ácido diclorofenoxiacético) ha sido utilizado por Lopez Baez et al. (1993), Söndahl et al. (1993) Li et al. (1998), Maximova et al. (2008) y Guillou et al. (2018), en explantes florales de cacao para el proceso de inducción y crecimiento de callo. La mayoría de las investigaciones de

embriogénesis somática en cacao, como las previamente mencionadas, se han realizado en explantes florales por lo que el conocimiento de las concentraciones y combinaciones reguladores que dan el mayor desarrollo de un explante foliar todavía siguen en estudio.

El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de diferentes concentraciones y combinaciones de los reguladores de crecimiento 2,4-D, TDZ y BAP en la formación y proliferación de callo embriogénico en láminas foliares de cacao cultivar CCN-51.

## **Materiales y Métodos**

### **Localización**

El estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Departamento de Ciencia y Producción Agropecuaria de la Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano, Honduras.

### **Fuente de Material Vegetal**

El material vegetativo se obtuvo del cultivar de cacao CCN-51 del huerto clonal de cacao establecido por la unidad de Frutales de la Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano. Esta plantación se encuentra ubicada en el lote La Vega 1, en la Zona de Las Vegas, Monte Redondo.

### **Establecimiento de Explantes**

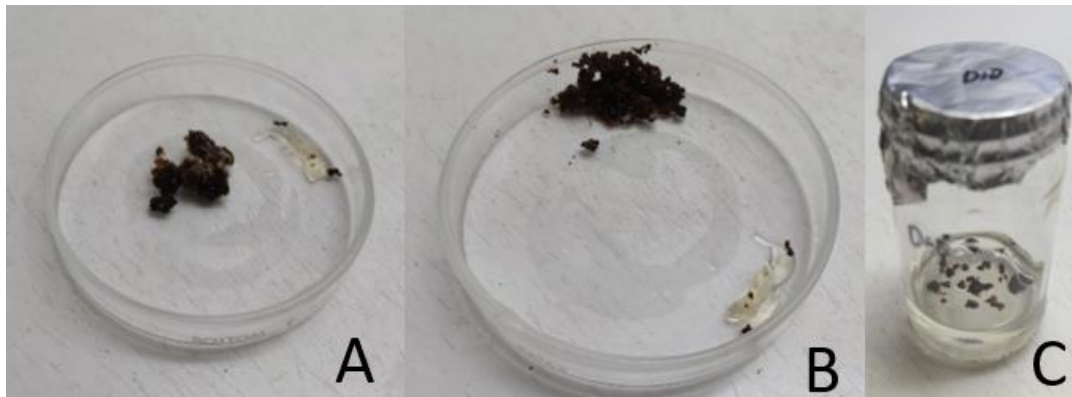
Las hojas fueron recolectadas bajo el criterio de que sean jóvenes y lo más limpias posible para reducir el riesgo de contaminación, fueron recolectadas en las horas de la mañana del mes de enero del año 2023 siguiendo el proceso de separación, desinfección y establecimiento detallado por Ortega (2022).

### **Proliferación de Callo**

El callo una vez formado fue transferido a un nuevo medio dentro de la cámara de flujo laminar. Para esto se desinfectó y preparó la cámara de flujo con todos los materiales necesarios, se colocó el callo en un plato Petri estéril, se fragmentó el callo con ayuda de un bisturí y pinza estériles dentro del plato y se colocó en cada tratamiento (Figura 1).

**Figura 1**

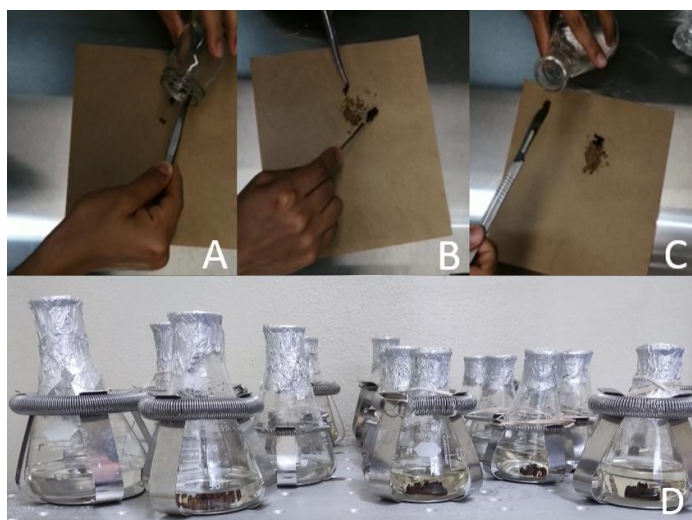
*Callo de cacao CCN-51 producido a partir de explantes foliares: A) Callo recién retirado del medio, B) callo fragmentado, C) callo colocado en medio con tratamiento.*

**Inducción de Embriones**

Una vez terminada la proliferación del callo se colocó en medio de diferenciación. Para este procedimiento en una cámara de flujo laminar previamente preparada y con materiales esterilizados; A) se retiró el callo del frasco de multiplicación y fue colocado en papel estéril, B) se picó el material en pequeños trozos cuidando de no cortar el papel, C) se colocó el callo en matraces Erlenmeyer de 125mL con 50 mL de medio líquido con los respectivos tratamientos, D) se colocaron los frascos ya sellados en una agitadora orbital a una velocidad de 110 r.p.m. (Figura 2).

