

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



Proyecto Especial de Graduación
Establecimiento *in vitro* de Cacao (*Theobroma cacao* L.)
híbrido CCN-51 usando explantes foliares

Estudiante

Maykell Alfredo Ortega Palacios

Asesoras

María Alexandra Bravo, M.Sc.

Cinthyia Martínez, MAE

Honduras, Julio 2022

Autoridades

TANYA MÜLLER GARCÍA

Rectora

ANA M. MAIER ACOSTA

Vicepresidenta y Decana Académica

CELIA O. TREJOS RAMOS

Directora Departamento de Ciencia y Producción Agropecuaria

HUGO ZAVALA MEMBREÑO

Secretario General

Contenido

Índice de Cuadros.....	4
Índice de Figuras	5
Resumen	6
Abstract.....	7
Introducción.....	8
Materiales y Métodos	13
Fuente de Material Vegetal	13
Desinfección de Hojas de Cacao	13
Establecimiento <i>in vitro</i> de los Explantes	14
Experimento I: Establecimiento	15
Medio de Cultivo para Establecimiento.....	15
Variables Evaluadas en Establecimiento.....	17
Experimento II: Proliferación de Callo	17
Medio de Cultivo para Proliferación de Callo	17
Variables Evaluadas en Proliferación	19
Incubación.....	20
Resultados y Discusión.....	21
Establecimiento <i>in vitro</i> de los Explantes Foliares.....	21
Formación de Estructuras Callogénicas en Explantes Foliares de Cacao del Híbrido CCN-51.....	21
Etapas I: Inducción a la Formación de Callo en los Explantes Foliares.....	21
Etapas II. Proliferación de Callo.....	24
Conclusiones	26
Recomendaciones	27
Referencias.....	28

Índice de Cuadros

Cuadro 1. Medio basal modificado de Murashige y Skoog usado para el establecimiento in vitro de láminas foliares.	16
Cuadro 2. Reguladores de crecimiento en dos tratamientos usados como suplementación del medio MS para la inducción de callos en cacao CCN-51.....	16
Cuadro 3. Escala para la evaluación de callo in vitro en hojas de cacao (Theobroma cacao L.) CCN-51.	17
Cuadro 4. Medio de cultivo de Lloyd y McCown (WPM) para la proliferación de callo a partir de láminas foliares de cacao CCN-51.	18
Cuadro 5. Reguladores de crecimiento suplementados al medio WPM para la proliferación de callos de cacao CCN-51.	19
Cuadro 6. Porcentaje de callo en explantes foliares de cacao del híbrido CCN-51 por cada tratamiento evaluado y número de bordes con callo obtenido a los 30 días.....	22
Cuadro 7. ANOVA del Efecto de los reguladores de crecimiento en la formación de callo secundario, color y grado de explantes foliares de cacao.....	24
Cuadro 8. Grado de callo expresado en % en etapa II para la inducción a callos embriogénicos a partir de explantes foliares de cacao del híbrido CCN-51.	25

Índice de Figuras

Figura 1. Hoja de cacao joven libre de daños mecánicos o daños por insecto, o contaminada por alguna enfermedad.	14
Figura 2. Proceso de corte y establecimiento de los explantes foliares de cacao del híbrido CCN-51 en el medio de cultivo. A) cortes de los bordes a la hoja. B) medida aproximada de 1cm por 1cm de los explantes foliares. C) porción de lámina foliar usada para extraer explantes en el centro.	15
Figura 3. Criterio para la evaluación de callo en cacao CCN-51. (A) Ligera formación grado A 1, (B) Formación desde la cuarta parte a la mitad del explante grado B 2, (C) Formación de callo desde la mitad del explante hasta tres cuartas partes grado C 3, (D) Abundante formación de callo grado D 4.	17
Figura 4. Escala para la evaluación de proliferación de callo a los 20 días del cambio de medio de MS a WPM suplementados con reguladores de crecimiento. A) Proliferación de callo de 1%-25%, B) 26%-50%, C) 51%-75%, D) 76%-100%.	19
Figura 5. Primeros callos en los explantes foliares de cacao del híbrido CCN-51 en los tratamientos TDZ (A) y 2BA (B).	21
Figura 6. Respuesta a los 30 días de los explantes foliares de cacao del híbrido CCN-51 sometidos a los diferentes tratamientos. A) TDZ; B) 2BA.	23

Resumen

El cacao (*Theobroma cacao* L.) es uno de los cultivos más importantes de América Latina genera 1.5 millones de empleos. La propagación convencional no satisface la demanda de material genético mejorado, esto se podría lograr por medio de la propagación *in vitro*. El objetivo de esta investigación fue definir la combinación de reguladores de crecimiento apropiada para la generación de callo a partir de explantes foliares de cacao del híbrido CCN-51 mediante la combinación de reguladores de crecimiento en dos etapas de la propagación *in vitro*. Se evaluó el porcentaje de crecimiento del callo, los números de bordes con callo, crecimiento de callo secundario y el grado de desarrollo del callo. Se realizó un ANOVA con comparación de medias por Duncan ($P \leq 0.05$). Como resultados de esta investigación en la etapa de establecimiento en el medio Murashige y Skoog (MS) suplementado con Thidiazuron (TDZ) 0.002 mg/L se obtuvo un 73% de explantes con callo, además obtuvo una media de 2.58 bordes con callo en los explantes. En la etapa de proliferación el medio Lloyd y McCown (WPM) suplementado con 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) 1.98 mg/L + kinetina 0.30 mg/L y el medio suplementado con 2,4-D 1.98 mg/L dieron mejores resultados ($P = 0.0090$) que el testigo que no contenía reguladores de crecimiento.

Palabras claves: alogámica, explantes, in vitro, meristemas, propagación.

