



CARTA DE AUTORIZACIÓN

<b>CÓDIGO</b>	<b>AP-BIB-FO-06</b>	<b>VERSIÓN</b>	<b>1</b>	<b>VIGENCIA</b>	<b>2014</b>	<b>PÁGINA</b>	<b>1 de 2</b>
---------------	---------------------	----------------	----------	-----------------	-------------	---------------	---------------

La Plata, 17 de julio de 2019

Señores

CENTRO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN

UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA

Ciudad

El (Los) suscrito(s):

Anderson Smith Cabrera Beltran \_\_\_\_\_, con C.C. No. \_1144073753 de Cali- Valle\_\_\_,

\_\_\_\_\_, con C.C. No. \_\_\_\_\_,

\_\_\_\_\_, con C.C. No. \_\_\_\_\_,

\_\_\_\_\_, con C.C. No. \_\_\_\_\_, Autor(es)

de la tesis y/o trabajo de grado o proyecto pasantía supervisada, titulado Inducción de callo en la especie de cacao (*Theobroma cacao* L.) con los reguladores de crecimiento 2,4D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) Y TDZ (Thidiazuron) en medios de cultivo MS (Murashige and Skoog) Y PCG (Primary Callus Growth Medium).

presentado y aprobado en el año 2019 como requisito para optar al título de

\_Ingeniero Agrícola\_\_\_\_\_;

Autorizo (amos) al CENTRO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN de la Universidad Surcolombiana para que, con fines académicos, muestre al país y el exterior la producción intelectual de la Universidad Surcolombiana, a través de la visibilidad de su contenido de la siguiente manera:

- Los usuarios puedan consultar el contenido de este trabajo de grado en los sitios web que administra la Universidad, en bases de datos, repositorio digital, catálogos y en otros sitios web, redes y sistemas de información nacionales e internacionales "open access" y en las redes de información con las cuales tenga convenio la Institución.
- Permita la consulta, la reproducción y préstamo a los usuarios interesados en el contenido de este trabajo, para todos los usos que tengan finalidad académica, ya sea en formato Cd-Rom o digital desde internet, intranet, etc., y en general para cualquier formato conocido o por conocer, dentro de los términos establecidos en la Ley 23 de 1982, Ley 44 de 1993, Decisión Andina 351 de 1993, Decreto 460 de 1995 y demás normas generales sobre la materia.
- Continúo conservando los correspondientes derechos sin modificación o restricción alguna; puesto que, de acuerdo con la legislación colombiana aplicable, el presente es un acuerdo jurídico que en ningún caso conlleva la enajenación del derecho de autor y sus conexos.

Vigilada Mineducación



CARTA DE AUTORIZACIÓN

<b>CÓDIGO</b>	<b>AP-BIB-FO-06</b>	<b>VERSIÓN</b>	<b>1</b>	<b>VIGENCIA</b>	<b>2014</b>	<b>PÁGINA</b>	<b>2 de 2</b>
---------------	---------------------	----------------	----------	-----------------	-------------	---------------	---------------

De conformidad con lo establecido en el artículo 30 de la Ley 23 de 1982 y el artículo 11 de la Decisión Andina 351 de 1993, "Los derechos morales sobre el trabajo son propiedad de los autores" , los cuales son irrenunciables, imprescriptibles, inembargables e inalienables.

EL AUTOR/ESTUDIANTE:

Firma: Anderson Cabrera

EL AUTOR/ESTUDIANTE:

Firma: \_\_\_\_\_

EL AUTOR/ESTUDIANTE:

Firma: \_\_\_\_\_

EL AUTOR/ESTUDIANTE:

Firma: \_\_\_\_\_

Vigilada Mineducación

La versión vigente y controlada de este documento, solo podrá ser consultada a través del sitio web Institucional [www.usco.edu.co](http://www.usco.edu.co), link Sistema Gestión de Calidad. La copia o impresión diferente a la publicada, será considerada como documento no controlado y su uso indebido no es de responsabilidad de la Universidad Surcolombiana.



**TÍTULO COMPLETO DEL TRABAJO:** Inducción de callo en la especie de cacao (*Theobroma cacao L.*) con los reguladores de crecimiento 2,4D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) Y TDZ (Thidiazuron) en medios de cultivo MS (Murashige and Skoog) Y PCG (Primary Callus Growth Medium).