**Figura 2**

*Callo de cacao CCN-51 producido a partir de explantes foliares tras su multiplicación: A) Callo recién retirado del medio, B) callo fragmentado, C) callo colocado en medio líquido con tratamiento, D) medio con callo en mesa orbital.*

**Medios de Cultivo**

Para la fase de establecimiento se usó el medio de cultivo de Murashige y Skoog (MS) (Cuadro 1). Este medio se suplementó con reguladores de crecimiento según con el tratamiento a evaluar, se ajustó su pH a 5.8 y se aplicó 1.8 g/L de Phytigel.

A los ocho meses de establecidos los explantes foliares, el callo formado en la superficie de estos se transfirió al medio de cultivo de Lloyd y McCown (WPM) (Cuadro 2) para la proliferación de callo. Este medio se suplementó con reguladores de crecimiento acorde con el tratamiento a evaluar, se ajustó su pH a 5.8 y se aplicó 1.8 g/L de Phytigel.

Tras el proceso de proliferación, los callos se pasaron a un medio suplementado con macroelementos de Murashige y Skoog (MS) y los Microelementos de Driver Kuniyuki Walnut (DKW) (Cuadro 3) para la formación de embriones somáticos. Este medio se suplementó con reguladores de crecimiento acorde con el tratamiento a evaluar y se ajustó su pH a 5.8.

Todos los medios fueron esterilizados en autoclave a 121°C con una presión de 1.054 kg/cm<sup>2</sup> por 20 minutos.

### Cuadro 1

*Medio de cultivo Murashige y Skoog (MS) modificado para establecimiento de explantes foliares de cacao CCN-51.*

Componentes	Fórmula	Nombre común	mg/L
Macroelementos	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
Microelementos	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
Vitaminas	FeNa EDTA	Hierro Sodio Etilendiaminotetraacético	50.000
		Inositol	100.000
		Tiamina	0.100
		Piridoxina	0.500
Carbohidratos		Ácido Nicotínico	0.500
		Sacarosa	30000.000

*Nota.* Adaptado de Roca y Mroginski (1991)

**Cuadro 2**

*Medio de cultivo de Lloyd y McCown (WPM) para la proliferación de callo a partir de láminas foliares*

*de cacao CCN-51*

Componentes	Fórmula	Nombre común	mg/lit
Macroelementos	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	Nitrato de amonio	400.000
	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	Cloruro de calcio dihidratado	96.000
	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	Sulfato de magnesio heptahidratado	370.000
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Sulfato de potasio	170.000
	Ca [NO <sub>3</sub> ] <sub>2</sub> . 4H <sub>2</sub> O	Nitrato de calcio tetrahidratado	556.000
	K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Fosfato de potasio	990.000
Microelementos	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	Ácido bórico	6.200
	MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	Sulfato de manganeso tetrahidratado	22.300
	ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	Sulfato de Zinc heptahidratado	8.600
	NaMoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	Molibdato de sodio bihidratado	0.025
	CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	Sulfato de cobre petrahidratado	0.025
	FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	Sulfato de hierro heptahidratado	27.800
	FeNaEDTA	Sal férrica sódica de ácido	37.300
Vitamina	Inositol		0.100
	Tiamina		10.000
	Piridoxina		0.500
	Ácido Nicotínico		0.500
	Agua de coco		50.000
Carbohidrato	2,4-D	Ácido 2,4- diclorofenoxiacético	1.980
	KIN	Kinetina	0.300
	Glucosa		20000.000

*Nota.* Adaptado de Roca y Mroginski (1991)

**Cuadro 3**

*Medio de cultivo de Driver Kuniyuki Walnut (DKW) suplementado con macroelementos de MS para formación de embriones a partir de callo de cacao CCN-51.*

Componentes	Fórmula	Nombre común	mg/L
Macroelementos MS	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
Microelementos DKW	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	Ácido bórico	4.760
	MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	Sulfato de manganeso monohidratado	33.804
	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	0.045
	FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	Sulfato de hierro heptahidratado	0.033
	ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	Sulfato de zinc heptahidratado	8.600
Vitaminas		Inositol	100.000
		Tiamina	2.000
		Ácido Nicotínico	1.000
		Glicina	2.000
Carbohidratos		Sacarosa	30000.000

*Nota.* Adaptado de Chanatásig Vaca (2004)

**Tratamientos Evaluados**

En la etapa de inducción a callogénesis se evaluaron cuatro tratamientos con los reguladores 2,4-D y TDZ (Cuadro 4). En la etapa de proliferación de callo se evaluaron dos tratamientos que constan en diferentes proporciones de los reguladores 2,4-D y BAP (Cuadro 5). En la etapa de inducción a embriogénesis somática se evaluó dos tratamientos 5mg/L BAP y un testigo sin reguladores.