Abstract

Cocoa (*Theobroma cacao* L.) is one of the most important crops in Latin America because it generates 1.5 million jobs. Conventional propagation does not meet the demand for improved genetic material, this could be achieved through *in vitro* propagation. The objective of this research was to define the appropriate combination of growth regulators for callus generation from cocoa leaf explants of the CCN-51 hybrid by combining growth regulators in two stages of *in vitro* propagation. The percentage of callus growth, numbers of edges with callus, secondary callus growth and degree of callus development were evaluated. An ANOVA with comparison of means by Duncan ($P \leq 0.05$) was performed. As results of this research in the establishment stage in the Murashige and Skoog (MS) medium supplemented with Thidiazuron (TDZ) 0.002 mg/L, 73% of explants with callus were obtained, besides obtaining an average of 2.58 edges with callus in the explants. In the proliferation stage, the Lloyd and McCown medium (WPM) supplemented with 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) 1.98 mg/L + kinetin 0.30 mg/L and the medium supplemented with 2,4-D 1.98 mg/L gave better results ($P = 0.0090$) than the control that did not contain growth regulators.

Keywords: allogamous, explants, *in vitro*, meristems, propagation.

Introducción

El cacao (*Theobroma cacao* L.) es un cultivo originario del trópico húmedo de Mesoamérica perteneciente a la familia de las Malváceas. Los responsables de cultivar cacao de calidad con cualidades aromáticas denominado criollo fueron poblaciones mesoamericanas, y los responsables de domesticar esta especie fueron los Olmecas y los Mayas lo usaron como medicina, alimento e incluso como moneda (Laviana Cuetos 2009).

La actividad cacaotera tiene un importante impacto en los países productores como Costa de Marfil el mayor exportador del mundo mientras que en Latino América: Brasil, Ecuador, República Dominicana y Perú son los mayores exportadores de la región. Este rubro representa el modo de vida de más de 150,000 agricultores y genera alrededor de 1,500,000 empleos directos en las etapas de producción, procesamiento y comercialización. La producción de cacao en América abarca una superficie superior a 1,700,000 hectáreas y genera flujos comerciales superiores a los 900 millones de dólares de exportaciones anuales (Arvelo et al. 2021).

El cacao es uno de los cultivos alimenticios que desde el punto de vista tecnológico e industrial ha tenido un avance más lento. Quizás una de las razones se debe a que es cultivado por pequeños agricultores que manejan áreas que no son muy representativas. Otra razón es la autocompatibilidad genética que lo caracteriza, dado que este es uno de los principales problemas para lograr una alta producción, la autocompatibilidad genética en el cacao en algunos casos alcanza hasta un 5%, es decir son pocas las variedades y cultivares que poseen la capacidad para auto polinizarse o recibir polen de otras plantas, esto se atribuye debido a su condición de alogamia (Arvelo et al. 2021).

Las principales variedades de cacao que existen se dividen en cacao Forastero, cacao Criollo, cacao Trinitario y el cacao Arriba (Nacional), este último siendo característico del país Ecuador que posee características de ser cacao fino y de aroma. A partir de estas variedades han surgido muchos híbridos que poseen características de resistencia a enfermedades y alta producción (Soria 1966).

El híbrido CCN-51 (Colección Castro Naranjal 51) es el más utilizado a nivel mundial, ya que posee resistencia a enfermedades como la escoba de bruja que es producida por el hongo *Moniliophthora perniciosa*, una producción de 2,200 a 2,700 kg por hectárea al año de grano de cacao siendo superior a la mayoría de genotipos en donde la producción promedio es de 900 a 1000 kg por hectárea al año, esto es gracias a que posee la característica de ser auto compatible y su adaptabilidad a las diferentes zonas climáticas. Este híbrido fue desarrollado por el botánico Homero Castro en la ciudad de Naranjal, Ecuador en la década de 1960, el mismo que resultó de una triple cruza entre (IMC-67 X ICS-95) × Canelo (Oriente 1) otorgándole características de cacao Forastero, Trinitario y Criollo (Jaimez et al. 2022).

Los sistemas tradicionales de propagación vegetativa han sido herramientas importantes para multiplicar genotipos seleccionados de cacao, por la habilidad para fijar los atributos de interés; sin embargo, estos medios no han sido suficientes para cubrir la demanda de material genético mejorado. Por ello la importancia de la propagación de variedades y genotipos que posean características de autocompatibilidad, resistencia a enfermedades y que sean altamente productivos.

El método más común es la propagación sexual por medio de la selección de semillas, esto ha generado una alta diversidad genética en las plantaciones siendo así una desventaja debido a que no se puede homogenizar la producción. Como alternativa para evitar la variabilidad genética se ha implementado la propagación asexual utilizando la técnica de injertos que tiene la finalidad de multiplicar árboles con las mejores características, para conservar los genes de interés (Peña López 2019).

Otro método de propagación asexual es el de enraizamiento de estacas o ramillas de un árbol seleccionado con hojas adultas sanas, con vigor, color pardo y sin flores, permitiendo mantener las características tanto productivas como de resistencia de las plantas donantes. Este sistema es ampliamente utilizado en Ecuador y principalmente en Brasil. En este último país se ha reportado

multiplicaciones masivas a escala semiindustrial en instalaciones con alta capacidad de producción (Solano 2008).

Ambos métodos de propagación vegetativa presentan eficiencia variable, requieren de jardines clonales para producir suficiente material para la propagación y usualmente un alto costo por la planta obtenida. Como resultado de programas de mejoramiento, existe una cantidad considerable de genotipos mejorados, que son eficientes desde el punto de vista económico y agronómico (Gómez Medrano 2010).

Consecuentemente, es necesario considerar que la técnica de cultivo de tejidos es una metodología rápida y eficiente de propagación vegetativa, con la cual es posible producir masivamente plantas libres de enfermedades, y con características genéticas deseadas. La misma consiste en cultivar de manera aséptica tejidos, órganos y células en ambiente controlado y libres de microorganismos que puedan contaminar (Abdelnour y Vincent 1994; Calva y Ríos 1999). Esta técnica es basada en el principio de la totipotencia que tienen las células, que indica que todas las células vegetales contienen una copia íntegra del material genético de la planta a la que pertenecen, no importa la posición o la función que desempeñe, gracias a esto posee el potencial para regenerar una nueva planta completa (Feri y Paul 2000). Además, proporcionaría la ventaja de evitar el mantenimiento de huertos clonales que poseen altos costos de mantenimiento, produciendo un alto número de plantas con las características de las plantas donantes que deseamos en nuestra plantación y con menor uso de material vegetativo en comparación con las técnicas de injerto y enraizamiento.