**AUTOR O AUTORES:**

Primero y Segundo Apellido	Primero y Segundo Nombre
Cabrera Beltran	Anderson Smith

**DIRECTOR Y CODIRECTOR TESIS:**

Primero y Segundo Apellido	Primero y Segundo Nombre
Perdomo Medina	Damaris

**ASESOR (ES):**

Primero y Segundo Apellido	Primero y Segundo Nombre

**PARA OPTAR AL TÍTULO DE:** Ingeniero Agrícola

**FACULTAD:** Ingeniería

**PROGRAMA O POSGRADO:** Ingeniería Agrícola

**CIUDAD:** La Plata-Huila      **AÑO DE PRESENTACIÓN:** 2019      **NÚMERO DE PÁGINAS:** 52

**TIPO DE ILUSTRACIONES (Marcar con una X):**

Diagramas\_\_\_ Fotografías\_X\_ Grabaciones en discos\_\_\_ Ilustraciones en general \_X\_ Grabados\_\_\_  
Láminas\_\_\_ Litografías\_\_\_ Mapas \_X\_ Música impresa\_\_\_ Planos\_\_\_ Retratos\_\_\_ Sin ilustraciones\_\_\_  
Tablas o Cuadros \_X\_



**SOFTWARE** requerido y/o especializado para la lectura del documento:

**MATERIAL ANEXO:**

**PREMIO O DISTINCIÓN** (*En caso de ser LAUREADAS o Meritoria*):

**PALABRAS CLAVES EN ESPAÑOL E INGLÉS:**

<u>Español</u>	<u>Inglés</u>
1. _ Cacao _____	___ Cacao _____
2. _ Reguladores de crecimiento _	___ Growth regulators _____
3. _ Medios de cultivo _____	___ Culture media _____

**RESUMEN DEL CONTENIDO:** (Máximo 250 palabras)

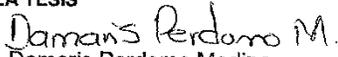
*Theobroma cacao* L. ( $2n = 20$ ) es una planta de la familia Malvaceae que es nativa de las regiones de América Central y del Sur. A pesar de la gran demanda global de cacao, su producción ha decaído, por ello, hubo un déficit global de 150,000 toneladas en 2015–2016. Los métodos más utilizados de propagación son el de semillas sexuales y los injertos, pero no son efectivos. Las técnicas de micropropagación son una alternativa para producir masivamente plantas élite. El objetivo de este estudio es inducir callo en la especie de cacao (*Theobroma cacao* L.) a partir de los medios de cultivo MS (Murashige and Skoog) y PCG (Primary Callus Growth Medium) con los reguladores de crecimiento 2,4D y TDZ; para cada medio se evaluaron dos tratamientos T1 con (2,4- D 1 mg/ml stock y TDZ 0,2 mg/ml stock) y T2 con (2,4- D 0,2 mg/ml stock y TDZ 1 mg/ml stock), se utilizaron explantes florales (Base de pétalos y Estaminodios) de los clones ICS95 Y CCN51, y se mantuvieron en total oscuridad después de la siembra, se realizaron dos observaciones a los 14 y 30 días. Para la asepsia se observó la interacción de los explantes con cada medio y tratamiento y la viabilidad de los explantes a la producción de callo.



**ABSTRACT:** (Máximo 250 palabras)

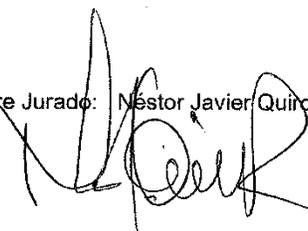
*Theobroma cacao* L. ( $2n = 20$ ) is a plant of the *Malvaceae* family that is native to the regions of Central and South America. Despite the great global demand for cocoa, its production has declined, therefore, there was an overall deficit of 150,000 tons in 2015-2016. The most widely used methods of propagation are the sexual seed and the grafts, but they are not effective. The techniques of micropropagation are an alternative to mass produce elite plants. The objective of this study is to induce callus in the cocoa species (*Theobroma cacao* L.) from the MS (Murashige and Skoog) and PCG (Primary Callus Growth Medium) growth media with the growth regulators 2,4D and TDZ ; for each medium two T1 treatments were evaluated with (2,4-D 1 mg / ml stock and TDZ 0.2 mg / ml stock) and T2 with (2,4- D 0.2 mg / ml stock and TDZ 1 mg / ml stock), floral explants (Base of petals and Estaminodios) of clones ICS95 and CCN51 were used, and were kept in total darkness after sowing, two observations were made at 14 and 30 days. For asepsis, the interaction of the explants with each medium and treatment and the viability of the explants to callus production was observed.