**Cuadro 4**

*Reguladores de crecimiento añadidos al medio MS para formación callo a partir de láminas foliares de cacao CCN-51*

Tratamientos		Referencia
TDZ mg/L	+ 2,4-D mg/L	
0.002	0	Ortega, 2022
0.002	1.980	Ortega, 2022 y Maximova et al., 2002 modificado
0.005	0	Maximova et al., 2002 modificado
0.005	1.980	Maximova et al., 2002

**Cuadro 5**

*Reguladores de crecimiento añadidos al medio WPM para proliferación de callo de cacao CCN-51*

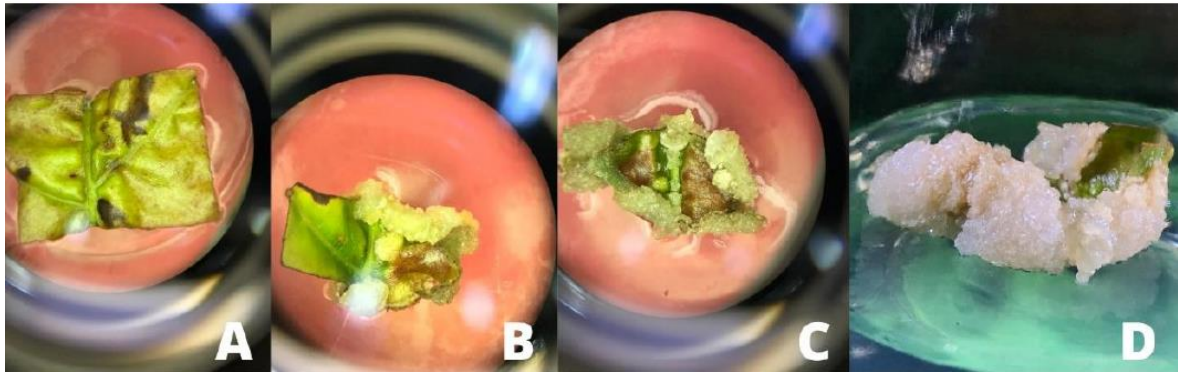
Tratamientos		Referencia
2,4-D mg/L	+ BAP mg/L	
0.530	0.315	Maximova et al., 2002
1.980	0	Ortega, 2022

**VARIABLES MEDIDAS**

Se evaluó de manera cualitativa el callo formado en las etapas de establecimiento y proliferación con la escala de cuatro niveles descrita por Ortega (2022) donde separó el callo formado en porcentajes estimados de 25, 50, 75 y 100 para la etapa de establecimiento (Figura 3) y proliferación (Figura 4). Para la fase de formación de embriones se observó la presencia o ausencia de embriones formados.

**Figura 3**

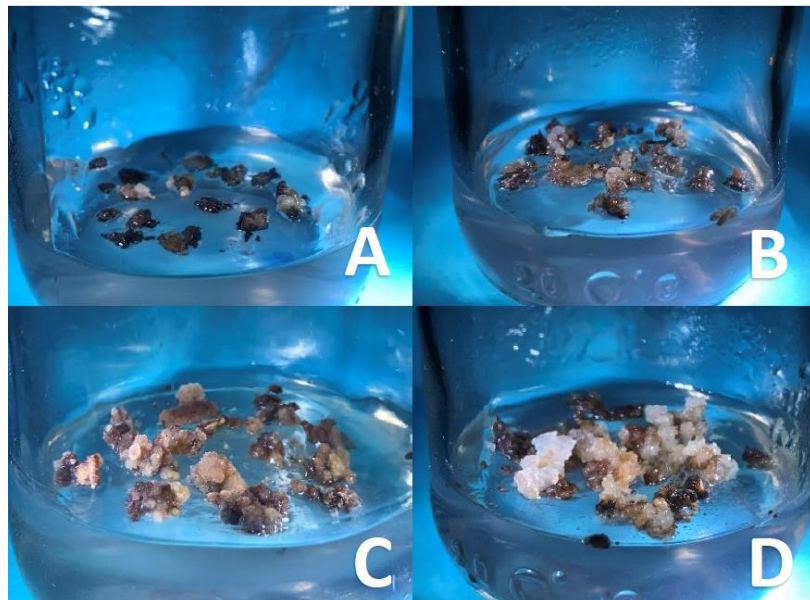
*Escala de 4 niveles la evaluación de proliferación de callo en explantes foliares de cacao CCN-51 siendo A nivel menor (25%) y D el nivel mayor (100%).*



*Nota. Tomado de Ortega (2022)*

**Figura 4**

*Escala de 4 niveles la para evaluación de proliferación de callo secundario de cacao CCN-51 siendo A nivel menor (25%) y D nivel mayor (100%).*



*Nota. Tomado de Ortega (2022)*

### **Diseño Experimental y Análisis Estadístico**

En las dos primeras fases se estableció con un diseño completo al azar. Para la inducción a callo se tuvo cuatro tratamientos, con 87 repeticiones por tratamiento. En la etapa de proliferación de callo se evaluaron dos tratamientos, con 108 repeticiones por tratamiento. En la fase de inducción a embriogénesis somática se evaluaron dos tratamientos con 10 repeticiones por tratamiento.