En el año 1950 se descubrieron que las citoquininas eran las encargadas de la proliferación celular y promotores de crecimiento de los tejidos vegetales que eran cultivados *in vitro* (Mok D y Mok MC. 2001). Además, que al ser usada en altas concentraciones en un medio de cultivo induce a la formación de yemas múltiples (García et al. 2008).

Una de las vías de regeneración de plantas *in vitro* es la embriogénesis somática, esta es definida como la formación de un embrión sin que exista la necesidad de la fusión de dos gametos, es

decir que a partir de células somáticas se formen embriones cigóticos, estos a su vez pueden generar plantas completas donde el genotipo de la planta donante se conserva íntegramente, dando origen a una clonación (Freire Seijo 2003).

La embriogénesis somática es considerada la vía de regeneración de plantas más eficiente, ya que se logra producir masivamente plantas *in vitro* debido a la naturaleza bipolar del embrión. Las ventajas que proporciona este proceso son, que existe la capacidad para automatizar todo el proceso productivo con el uso de biorreactores, elevar los coeficientes de multiplicación en un periodo relativamente corto y la posibilidad de obtener semillas artificiales. Las desventajas de este procedimiento son que la dificultad de repetir exitosamente los protocolos y que es altamente dependiente del genotipo y explante (Freire Seijo 2003).

En cacao la embriogénesis somática ha tenido poco estudio, entre los explantes usados están los estaminoides, pétalos, porciones de hojas, meristemas, con el uso de reguladores de crecimientos. En la mayoría de los casos sin obtener resultados positivos, algunos estudios han reportado obtener las plantas ya aclimatadas, pero no se han visto investigaciones en donde se demuestre la eficiencia de estas en el campo.

Los reguladores de crecimiento son sustancias sintetizadas químicamente que pueden alterar la expresión genética o el patrón de crecimiento de las células, promueven la división celular, además poseen la capacidad para imitar el rol de las fitohormonas (Alcantara Cortes et al. 2019). Los reguladores de crecimiento que se usaron en esta investigación son: ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), thidiazuron (TDZ), kinetina, ácido naftaleneacético (ANA) y 6-Bencilaminopurina (BAP).

Las auxinas inducen la formación y elongación de tallos, aumenta la dominancia apical y la producción de raíces adventicias. A nivel celular son promotores de la división celular meristemática, aumentan la capacidad permeable celular, permiten la diferenciación celular y disminuyen la presión de la pared celular (Alcantara Cortes et al. 2019). El 2,4-D pertenece al grupo de las auxinas y en cultivo *in vitro* de tejidos es frecuentemente usado para la inducción a formación de callos (Žur et al. 2015).

El ANA perteneciente al mismo grupo de auxinas en cultivos *in vitro* promueven directamente la embriogénesis (Seguí Simarro 2016), además estimula células indiferenciadas que promueven la iniciación de enraizamiento o emergencia de raíces adventicias (Woodward y Bartel 2005).

Las citoquininas se producen en mayor abundancia en las células de los ápices radiculares, inducen elongación de las raíces, además, estimulan la generación de los brotes axilares. A nivel celular aumentan la división celular (Alcantara Cortes et al. 2019). La kinetina y el BAP pertenece al grupo de las citoquininas que su función en propagación *in vitro* es inducir a la formación de callos y regenerar los tejidos de plantas a partir de callos, además de la inducción de múltiples brotes (Bennett 1994).

El thidiazuron (TDZ) se asocia a las citoquininas y auxinas, en cultivos *in vitro* se usa para estimular el crecimiento de brotes y favorecer a la formación de raíces, además induce la síntesis y acumulación de citoquininas endógenas (Zahoor y Fahem 2009).

La importancia de este estudio radica en la necesidad de los agricultores de obtener plantas de cacao del híbrido CCN-51 de una manera más eficiente, en donde las características que posean los clones sean las mismas productivamente a una planta donante elegida previamente por sus capacidades de alta producción y adaptabilidad a la zona, además de obtener plantas libres de enfermedades y a un menor costo. De esta manera los productores podrán planificar mejor sus siembras o renovaciones del cultivo, teniendo la seguridad que obtendrán plantas de excelente calidad productiva y libre de patógenos y enfermedades que las puedan afectar.

El objetivo de este estudio fue definir la combinación de reguladores de crecimiento apropiados para la generación de callo *in vitro* a partir de explantes foliares de cacao CCN-51.

Materiales y Métodos

Ubicación del Estudio

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

Fuente de Material Vegetal

Los explantes se obtuvieron del cultivar de cacao CCN-51 del huerto clonal de cacao que fue establecido por la unidad de Frutales de la Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano. El mismo se encuentra ubicado en el lote La Vega 1, en la Zona de Las Vegas, Monte Redondo. Este huerto clonal tiene su origen de los viveros de la FHIA del centro Experimental Demostrativo de Cacao (CEDEC), La Másica, Atlántida, Honduras.

Las hojas de cacao fueron recolectadas en las horas de la mañana y cortadas de manera aséptica con tijeras de podar. Para la obtención de estas el procedimiento consiste limpiar la hoja aún en la planta con papel toalla para quitarle el polvo o cualquier suciedad, una vez limpia procedemos a hacer el corte en el pedúnculo de la hoja separándola de la rama, posteriormente procedemos a guardarla en una bolsa que nos servirá para trasladarla al laboratorio.

Desinfección de Hojas de Cacao

Se usó hojas jóvenes de 10 cm o más de largo y 5 cm o más de ancho y el color rojizo o verde pálido, de edad aproximada será de 3-7 semanas. Las hojas no deben estar infestadas con insectos y no deben haber sufrido algún daño causado por insectos o patógenos (Figura 1).

Para la desinfección se siguió la metodología descrita por Fernández (2018) que indican que previo a la desinfección de los explantes se eliminará 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 sumergió los explantes en una solución de hipoclorito de sodio (NaClO) al 20% volumen/volumen (Ingrediente activo 4.72 %),

con 2 gotas/100 mL de Tween 80® por 20 minutos. Transcurridos los 20 minutos los explantes se llevaron a la cámara de flujo laminar, donde se realizó un triple lavado con agua destilada estéril con el fin de remover el NaClO residual.