**APROBACION DE LA TESIS**

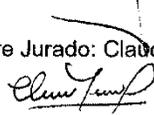
Nombre director:   
Damaris Perdomo Medina

Firma:

Nombre Jurado: Néstor Javier Quinoga Ruiz

Firma: 

Nombre Jurado: Claudia Milena Amorocho Cruz

Firma: 

PROYECTO DE PASANTÍA SUPERVISADA  
LABORATORIO DE PROTECCIÓN DE PLANTAS (LPP) DE LA UNIVERSIDAD  
DEL TOLIMA.

ANDERSON SMITH CABRERA BELTRAN

UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA SEDE – LA PLATA  
FACULTAD DE INGENIERÍA  
INGENIERIA AGRÍCOLA  
SEMESTRE A-2019

INDUCCIÓN DE CALLO EN LA ESPECIE DE CACAO (*Theobroma cacao L.*) CON  
LOS REGULADORES DE CRECIMIENTO 2,4D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) Y  
TDZ (Thidiazuron) EN MEDIOS DE CULTIVO MS (Murashige and Skoog) Y PCG  
(Primary Callus Growth Medium).

Por:

ANDERSON SMITH CABRERA BELTRAN  
Estudiante de Ingeniería Agrícola  
Código: 20131120276

Presentado a:

Docente: DAMARIS PERDOMO MEDINA  
Director Pasantía

Trabajo presentado como requisito parcial de grado

UNIVERSIDAD DEL SURCOLOMBIANA  
FACULTAD DE INGENIERÍA  
PROGRAMA DE ING. AGRÍCOLA  
SEMESTRE A-2019

**Nota de aceptación**

---

---

---

---

Firma Del Director  
**DAMARIS PERDOMO MEDINA**  
Docente Universidad Surcolombiana

---

Firma Del Jurado  
**NESTOR JAVIER QUIROGA RUIZ**  
Docente Universidad Surcolombiana

---

Firma Del Jurado  
**CLAUDIA MILENA AMOROCHO CRUZ**  
Docente Universidad Surcolombiana

***Dedico este trabajo a Dios, a mi familia y  
a todos aquellos que confiaron en mí.***

## **AGRADECIMIENTOS**

Primeramente, a Dios por darme la vida y bendecirme cada día para afrontar las dificultades con la mejor actitud y superarlas, a mi familia por el amor y apoyo incondicional para que cada día sea mejor persona y cumplir cada meta que me proponga.

Mi más sincero agradecimiento a mi compañera sentimental por acompañarme en este camino, por su incondicional apoyo, por ser parte de mi vida y ser un ejemplo para mí de fortaleza e inspiración.

Mi profundo agradecimiento a la docente Damaris Perdomo Medina, directora de este proyecto de pasantía académica por su apoyo, colaboración, acompañamiento y dirección, logrando así mejorar mis conocimientos a nivel profesional en la estructuración de proyectos lo que permitió el desarrollo de este proyecto.

A la directora del Laboratorio de Protección de Plantas de la universidad del Tolima la Dra. Hilda Roció Mosquera, por depositar su confianza en mí y darme la oportunidad de ser parte de su equipo de trabajo.

De igual forma agradecerle a la docente Diana Mabel Beltran de la Universidad del Tolima por ser la gestora de la idea de este proyecto de pasantía y por todo aquello que logro ofrecerme tanto en conocimientos, como para mi formación como profesional.

Agradezco también a mis compañeros de pasantía por ofrecerme su amistad y apoyo, brindándome durante el tiempo de trabajo un ambiente agradable de compartir y discernir conocimientos para mi vida personal como profesional.

## TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN .....	11
INTRODUCCIÓN .....	13
1. MARCO TEÓRICO .....	15
1.1. Generalidades del cultivo del cacao ( <i>Theobroma cacao L.</i> ).....	15
1.2. Origen y taxonomía .....	15
1.3. Botánica .....	16
1.4. Biología reproductiva.....	16
1.4.1. Morfología de la flor .....	16
1.4.2. Polinización .....	17
1.4.3. Incompatibilidad del cacao .....	17
1.5. Diversidad del cacao .....	18
1.6. Propagación del cacao.....	19
1.7. Biotecnología .....	19
1.8. Biotecnología Agrícola .....	19
1.9. Micropropagación de Especies Vegetales .....	20
1.10. Embriogénesis somática .....	20
1.11. Cultivo <i>in vitro</i> de especies vegetales .....	20
1.12. Reguladores de crecimiento vegetal.....	21
1.13. Desinfección de material-proceso de autoclave para esterilización .....	21
1.14. Antecedentes .....	22
2. METODOLOGIA .....	24
2.1. Ubicación del lugar de trabajo.....	24
2.2. Material vegetal .....	25
2.3. Reguladores de crecimiento.....	25
2.4. Medios de cultivo .....	26
2.5. Recolección y desinfección del material vegetal. ....	28
2.6. Siembra del material vegetal.....	29
2.7. Muestra sembrada y variables de respuesta.....	30
3. RESULTADOS Y DISCUSION .....	32
3.1. Establecimiento de cultivos asépticos.....	32

3.2. Interacción entre medio de cultivo y tipo de explante.....	33
3.2.1. Clon CCN51.....	33
3.2.2. Clon ICS95 .....	36
3.3. Viabilidad de explantes a inducción de callo .....	39
4. CONCLUSIONES .....	40
5. RECOMENDACIONES.....	41
BIBLIOGRAFÍA .....	42
ANEXOS. ....	46

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Clasificación taxonómica del <i>Theobroma cacao L</i> .....	15
<b>Tabla 2.</b> Características de los clones estudiados. ....	25
<b>Tabla 3.</b> Composición y preparación de soluciones stock del medio de MS.....	26
<b>Tabla 4.</b> Composición y preparación de soluciones stock DKW macro, micro y vitaminas del medio PCG. ....	27
<b>Tabla 5.</b> Composición y preparación del medio PCG. ....	28
<b>Tabla 6.</b> Medios de cultivo y tratamientos a utilizar para la inducción de callo en explantes (Estaminodios y Base de pétalos) de <i>Theobroma cacao L</i> .....	30

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Morfología de la flor del cacao .....	17
<b>Figura 2.</b> Ubicación Geográfica de Colombia y de la ciudad de Ibagué -Tolima. .	24
<b>figura 3.</b> Botones florales de <i>Theobroma cacao</i> L. en agua destilada esterilizada a 4°C. ....	29
<b>Figura 4.</b> Corte para extracción de explantes del botón floral del cacao. ....	29
<b>Figura 5.</b> Asepsia de los explantes en los clones CCN51 y ICS95.....	32
<b>Figura 6.</b> Comportamiento del Clon CCN51 a los catorce días de siembra en los medios de cultivo.....	33
<b>Figura 7.</b> Clon CCN51 a los treinta días de siembra en los medios de cultivo.. ...	34
<b>Figura 8.</b> Formación de callo en explantes de cacao del clon CCN51. ....	35
<b>Figura 9.</b> Clon ICS95 a los catorce días de siembra en los medios de cultivo. ....	36
<b>Figura 10.</b> Clon ICS 95 a los treinta días de siembra en los medios de cultivo. ...	37
<b>Figura 11.</b> Formación de callo en explantes de cacao del clon ICS95. ....	37
<b>Figura 12.</b> Comparación de explantes (Base de pétalos y estaminodios) en la producción de callo. ....	39

## LISTA DE ANEXOS

<b>Anexos A:</b> Tareas generales en la pasantía supervisada .....	46
<b>Anexos B:</b> Actividades realizadas para el proyecto de pasantía. ....	47
<b>Anexos C:</b> Equipos utilizados. ....	54