El análisis estadístico de los datos recolectados en los experimentos de establecimiento y proliferación se realizó con la prueba de bondad de ajuste de Kolmogorov Smirnov ( $p \leq 0.05$ ) y continuó con un análisis de varianza no paramétrico de Kruskal Wallis ( $p \leq 0.05$ ) para las hojas y una prueba de Wilcoxon (U de Mann Whitney) ( $p \leq 0.05$ ) para los callos.

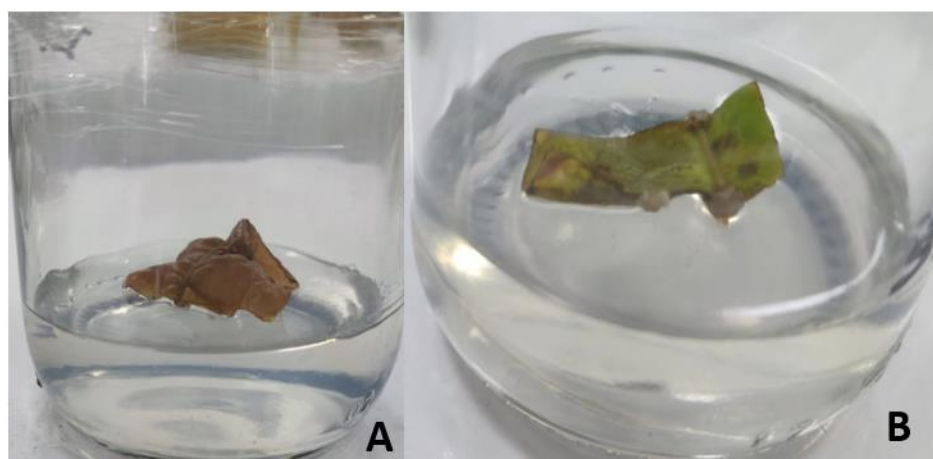
## Resultados y Discusión

### Establecimiento de los Explantes Foliare

En los explantes de los cuatro tratamientos a partir de los diez días después de establecimiento, se observó cambios en la forma en toda la superficie o curvaturas de las hojas; a los 42 días después de establecimiento se observó estructuras translucidas blanquecinas agrupadas en los haces vasculares o en la superficie del explante (Figura 5).

### Figura 5

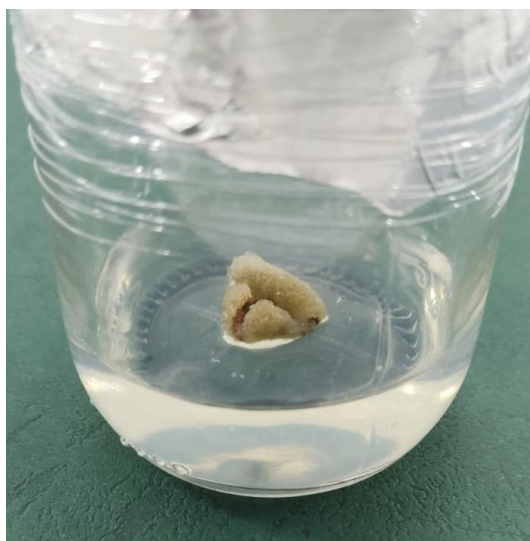
*Hojas de cacao CCN-51 en medio MS modificado y suplementado con 0.002 mg/L de TDZ a los diez días de establecimiento A) observación de arrugas en hoja B) indicios de callo en hoja.*



Tras 42 días se observó la presencia de callos en los explantes, presentaron el mayor porcentaje de callo los explantes en el tratamiento de 0.005 y 0.002 mg/L de TDZ (Figura 6) (Cuadro 6). Con estos resultados se puede inferir que la combinación de 2,4-D con TDZ tiene un efecto de reducción sobre la formación de callo en explantes foliares de cacao CCN-51 debido a que los tratamientos que solo utilizaron TDZ presentaron mayor formación de callo ( $p < 0.02$ ). Así mismo se puede observar que incrementar la dosis utilizada por Ortega (2022) (0.002 mg/L TDZ) no tiene un efecto significativo sobre el crecimiento de callo en explantes foliares (Cuadro 6).