Figura 1

Hoja de cacao joven libre de daños mecánicos o daños por insecto, o contaminada por alguna enfermedad.

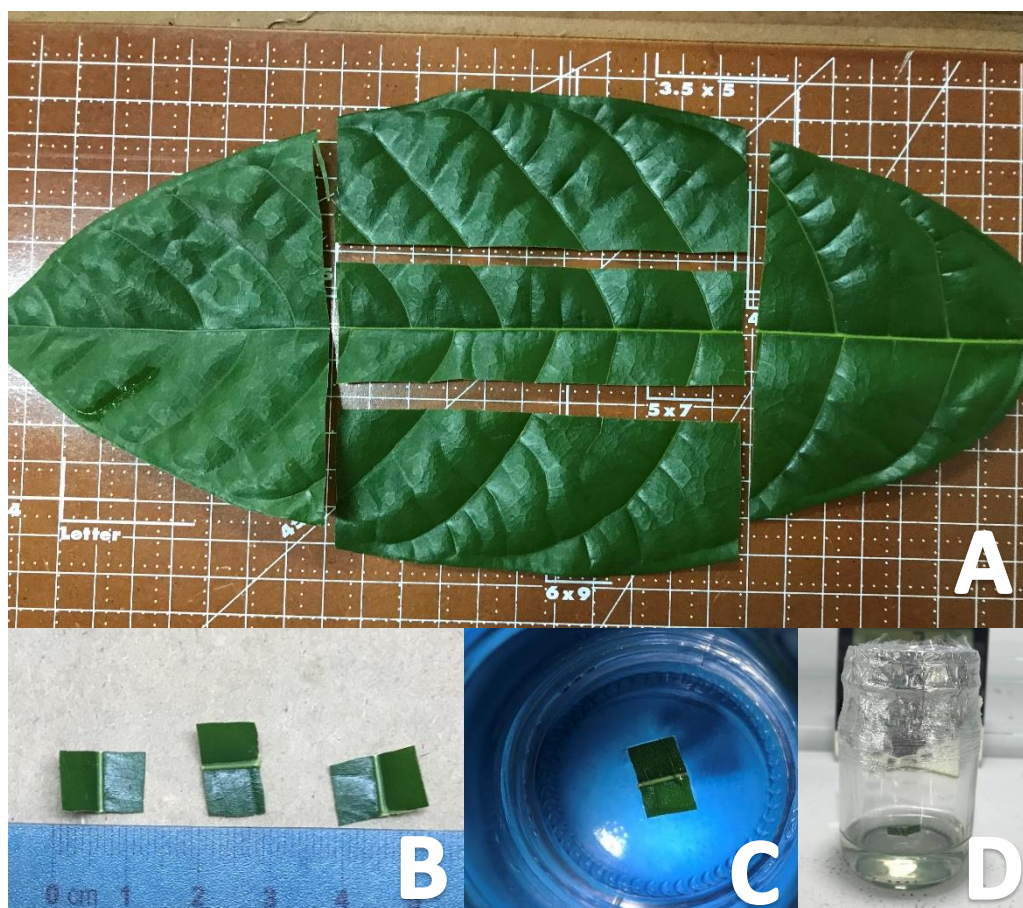


Establecimiento *in vitro* de los Explantes

Una vez desinfectadas las hojas ya en la cámara de flujo laminar se procedió a realizar cortes con la ayuda del bisturí a tal manera que sean de un tamaño aproximadamente 1 cm × 1 cm, luego con la pinza estéril se colocó los explantes en el medio de cultivo estéril con el envés de la hoja en contacto con el medio, los explantes se colocaron uno por frasco en el centro del frasco (Figura 2).

Figura 2

Proceso de corte y establecimiento de los explantes foliares de cacao del híbrido CCN-51 en el medio de cultivo. A) cortes de los bordes a la hoja. B) medida aproximada de 1cm por 1cm de los explantes foliares. C) porción de lámina foliar usada para extraer explantes en el centro.



Experimento I: Establecimiento

Medio de Cultivo para Establecimiento

Se usó el medio de cultivo de Murashige y Skoog (MS) (Cuadro 1) para el establecimiento de láminas foliares de cacao del híbrido CCN-51. Este medio fue suplementado con reguladores de crecimiento según el tratamiento a evaluar.

Cuadro 1

Medio basal modificado de Murashige y Skoog usado para el establecimiento in vitro de láminas foliares.

Componentes	Fórmula	Nombre común	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	0.100
		Piridoxina	0.500
		Ácido Nicotínico	0.500
Carbohidratos		Sacarosa	30000.000

Nota. Adaptado de CIAT (1991)

Tratamientos Evaluados en Establecimiento

Los tratamientos que se evaluaron fueron el medio basal MS suplementado con TDZ y con 2,4-D +BAP + ANA 0.5 mg/L (Cuadro 2).

Cuadro 2

Reguladores de crecimiento en dos tratamientos usados como suplementación del medio MS para la inducción de callos en cacao CCN-51.

Tratamiento	Regulador de crecimiento	mg/L
TDZ	TDZ	0.002
2BA	2,4-D+ BAP+ ANA	0.5 + 0.5 + 0.5

Variables Evaluadas en Establecimiento

Se evaluó el porcentaje de crecimiento del callo, los números de bordes en los crece el callo mediante una escala (Cuadro 3 y Figura 3). La evaluación se realizó a los 30 días.