## RESUMEN

*Theobroma cacao* L. ( $2n = 20$ ) es una planta de la familia Malvaceae que es nativa de las regiones de América Central y del Sur. A pesar de la gran demanda global de cacao, su producción ha decaído, por ello, hubo un déficit global de 150,000 toneladas en 2015–2016. Los métodos más utilizados de propagación son el de semillas sexuales y los injertos, pero no son efectivos. Las técnicas de micropropagación son una alternativa para producir masivamente plantas élite. El objetivo de este estudio es inducir callo en la especie de cacao (*Theobroma cacao* L.) a partir de los medios de cultivo MS (Murashige and Skoog) y PCG (Primary Callus Growth Medium) con los reguladores de crecimiento 2,4D y TDZ; para cada medio se evaluaron dos tratamientos T1 con (2,4- D 1 mg/ml stock y TDZ 0,2 mg/ml stock) y T2 con (2,4- D 0,2 mg/ml stock y TDZ 1 mg/ml stock), se utilizaron explantes florales (Base de pétalos y Estaminodios) de los clones ICS95 Y CCN51, y se mantuvieron en total oscuridad después de la siembra, se realizaron dos observaciones a los 14 y 30 días. Para la asepsia se observó la interacción de los explantes con cada medio y tratamiento y la viabilidad de los explantes a la producción de callo. Se obtuvo callo en los dos clones donde el tratamiento 1 en los dos medios tuvo la mejor interacción con porcentajes hasta 40% de presencia de callo, por otro lado, tuvo mayor inducción de callo el clon CCN51; y el explante que mejor se comportó en la producción de callo en los dos clones fue la base de pétalos.

**Palabras clave:** Cacao, reguladores de crecimiento, medios de cultivo

## SUMMARY

*Theobroma cacao* L. ( $2n = 20$ ) is a plant of the Malvaceae family that is native to the regions of Central and South America. Despite the great global demand for cocoa, its production has declined, therefore, there was an overall deficit of 150,000 tons in 2015-2016. The most widely used methods of propagation are the sexual seed and the grafts, but they are not effective. The techniques of micropropagation are an alternative to mass produce elite plants. The objective of this study is to induce callus in the cocoa species (*Theobroma cacao* L.) from the MS (Murashige and Skoog) and PCG (Primary Callus Growth Medium) growth media with the growth regulators 2,4D and TDZ ; for each medium two T1 treatments were evaluated with (2,4-D 1 mg / ml stock and TDZ 0.2 mg / ml stock) and T2 with (2,4- D 0.2 mg / ml stock and TDZ 1 mg / ml stock), floral explants (Base of petals and Estaminodios) of clones ICS95 and CCN51 were used, and were kept in total darkness after sowing, two observations were made at 14 and 30 days. For asepsis, the interaction of the explants with each medium and treatment and the viability of the explants to callus production was observed. Callus was

obtained in the two clones where treatment 1 in the two media had the best interaction with percentages up to 40% of callus presence, on the other hand, cloning CCN51 had higher callus induction; and the explant that best behaved in the production of callus in the two clones was the base of petals

**Keywords:** Cocoa, growth regulators, culture media

## INTRODUCCIÓN

*Theobroma cacao* L. es una planta nativa de las regiones de América Central y del Sur, pertenece a la familia Malvaceae que crece en zonas tropicales húmedas, entre las 22 especies del género, *T. cacao* es la única cultivada a gran escala para producir chocolate (Richardson *et al*; 2015).

Tiempo después el cacao se extendió a Asia, Oceanía y África, siendo este último el mayor productor a nivel global con tres grandes productores: Nigeria, Costa de Marfil y Ghana. En América del Sur lo producen especialmente Brasil, México, Ecuador y Colombia (Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, 2011).

A pesar de la gran demanda global de cacao, su producción no ha seguido la misma tendencia y, por lo tanto, hay un déficit global en la oferta que fue de 150,000 toneladas en 2015–2016 (ICCO, 2017). En Colombia el cultivo presenta un bajo rendimiento, causado básicamente por la heterogeneidad y vejez de las plantaciones, demandando la renovación de las mismas en aproximadamente un 75 - 80 % del área cultivada. Para dar respuesta a esta necesidad es indispensable producir abundante material de siembra (Ramírez, 2004). Por otro lado, es vital por su atribución socio-económica como ambiental, ya que es el sostén de 35.000 familias campesinas en el país (FEDECACAO, 2011).

Los métodos más utilizados de propagación son el de semillas sexuales y los injertos. Dado que *T. cacao* se reproduce de manera natural mediante polinización cruzada, los materiales de siembra a partir de semillas generalmente presentan un fondo genético altamente heterogéneo y, por lo tanto, el rendimiento agronómico de los cultivos es muy variable. Los materiales propagados por clonación a través de materiales de injerto no tienen altas tasas de multiplicación y el patrón de crecimiento espeso es más pronunciado, lo que se considera una característica indeseable (Henaó *et al*; 2017).