**Figura 6**

*Hoja de cacao CCN-51 en medio MS modificado y suplementado con 0.005 mg/L TDZ, a los 42 días de establecimiento in vitro.*

**Cuadro 6**

*Porcentaje de formación de callo a partir de hojas jóvenes de cacao CCN-51 establecidas in vitro en medio de cultivo Murashige y Skoog modificado.*

Tratamientos		n	Promedio de formación de callo (%)
TDZ mg/L	+ 2,4-D mg/L		
0.002	0.000	37	56.25 a
0.002	1.980	34	43.18 ab
0.005	0.000	37	57.86 a
0.005	1.980	36	38.97 b
Valor p			0.0232
Coeficiente de variación			19.38

Los resultados obtenidos concuerdan con los obtenidos por Fernández L. (2018) y Ortega (2022) donde observaron que la dosis de 0.002 mg/L de TDZ es la más adecuada para la inducción a callo a partir de explantes foliares de cacao.

Estos hallazgos parecieran diferir de los obtenidos por Li et al. (1998), Niemenak et al. (2008) y Guillou et al. (2018), pues reportaron resultados positivos aplicando 2,4-D y el doble de la dosis óptima de TDZ; sin embargo, en estos estudios no se utilizaron explantes foliares, sino florales además

de no haber utilizado el clon CCN-51. Por lo que se podría inferir que tanto el genotipo como el tejido de donde procede el explante influirían en conjunto con las fitohormonas en la inducción óptima de formación de callo.

Los días que tardaron los explantes en presentar cambios son similares a los obtenidos por Fernández L. (2018) y Ortega (2022), siendo 15 y 7 días respectivamente en comparación con los 10 observados en este experimento.

### **Proliferación de Callo**

A los 43 días de iniciada la fase de proliferación se observó formación de callo secundario (Figura 7). No se observó diferencia significativa entre los tratamientos 0.530 mg/L 2,4-D + 0.315 mg/L BAP y 1.980 mg/L 2,4-D (Cuadro 7). Los resultados sugieren que la combinación de 2,4-D con BAP o Kinetina, comúnmente usada para la multiplicación de callo en cacao, debe ser simplificada solamente a 2mg/L de 2,4-D.

### **Figura 7**

*Callo secundario formado a partir de hojas jóvenes de cacao CCN-51 en tratamiento 0.530 mg/L 2,4-D a los 43 días de inicio de fase de proliferación.*



### Cuadro 7

*Porcentaje de proliferación de callo a partir de callo primario de cacao CCN-51 establecido in vitro en medio de cultivo Lloyd y McCown (WPM) modificado.*

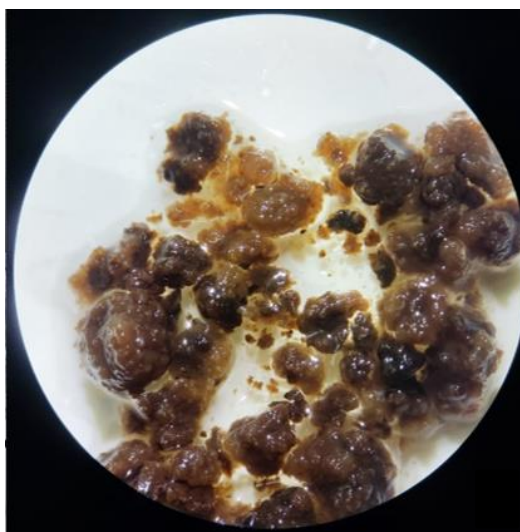
Tratamientos		n	Porcentaje de callo nuevo
2,4-D mg/L	+ BAP mg/L		
0.530	0.315	108	39.91a
1.980	0	108	43.98a
Valor p			0.2658
Coeficiente de variación			23.44

### Desarrollo de Embriones

A los 65 días de realizada la transferencia se contabilizó los medios que presentaron cambios de color de transparente a café pálido verdoso. Se encontró un cambio de color en el 60% de los medios con 5mg/L de BAP y 30% en los medios sin regulador. Se realizó la observación del callo con ayuda de un estereoscopio, en esta práctica no se encontró embriones formados (Figura 8).

### Figura 8

*Callo de cacao CCN-51 a partir de explante foliares en medio líquido para inducción de embriones sin formación de estos.*



### **Conclusiones**

En la etapa de establecimiento aumentar la dosis de 0.002 mg/L TDZ y/o combinarlo con 2,4-D no aumenta la cantidad de callo formado.

La combinación de 0.53 mg/L 2,4-D con 0.315 mg/L BAP puede ser simplificada a 1.89 mg/L 2,4-D sin presentar cambios en la cantidad de callo formado.

### Recomendaciones

Evaluar el efecto de diferentes edades de callo primario para la proliferación de callo secundario.

Suplementar al medio MS con 0.002 mg/L de TDZ para una mejor inducción a callogénesis en explantes foliares de cacao CCN-51.