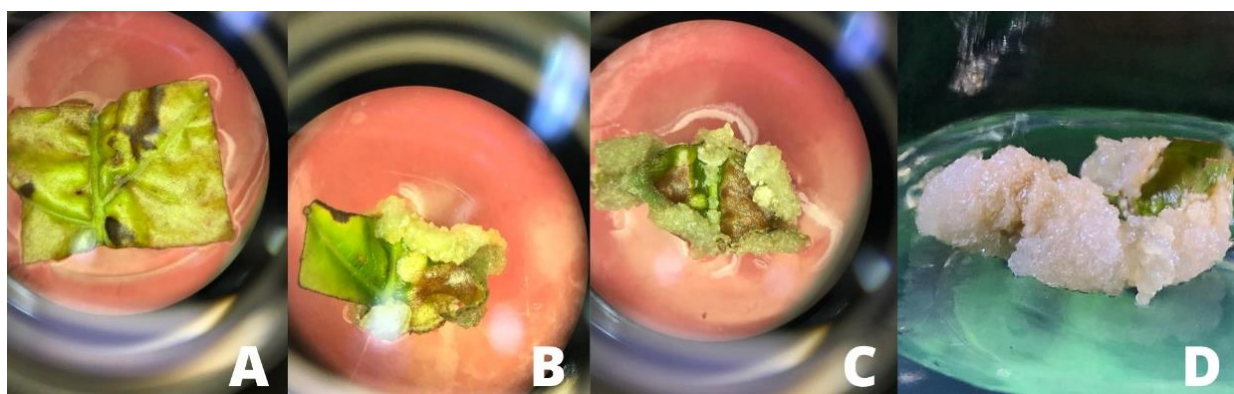
Cuadro 3

Escala para la evaluación de callo in vitro en hojas de cacao (Theobroma cacao L.) CCN-51.

Grado de desarrollo	Descripción
A	Ligera formación de callo.
B	Formación de callo desde la cuarta parte a la mitad del explante.
C	Buena Formación de Callo: en tres cuartas partes del explante.
D	Abundante y voluminosa formación de Callo en todo el explante.

Figura 3

Criterio para la evaluación de callo en cacao CCN-51. (A) Ligera formación grado A 1, (B) Formación desde la cuarta parte a la mitad del explante grado B 2, (C) Formación de callo desde la mitad del explante hasta tres cuartas partes grado C 3, (D) Abundante formación de callo grado D 4.



Experimento II: Proliferación de Callo

Medio de Cultivo para Proliferación de Callo

A los 30 días de haber realizado la siembra de los explantes foliares estos se transfirieron al medio basal de Lloyd y McCown (WPM) (Cuadro 4). Este medio fue suplementado con reguladores de crecimiento según el tratamiento a evaluar.

Cuadro 4

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 ₄ NO ₃	Nitrato de amonio	400.000
	CaCl ₂ ·2H ₂ O	Cloruro de calcio dihidratado	96.000
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	Sulfato de magnesio heptahidratado	370.000
	KH ₂ PO ₄	Sulfato de potasio	170.000
	Ca [NO ₃] ₂ · 4H ₂ O	Nitrato de calcio tetrahidratado	556.000
	K ₂ SO ₄	Fosfato de potasio	990.000
Microelementos	H ₃ BO ₃	Ácido bórico	6.200
	MnSO ₄ ·4H ₂ O	Sulfato de manganeso tetrahidratado	22.300
	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	Sulfato de Zinc heptahidratado	8.600
	NaMoO ₄ ·2H ₂ O	Molibdato de sodio bihidratado	0.025
	CuSO ₄ ·5H ₂ O	Sulfato de cobre petrahidratado	0.025
	FeSO ₄ ·7H ₂ 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 CIAT (1991)

Tratamientos Evaluados en Proliferación

Los tratamientos consistieron en suplementar el medio de crecimiento WPM con 2,4-D y Kinetina (Cuadro 5).

Cuadro 5

Reguladores de crecimiento suplementados al medio WPM para la proliferación de callos de cacao CCN-51.

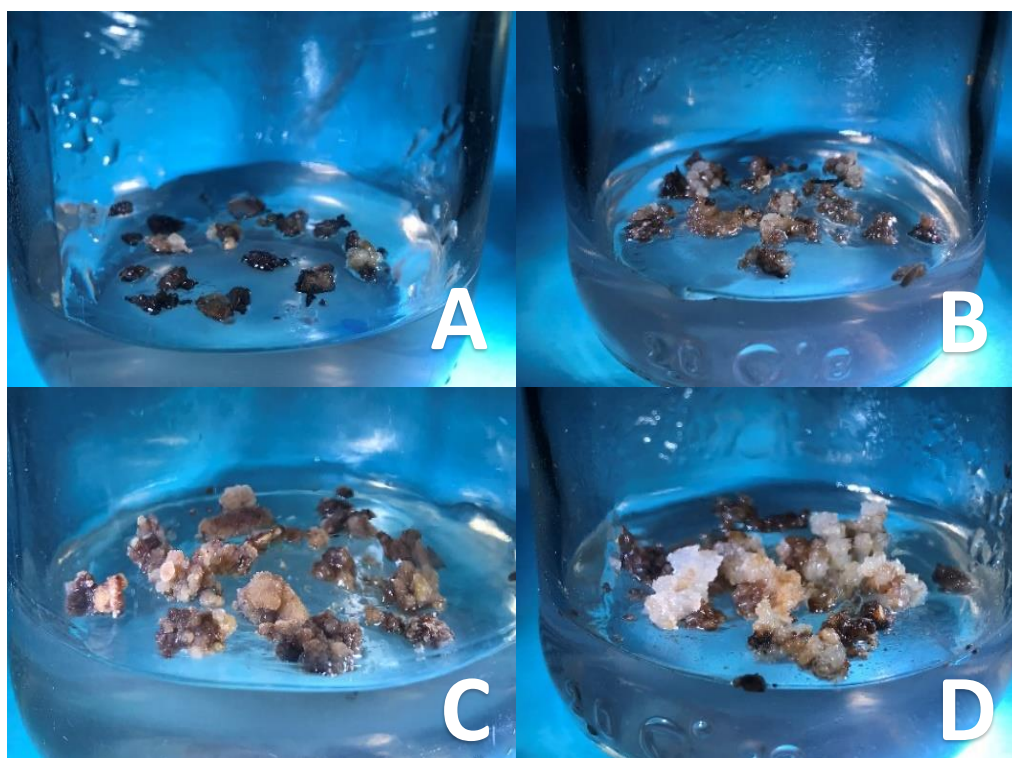
Tratamiento	Regulador de crecimiento	mg/L
SRC	ninguno	0.00
2K	2,4-D + Kinetina	1.98 + 0.30
2	2,4-D	1.98

Variables Evaluadas en Proliferación

Trascurrido 20 días se procedió a realizar la evaluación de la proliferación del callo secundario, para la cual se realizó una caracterización, tomando en cuenta color, estructura, formación de callo secundario y grado de callo que para este se elaboró una escala descrita en la Figura 4, que mide la proliferación del callo en porcentajes, basándose en el área cubierta por la proliferación de callo en base a 100%.