En Colombia las variedades se obtienen por métodos tradicionales de cruces injertados entre diferentes clones, proceso que puede tomar más de 13 años para desarrollar una variedad premium. Los árboles de cacao élite presentan un alto grado de segregación cuando son multiplicados por semilla, debido a esto se han empleado diferentes sistemas de propagación clonal, tales como injertación y producción de estacas enraizadas. Dichos sistemas tienen un grado de efectividad variable al ser dependientes de las condiciones ambientales, de la cohesión entre la planta madre y el donador y de las enfermedades que aparecen durante el prendimiento.

Por consiguiente, se han evaluado otros métodos de propagación mediante la técnica de cultivo de tejidos. La embriogénesis somática es un método de regeneración *in-vitro* para plantas, que después de la estandarización es altamente eficiente, logrando una alta tasa de multiplicación. La regeneración *in-vitro* de plántulas a través de embriones somáticos se ha desarrollado con éxito en diferentes especies de plantas. La regeneración de plantas de cacao mediante embriogénesis somática se ha establecido exitosamente a partir de explantes florales (Solano, 2008; Monsalve *et al*; 2005; Chanatásig, 2004),

En este sentido, establecer una rápida producción masiva de clones élite que elimine la dependencia climática y el efecto de las plagas y enfermedades sería una alternativa efectiva para responder a la baja tasa de propagación con los métodos tradicionales. Para contribuir con esto el objetivo de este proyecto de pasantía es llegar a la primera fase de la embriogénesis somática que es: Inducir callo en la especie de cacao (*Theobroma cacao L.*) a partir de los reguladores de crecimiento 2,4D Y TDZ en medios de cultivo MS (Murashige and Skoog) y PCG (Primary Callus Growth Medium). Observando cómo influye cada uno de los medios en cada clon y cómo se comporta cada explante (base de pétalos y estaminodios) en la inducción de callo. Para la desinfección se utilizó el protocolo utilizado por (Urrea *et al*; 2011).

## 1. MARCO TEÓRICO

### 1.1. Generalidades del cultivo del cacao (*Theobroma cacao L.*)

El cacao (*Theobroma cacao L.*) es una especie diploide, de porte alto y de ciclo vegetativo perenne (M&O Consulting, 2008); que prospera bien bajo la sombra, sin embargo, necesita condiciones especiales de luminosidad, temperatura y provisión de agua (Arévalo *et al*; 2004).

La temperatura y la precipitación son los factores críticos que influyen en su crecimiento; donde la precipitación óptima para el cacao es de 1.600 a 2.500 mm distribuidos en todo el año. Precipitaciones que sobrepasen los 2.600 mm pueden afectar la producción del cultivo. El factor temperatura es muy importante por su relación con el desarrollo, floración y fructificación del cultivo de cacao; donde la temperatura media anual debe estar en los 25°C. De igual forma, la humedad relativa, la radiación solar y el viento son factores que afectan los procesos fisiológicos de la planta (Proamazonía, 2004).

Por otra parte, la principal limitante que afectan la calidad y producción de los granos de cacao son las enfermedades (Jaimes y Aránzazu, 2010).

### 1.2. Origen y taxonomía

*Theobroma cacao* es una planta que se originó en la región de las cuencas del Orinoco y el Amazonas, en los valles de sus afluentes en América del Sur (FAO, 2010). El cacao es una planta perenne, posee 20 cromosomas y su polinización es cruzada (alógama), su reproducción puede ser de forma sexual (semillas) o asexual (ramas) (Torres, 2012)

**Tabla 1.** Clasificación taxonómica del *Theobroma cacao L.*

Reino	vegetal
Tipo	Espermatofita
Subtipo	Angiosperma
Clase	Dicotiledóneas
Subclase	Dialipétalas
Orden	Malvales
Familia	Esterculiácea
Género	Theobroma
Especie	Cacao

**Fuente:** (Díaz y Urbina, 2015).

### 1.3. Botánica

El hábitat natural del género *Theobroma* está en el más bajo estrato del bosque lluvioso siempre verde. Todas las especies silvestres del género se encuentran en los bosques lluviosos del hemisferio occidental, desde los 18 °N a los 15 °S, es decir desde México, hasta el sur de la Amazonía en Brasil y Bolivia (Chanatásig, 2004).