Añadir al medio WPM modificado 1.980 mg/L de 2,4-D para la proliferación de callo producido a partir de explantes foliares de cacao CCN-51.

Evaluar los siguientes pasos del desarrollo *in vitro* de los callos producidos para la obtención de plantas por embriogénesis somática.

## Referencias

- Acuña H, Martínez J. 2019. Micro injertación de cacao (*Theobroma cacao*) autóctono de El Salvador. Producción Agropecuaria y Desarrollo Sostenible; [consultado el 21 de jun. de 2023]. 8:43–52. doi:10.5377/payds.v8i0.8711.
- Arvelo MÁ, González D. 2017. Manual técnico del cultivo de cacao: prácticas latinoamericanas. [sin lugar]: Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura; [consultado el 27 de mar. de 2023].
- Bailey BA. 2016. Cacao diseases: A history of old enemies and new encounters. Cham: Springer. 633 p. ISBN: 9783319247892. English; [consultado el 3 de jun. de 2023]. <https://livivo.idm.oclc.org/login?url=https://ebookcentral.proquest.com/lib/zbmed-ebooks/detail.action?docID=4419947>.
- Bhattacharjee R, Lava Kumar P. 2010. Cacao. En: Kole C, editor. Technical crops. [sin lugar]: Springer. p. 127–142. en; [consultado el 13 de oct. de 2022]. [https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-540-34538-1\\_7](https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-540-34538-1_7).
- Branco J, Da Silva SMd, Lopes Uilson Vanderlei, Daniela Viana, Corrêa RX. 2018. Characterization of the Sexual Self- and Cross-Compatibility in Genotypes of Cacao. AJPS; [consultado el 3 de jun. de 2023]. 09(09):1794–1806. doi:10.4236/ajps.2018.99131.
- Chanatásig Vaca CI. 2004. Inducción de la embriogénesis somática en clones superiores de cacao (*Theobroma cacao* L.), con resistencia a enfermedades fungosas [Tesis de maestría]. Costa Rica: Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. es; [consultado el 22 de mar. de 2023]. <https://repositorio.catie.ac.cr/handle/11554/2391>.
- Dilworth LL, Riley CK, Stennett DK. 2017. Chapter 5 - Plant Constituents: Carbohydrates, Oils, Resins, Balsams, and Plant Hormones. En: Badal McCreath S, Delgoda R, editores. Pharmacognosy: Fundamentals, Applications and Strategies. London, United Kingdom: Academic press; Elsevier. p. 61–80 ; [consultado el 28 de may. de 2023]. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128021040000056>.
- Engels C, Kirkby E, White P. 2012. Mineral Nutrition, Yield and Source–Sink Relationships. En: Marschner P, Marschner HMnohp, editores. Marschner's mineral nutrition of higher plants. 3ª ed. Amsterdam, London: Academic press. p. 85–133 ; [consultado el 15 de oct. de 2022].
- [FAO] Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2022. Crops and livestock products. [sin lugar]: Fao; [consultado el 3 de feb. de 2023]. <https://www.fao.org/faostat/en/>.
- Fernández L. FA. 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 [Proyecto Especial de Graduación]. Honduras: Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano. spa; [consultado el 13 de abr. de 2023]. <https://bdigital.zamorano.edu/items/139cfed7-2428-4ed4-af90-cb65a2685027/full>.
- Gárate Navarro MA, Delgado Haya H. 2020. Guía Técnica de Micropropagación de Cacao (*Theobroma cacao* L.). [sin lugar]: Gobierno Regional de San Martín; Perú. spa; [consultado el 3 de feb. de 2023]. <https://repositorio.inia.gob.pe/handle/20.500.12955/1338>.