Figura 4

Escala para la evaluación de proliferación de callo a los 20 días del cambio de medio de MS a WPM suplementados con reguladores de crecimiento. A) Proliferación de callo de 25%, B) 50%, C) 75%, D) 100%.



Incubación

Los cultivos fueron incubados en luz durante 16 horas y 8 horas de oscuridad, a excepción de los tratamientos con 2,4-D que se mantuvieron en total oscuridad. La temperatura fue de 21°C y humedad relativa de 30%.

Diseño Experimental y Análisis Estadístico

Se realizó un diseño experimental completamente al azar, se evaluaron dos tratamientos con 50 repeticiones, un Análisis de Varianza (ANOVA) con comparación de medias por Duncan con una probabilidad ≤ 0.05 , se usó el programa estadístico InfoStat para el análisis de datos.

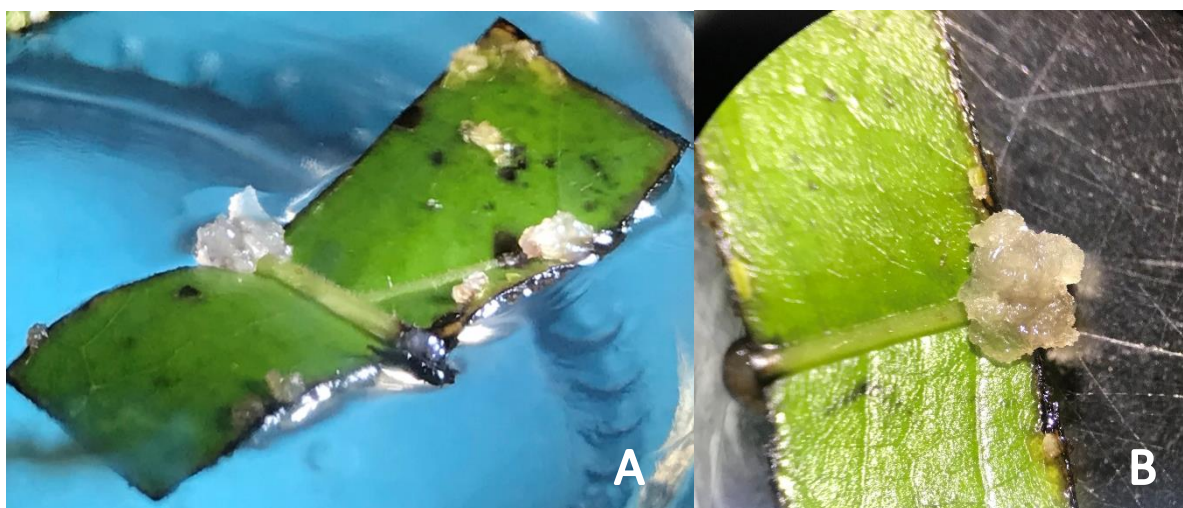
Resultados y Discusión

Establecimiento *in vitro* de los Explantes Foliares

El establecimiento *in vitro* para cacao CCN-51 fue de 42%. La primera reacción que se logró observar en los explantes se dio a partir del séptimo día, que consistió en que los explantes empezaron a arrugarse desde los bordes hacia adentro. Los primeros indicios de callo empezaron a surgir a los 20 días después de haber realizado la siembra (Figura 5), se observaron estructuras granulares traslúcidas que empezaron a salir de la nervadura central o las laterales.

Figura 5

Primeros callos en los explantes foliares de cacao del híbrido CCN-51 en los tratamientos TDZ (A) y 2BA (B).



Formación de Estructuras Callogénicas en Explantes Foliares de Cacao del Híbrido CCN-51

Etapas I: Inducción a la Formación de Callo en los Explantes Foliares

A los 30 días de haber realizado la siembra se pudo observar la presencia de callos en los explantes, con mayor presencia en el tratamiento TDZ presentando el 73% de explantes con callo, a diferencia del 2BA que presentó un 20% de explantes con callos (Cuadro 6). Estos resultados concuerdan con la investigación de Fernández (2018) en la cual usó TDZ a dosis de 0.002 mg/L en

explantos foliares de cacao, además determinó que a esa dosis aumenta el tamaño del callo de una manera más acelerada. Los explantes foliares en el medio con TDZ den promedio formaron callo en 2.58 cada explante, siendo superior estadísticamente ($P < 0.0001$) al tratamiento 2BA (Cuadro 6). Estos resultados concuerdan con Li et al. (1998) que el TDZ tiene efectos en producción de callo en diferentes genotipos de cacao, comprobando así en este estudio que tienen los mismos efectos para el híbrido CCN-51.

Cuadro 6

Porcentaje de callo en explantes foliares de cacao del híbrido CCN-51 por cada tratamiento evaluado y número de bordes con callo obtenido a los 30 días.

Tratamiento	% de explantes con callo	Bordes con formación de callo
TDZ	73 ^a	2.58 ^a
2BA	20 ^b	0.3 ^b
p-valor	<0.0001	<0.0001
CV	2.6	6.24
R ²	0.28	0.38

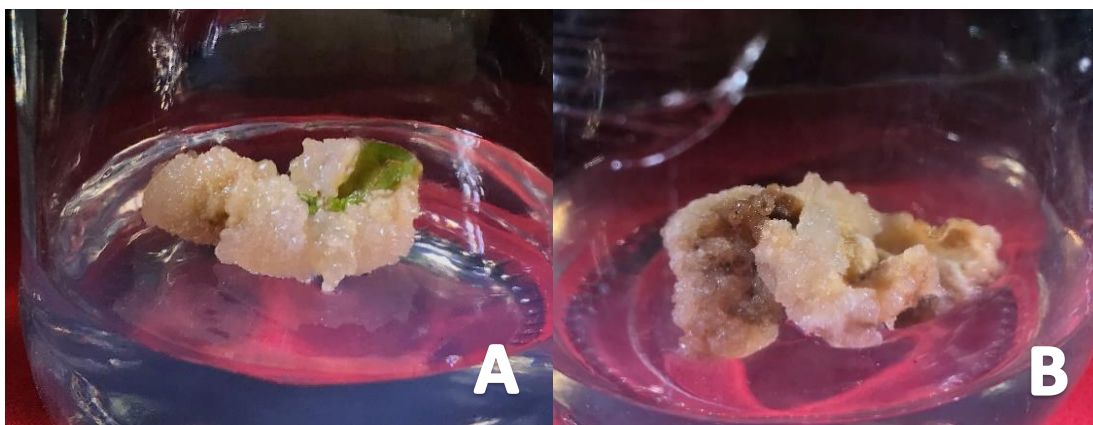
Li et al. (1998) determinaron que el TDZ es óptimo para la inducción efectiva de embriones somáticos, ya que probaron 19 genotipos diferentes de cacao con los que descubrieron que existía una gran variación para la formación de callo entre cada genotipo, aun siendo así, el TDZ resultó ser el mejor regulador de crecimiento para la inducción de callo. Cabe recalcar que dentro de los genotipos que usaron no se encuentra el híbrido CCN-51 y los explantes que usaron para la siembra fueron estaminoides mientras que los que se usaron en este estudio fueron láminas foliares.