- Gárate Navarro MA, Paz Urrelo JI, Delgado Haya H. 2020. Técnica de Propagación de Cacao (*Theobroma cacao* L.). [sin lugar]: Gobierno Regional de San Martín; Perú. spa; [consultado el 3 de feb. de 2023]. <https://repositorio.inia.gob.pe/handle/20.500.12955/1337>.
- García C, Corrêa F, Findley S, Almeida A-A, Costa M, Motamayor JC, Schnell R, Marelli J-P. 2016. Optimization of somatic embryogenesis procedure for commercial clones of *Theobroma cacao* L. Afr. J. Biotechnol; [consultado el 3 de abr. de 2023]. 15(36):1936–1951. doi:10.5897/AJB2016.15513.
- George EF, Hall MA, Klerk G-JD. 2008a. Micropropagation: Uses and Methods. En: Kole Chittaranjan, editor. Plant Propagation by Tissue Culture. [sin lugar]: Springer, Dordrecht. p. 29–64. en; [consultado el 3 de feb. de 2023]. [https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4020-5005-3\\_2](https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4020-5005-3_2).
- George EF, Hall MA, Klerk G-JD. 2008b. Plant Tissue Culture Procedure - Background. En: George EF, editor. Plant propagation by tissue culture. Dordrecht: Springer. p. 1–28 ; [consultado el 28 de may. de 2023].
- Guillou C, Fillodeau A, Brulard E, Breton D, Faria Maraschin S de, Verdier D, Simon M, Ducos J-P. 2018. Indirect somatic embryogenesis of *Theobroma cacao* L. in liquid medium and improvement of embryo-to-plantlet conversion rate. In Vitro Cell.Dev.Biol.-Plant; [consultado el 5 de oct. de 2022]. 54(4):377–391. En;en. <https://link.springer.com/article/10.1007/s11627-018-9909-y>. doi:10.1007/s11627-018-9909-y.
- Henao-Ramírez AM, Urrea-Trujillo AI. 2020. Somatic Embryogenesis for Clonal Propagation and Associated Molecular Studies in Cacao (*Theobroma cacao* L.). En: Chong PA, Newman DJ, Steinmacher DA, editores. Agricultural, Forestry and Bioindustry Biotechnology and Biodiscovery. [sin lugar]: Springer, Cham. p. 63–102. en; [consultado el 5 de oct. de 2022]. [https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-030-51358-0\\_5](https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-030-51358-0_5).
- Hidalgo Campos N. 2014. Algunos Métodos de Propagación del Cultivo de Cacao *Theobroma cacao* L. [sin lugar]: Mag; [consultado el 14 de oct. de 2022]. [http://www.infoagro.go.cr/InfoRegiones/Publicaciones/Metodos\\_Propagacion\\_cultivo\\_Cacao.pdf](http://www.infoagro.go.cr/InfoRegiones/Publicaciones/Metodos_Propagacion_cultivo_Cacao.pdf).
- Jaimez RE, Barragan L, Fernández-Niño M, Wessjohann LA, Cedeño-García G, Sotomayor Cantos I, Arteaga F. 2022. *Theobroma cacao* L. cultivar CCN 51: a comprehensive review on origin, genetics, sensory properties, production dynamics, and physiological aspects. PeerJ; [consultado el 3 de jun. de 2023]. 10:e12676. eng. doi:10.7717/peerj.12676.
- Johnson JM, Bonilla JC, Aguero Castillo L. 2008. Manual de Manejo y producción de cacaoero. Leon, Nicaragua: [sin editorial]; [consultado el 27 de mar. de 2023].
- Li Z, Traore A, Maximova S, Guiltinan MJ. 1998. Somatic embryogenesis and plant regeneration from floral explants of cacao (*Theobroma cacao* L.) using thidiazuron. In Vitro Cell.Dev.Biol.-Plant; [consultado el 28 de mar. de 2023]. 34(4):293–299. doi:10.1007/BF02822737.
- López M, Ramírez O, Dubón A. 2017. Catálogo de cultivares de Cacao (*Theobroma cacao* L.) evaluados y seleccionados por la FHIA. 1ª ed. [sin lugar]: Centro de Comunicación Agrícola de la FHIA. ISBN: 978-99926-36-39-8; [consultado el 1 de abr. de 2023].