En cambio Calderón y Montes (2017) reportan que el uso del regulador de crecimiento 2-4D es más efectivo en estaminoides, mientras que en esta investigación el uso de 2-4D con BAP y ANA resultó un 53% más bajo comparado con el tratamiento de TDZ en producción de callos provenientes de láminas foliares.

Los callos presentaron un color translúcido con indicios de una tonalidad amarilla cremosa y una estructura granular compacta para ambos tratamientos, dando paso a que se observara la presencia de callo con características embriogénicas en ambos tratamientos (Figura 5). Estos resultados son respaldados por Chantásig Vaca (2004) quien en su investigación obtuvo callos con las formas similares a las de este estudio y un color cristalino lo cual lo llevó a determinar que eran estructuras embriogénicas mediante cortes histológicos.

Figura 6

Respuesta a los 30 días de los explantes foliares de cacao del híbrido CCN-51 sometidos a los diferentes tratamientos. A) TDZ; B) 2BA.



Etapas II. Proliferación de Callo.

Según Minyaka et al. (2004) la embriogénesis primaria en cacao comprende de tres etapas: inducción de callo primario, inducción de callo secundario y desarrollo de callos embriogénicos. En la etapa II de este estudio (proliferación o inducción de callo secundario) luego de los 20 días en el que los callos fueron sembrados en el medio WPM suplementados con reguladores de crecimiento y el testigo, se realizó la caracterización de estos para determinar la eficiencia en los diferentes tratamientos. Se observó que el medio de cultivo y los reguladores de crecimiento solo tienen efecto significativo para la variable grado (Cuadro7).

Cuadro 7

ANOVA del Efecto de los reguladores de crecimiento en la formación de callo secundario, color y grado de explantes foliares de cacao.

Tratamientos en cada etapa / Variable	p-value Formación de callo secundario	p-value Grado	p-value Color
Establecimiento	0.3115	0.3956	0.9652
Proliferación	0.1544	0.0090	0.1088
Establecimiento * Proliferación	0.2645	0.1466	0.0955
CV	1.90	18.96	10.57
R ²	0.15	0.26	0.13

En la etapa de proliferación la variable de color no obtuvo una diferencia significativa, ya que los colores que predominaban en los callos iban desde traslúcidos a tornarse en colores un poco cremosos hasta amarillos. Lo mismo que concuerda con la investigación realizada por Chantásig Vaca (2004) en donde determina que el color del callo va a variar según la etapa en la que esté, además que la coloración se vuelve a tornar un poco más clara cada vez que una nueva capa de callo recubre el explante.

Un estudio similar en el cultivo de plátano que fue realizado por García-Águila et al. (2013) en donde determinan que la forma de los callos que obtuvieron fueron globulares con un color amarillo

y una tonalidad marrón en la base de los explantes, otorgándole estas características a la oxidación fenólica.

La formación de callo secundario no depende de los reguladores de crecimiento, sin embargo, los tratamientos si tienen efecto ($P = 0.0090$) en el grado de callo (Cuadro 8). En la etapa de proliferación los tratamientos con 2,4-D mejores comparados con el Testigo que no contenía reguladores de crecimiento. Por lo que es necesario suplementar los medios con este regulador para la proliferación de callos para de esta manera lograr los mejores resultados.

Según Chantásig Vaca (2004) en la proliferación de callos influyen variables como el genotipo, el explante y medio de cultivo (fuente de carbono, concentración y las citoquininas), siendo esta última probada por Lopez Baez et al. (1993) en donde señalan que la Kinetina en combinación con el 2,4-D mejora la respuesta del explante respecto a la formación de callo.

Cuadro 8

Grado de callo expresado en % en etapa II para la inducción a callos embriogénicos a partir de explantes foliares de cacao del híbrido CCN-51.

Tratamiento	% Formación de callo
SRC	40.38 ^b
2K	62.65 ^a
2	73.54 ^a
P	0.0090
CV	18.96
R ²	0.26

Conclusiones

El medio MS suplementado con TDZ 0.002 mg/L es el mejor para la inducción de callos primarios en los explantes foliares de cacao del híbrido CCN-51.

El medio WPM debe ser suplementado con reguladores de crecimiento 2,4-D 1.98 mg/L para poder obtener resultados en la producción de callo secundario con un índice de grado satisfactorio.

Recomendaciones

Al escoger la planta madre se le debe dar el correcto manejo fitosanitario para lograr una mayor cantidad de explantes establecidos en el laboratorio.

Dar continuación al estudio hasta lograr obtener plantas listas para sembrar en campo y de esa manera poder evaluar su eficiencia.