- Lopez Baez O, Bollon H, Eskes A, Pétiard V. 1993. Embryogenèse somatique de cacaoyer *Theobroma cacao* L. à partir de pièces florales. [sin lugar]: [sin editorial]. French; [consultado el 28 de mar. de 2023]. <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=FR2019146939>.
- Maximova SN, Young A, Pishak S, Guiltinan MJ. 2008. Field performance of *Theobroma cacao* L. plants propagated via somatic embryogenesis. *In Vitro Cell.Dev.Biol.-Plant*; [consultado el 28 de mar. de 2023]. 44(6):487–493. doi:10.1007/s11627-008-9130-5.
- Minyaka E, Niemenak N, Fotso, Sangare A, Ndoumou Omokolo D. 2008. Effect of MgSO<sub>4</sub> and K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> on somatic embryo differentiation in *Theobroma cacao* L. *Plant Cell Tiss Organ Cult*; [consultado el 3 de abr. de 2023]. 94(2):149–160. doi:10.1007/s11240-008-9398-5.
- Monteiro WR, Lopes UV, Clement D. 2009. Genetic Improvement in Cocoa. En: Mohan Jain S, Priyadarshan PM, editores. *Breeding Plantation Tree Crops: Tropical Species*. [sin lugar]: Springer, New York, NY. p. 589–626. en; [consultado el 13 de oct. de 2022]. [https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-0-387-71201-7\\_16](https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-0-387-71201-7_16).
- Motamayor JC, Lachenaud P, da Silva E Mota JW, Loor R, Kuhn DN, Brown JS, Schnell RJ. 2008. Geographic and genetic population differentiation of the Amazonian chocolate tree (*Theobroma cacao* L). *PLoS One*; [consultado el 1 de abr. de 2023]. 3(10):e3311. eng. doi:10.1371/journal.pone.0003311.
- Motamayor JC, Risterucci AM, Lopez PA, Ortiz CF, Moreno A, Lanaud C. 2002. Cacao domestication I: the origin of the cacao cultivated by the Mayas. *Heredity*; [consultado el 26 de mar. de 2023]. 89(5):380–386. En;en. <https://www.nature.com/articles/6800156>. doi:10.1038/sj.hdy.6800156.
- Niemenak N, Saare-Surminski K, Rohsius C, Ndoumou DO, Lieberei R. 2008. Regeneration of somatic embryos in *Theobroma cacao* L. in temporary immersion bioreactor and analyses of free amino acids in different tissues. *Plant Cell Rep*; [consultado el 3 de abr. de 2023]. 27(4):667–676. eng. doi:10.1007/s00299-007-0497-2.
- Ortega MA. 2022. Establecimiento in vitro de Cacao (*Theobroma cacao* L.) híbrido CCN-51 usando explantes foliares [Proyecto Especial de Graduación]. Honduras: Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano. es; [consultado el 27 de abr. de 2023]. <https://bdigital.zamorano.edu/items/82b5468b-5220-42ec-be8c-1dfe8b667fae/full>.
- Roca W, Mroginski LA. 1991. Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales in vitro. En: Roca WM, Mroginski LA, editores. *Cultivo de Tejidos en la Agricultura: Fundamentos y Aplicaciones*. Cali, Colombia: [sin editorial] ; [consultado el 3 de feb. de 2023].
- Santana M GF, Velásquez S R, Mata J. 2010. Efecto de la fuente de carbono sobre la organogénesis y embriogénesis somática en cacao. *Análisis citogenético. Agronomía Tropical*; [consultado el 28 de may. de 2023]. 60. [http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0002-192X2010000200008](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0002-192X2010000200008).
- Sodré GA, Gomes ARS. 2019. Cocoa propagation, technologies for production of seedlings. *Rev. Bras. Frutic*; [consultado el 28 de may. de 2023]. 41(2). doi:10.1590/0100-29452019782.
- Söndahl MR, Liu S, Bellato C, Bragin A. 1993. Cacao Somatic Embryogenesis. *Acta Horticulturae*; [consultado el 28 de mar. de 2023]. (336):245–248. doi:10.17660/ActaHortic.1993.336.31.

Tsai CH, Kinsella JE. 1982. Tissue culture of cocoa beans (*Theobroma cacao* L.): Incorporation of acetate and laurate into lipids of cultured cells. *Lipids*; [consultado el 28 de may. de 2023]. 17(5):367–371. eng. doi:10.1007/BF02535196.

## Anexos

## Anexo A

*Experimento Inducción a callogénesis, variable porcentaje de desarrollo de callo en la superficie del explante*

*Prueba normalidad*

Variable	Ajuste	media	varianza	n	EstadisticoD	p-valor
Desarrollo	Normal (47.4,583.21)	47.40	583.21	144	0.25	<0.0001

## Variación hojas

Variable	Tratamiento	N	Medias	D.E.	H	p
Desarrollo1	2T	37	52.03	29.68	6.07	0.0735
Desarrollo1	2TD	34	42.65	13.10		
Desarrollo1	5T	37	56.08	29.70		
Desarrollo1	5TD	36	38.19	14.00		

Hojas jóvenes  
Prueba Normalidad

Variable	Ajuste	media	varianza	n	EstadisticoD	p-valor
Desarrollo	Normal (47.4,583.21)	49.07	586.53	134	0.25	<0.0001

## Prueba variación

Variable	Tratamiento	N	Medias	D.E.	H	p
Desarrollo1	2T	32	56.25	29.78	8.37	0.0232
Desarrollo1	2TD	33	43.18	12.92		
Desarrollo1	5T	35	57.86	29.56		
Desarrollo1	5TD	34	38.97	14.02		

Trat.	Medias	Ranks
5TD	38.97	54.04
2TD	43.18	62.79
2T	56.25	75.23
5T	57.86	77.94

Experimento Multiplicación de callo, variable porcentaje de desarrollo de callo en la superficie del explante

## Prueba normalidad

Variable	Ajuste	media	varianza	n	Estadístico D	p-valor
% callo nuevo	Normal (41.94,409.2)	41.94	409.20	217	0.31	<0.0001

## Prueba Variación

Variable	Tratamiento	N	Medias	D.E.	H	p
% callo nuevo	D	108	43.98	22.12	1.03	0.2658
% callo nuevo	D+B	108	39.91	18.04		

## Prueba de Wilcoxon para muestras independientes

Clasific	Tratamiento
Variable	% callo nuevo
Grupo 1	D
Grupo 2	D+B
n (1)	108
n (2)	109
Media (1)	43.98
Media (2)	39.91
DE (1)	22.12
DE (2)	18.04
W	12240.5
P (2 colas)	0.2658