Referencias

- Abdelnour A, Vincent J. 1994. Conceptos básicos del cultivo de tejidos vegetales. Turrialba, Costa Rica: CATIE. https://repositorio.catie.ac.cr/bitstream/handle/11554/888/Conceptos_basicos_del_cultivo_de_tejidos_vegetales.pdf?sequence=1&isAllowed=y.
- Alcantara Cortes JS, Acero Godoy J, Alcántara Cortás JD, Sánchez Mora RM. 2019. Principales reguladores hormonales y sus interacciones en el crecimiento vegetal. Nova. 17:109–129. es. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1794-24702019000200109&nrm=iso.
- Arvelo M, Gonzales D, Maroto S, Delgado T, Montoya P. 2021. Manual técnico del cultivo de cacao: prácticas latinoamericanas. [sin lugar]: [sin editorial]. <https://repositorio.iica.int/handle/11324/6181>.
- Bennett I. 1994. Alternating Cytokinins in Multiplication Media Stimulates in Vitro Shoot Growth and Rooting of *Eucalyptus globulus* Labill. Ann Bot. 74(1):53–58. doi:10.1006/anbo.1994.1093.
- Calderón HO, Montes ME. 2017. Micro propagación de variedades nativas de cacao (*Theobroma cacao*) mediante embriogénesis somática. Producción Agropecuaria y Desarrollo Sostenible. 6:87–95. doi:10.5377/payds.v6i0.5721.
- Calva CG, Ríos LE. 1999. Cultivo de callos y acumulación de metabolitos secundarios. [sin lugar]: [sin editorial].
- Chanatásig Vaca CI. 2004. Inducción de la embriogénesis somática en clones superiores de cacao (*Theobroma cacao* L.), con resistencia a enfermedades fungosas. Turrialba, Costa Rica: CATIE. es. <https://repositorio.catie.ac.cr/handle/11554/2391>.
- [CIAT] Centro Internacional de la Agricultura Tropical. 1991. Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y Aplicaciones. Cali, Colombia: CIAT. 1039 p. 151 vol. <https://cgspace.cgiar.org/handle/10568/53954>.
- Ferl R, Paul A. 2000. Genome organization and expression. En: Buchanan B, Gruissem W, Jones R. Biochemistry and Molecular Biology of Plants. En: American Society of Plant Physiologists, 312–357 p. [sin lugar]: [sin editorial].
- Fernández F. 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. Honduras: Escuela Agrícola Panamericana Zamorano. 23 p. <http://hdl.handle.net/11036/6314>.
- Freire Seijo M. 2003. Aspectos básicos de la embriogénesis somática. Biotecnología Vegetal. 3:195–209.
- García L, Raúl Collado, Idalmis Bermúdez-Caraballosa, Novisel Veitía, Damaris Torres, Carlos Romero. 2008. Regeneración de plantas vía organogénesis directa en *Phaseolus vulgaris* L. Biotecnología Vegetal. 8(2). es. <https://revista.ibp.co.cu/index.php/bv/article/view/344>.
- García-Águila L, Sarriá Z, Reyes M, Gómez-Kosky R, Pérez B, Concepción A. 2013. Efecto de la posición del brote floral masculino sobre la formación de callos y establecimiento de suspensiones celulares embriogénicas de plátano cv. 'FHIA-21' (Musa AAAB). Biotecnología Vegetal; [consultado el 31 de may. de 2022]. (13). <https://www.semanticscholar.org/paper/Efecto-de-la-posici%C3%B3n-del->

brote-floral-masculino-la-Garc%C3%ADa-%C3%81guila-Sarr%C3%ADa/
e8df04740e21c26e53e052c8c9d0b7d9d8af3b46.

- Gómez Medrano S. 2010. Evaluación de la propagación in vitro en cinco clones promisorios de cacao (*Theobroma cacao* L.). [Tesis]. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala. 88 p; [consultado el 1 de jun. de 2022]. <http://www.repositorio.usac.edu.gt/7139/>.
- 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. *National Library of Medicine*. 10:e12676. eng. doi:10.7717/peerj.12676.
- Laviana Cuetos ML. 2009. Investigación e Integración. La Ruta del Cacao en América Latina. Tierra Firme; [consultado el 8 de jun. de 2022]. 100. <https://digital.csic.es/handle/10261/26636>.
- Li Z, Traore A, Maximova S, Gultinan M. 1998. Somatic embryogenesis and plant regeneration from floral explants of cacao (*Theobroma cacao* L.) using thidiazuron. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*. 34:293–299. doi:10.1007/BF02822737.
- Lopez Baez O, Bollon H, Eskes A, Pétiard V. 1993. Embryogenèse somatique de cacaoyer *Theobroma cacao* L. à partir de pièces florales. *Sciences de la Vie*; [consultado el 31 de may. de 2022]. 6(316):579–584. <https://agritrop.cirad.fr/397366/>.
- Minyaka E, Niemenak N, Nankeu DJ, Boudjeko T, Omokolo ND. 2004. Glutamate dehydrogenase and glutamine synthetase activities during somatic embryogenesis in *Theobroma cacao* L. *Journal of the Cameroon Academy of Sciences*. 4:306–314. en. doi:10.4314/jcas.v4i3.17669.
- Mok D, Mok MC. 2001. Cytokinin metabolism and action. *Annual Reviews*. en. doi:10.1146/annurev.arplant.52.1.89.
- Peña López JL. 2019. Propagación de plantas de cacao mediante injertos. *kuxulkab*. 25(51):33. doi:10.19136/kuxulkab.a25n51.2923.
- Seguí Simarro JM. 2016. Doubled Haploidy in Model and Recalcitrant Species. [sin lugar]: Frontiers Media SA. ISBN: 9782889197835.
- Solano W. 2008. Embriogénesis somática en clones superiores de cacao (*Theobroma cacao* L.) Obtenidos en el programa de mejoramiento genético del catie. [Tesis de maestría]. Costa Rica: CATIE. 106 p.
- Soria V. 1966. Principales variedades de cacao cultivadas en América Tropical. [sin lugar]: Turrialba (IICA). 16 (3).
- Woodward AW, Bartel B. 2005. Auxin: regulation, action, and interaction. *Ann Bot*. 95(5):707–735. eng. doi:10.1093/aob/mci083.
- Zahoor S, Fahem A. 2009. Efecto del tidiazurón (TDZ) en la micropropagación in vitro de *Solanum tuberosum* L. c.v. _ Desiree y cardenal. *Pakistan*: [sin editorial]. <https://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.976.7029&rep=rep1&type=pdf>.
- Żur I, Dubas E, Krzewska M, Janowiak F. 2015. Current insights into hormonal regulation of microspore embryogenesis. *Frontiers in Plant Science*. 6. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2015.00424>. doi:10.3389/fpls.2015.00424.