El cacao es un cultivo rigurosamente tropical, pero se transforma y consume más en regiones templadas, especialmente como bebida estimulante y como alimento energético (chocolate). La grasa es un subproducto sustancial en la elaboración de cosméticos y productos farmacéuticos.

Las especies del género *Theobroma* son árboles ramificados con hojas simples y con un fruto indehiscente carnoso (mazorca). *Theobroma cacao* es un árbol o arbusto semicaducifolio de hasta 12 a 20 m de altura, y en cultivo se mantienen normalmente de 4 a 8 m. La corteza es oscura, gris-café. Las ramas son cafés y finamente vellosas. Las hojas son coriácea simples, enteras angostamente ovadas a obovado-elípticas, ligeramente asimétricas, de 17 a 60 cm de largo y 7 a 14 cm de ancho, alternas y glabras o laxamente pubescentes en ambas caras (Doster *et al*; 2012).

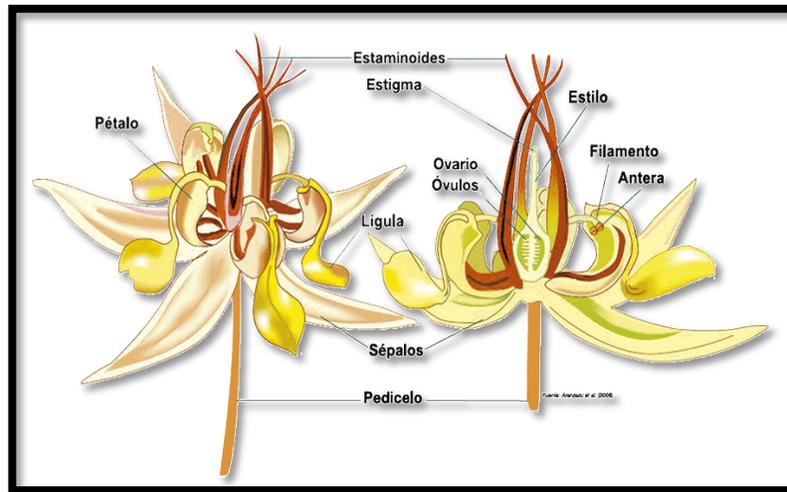
El fruto es una baya grande (mazorca), polimorfa, esférico a fusiforme, púrpura o amarillo en la madurez, con una longitud de 7 cm ancho y de 10 a 35 cm de largo, 200-1000 gr de peso (Doster *et al*; 2012).

### 1.4. Biología reproductiva

#### 1.4.1. Morfología de la flor

El cacao tiene una flor individual (figura 1) con un pedicelo de una longitud de 1 a 1,5 cm largo y fino, constituida de cinco sépalos agudos y rosados, de 6 a 8 mm de largo, pubescentes, la flor abierta forma ángulo recto con el peciolo. La corola consiste de cinco pétalos blancos de 6 a 8 mm de largo. En el centro de la flor se ubica el tubo estaminal, contiene cinco estambres fértiles, cortos y doblados hacia fuera, cada uno encerrado en la concha de un pétalo; y de cinco estaminoides internos, agudos y largos de posición erecta que rodean al gineceo. El ovario es súpero con cinco celdas y placentación central, con 30 a 50 rudimentos seminales. El estilo se abre arriba en cinco ramas estigmáticas algunas de estas permanecen con frecuencia soldadas (León, 2000).

**Figura 1.** Morfología de la flor del cacao



**Fuente:** (Sosa, 2016).

#### **1.4.2. Polinización**

En el cacao, la polinización es muy compleja, ya que la flor influye negativamente por naturaleza en la polinización en cualquiera de los medios comunes. El polen es bastante pegajoso para que el viento pueda intervenir, por otro lado, la posición de las anteras no se adapta a la condición de una planta anemófila, por lo que ciertos insectos son los que se encargan de la fecundación (León, 2000).

Las flores fecundadas pierden los pétalos, sépalos y estambres y el ovario comienza con su crecimiento; muchos de estos caen por diversas causas y sólo una cantidad mínima llega a la maduración. Se conoce que la planta adulta de cacao bajo condiciones normales puede producir de 6.000 a 10.000 flores por año, de las que solo el 0,01% llegan a transformarse en frutos (Vera *et al*, 2016).

#### **1.4.3. Incompatibilidad del cacao**

La compatibilidad es una particularidad importante ya que facilita el cuajamiento de frutos y los cruzamientos y hace viable la siembra de clones individuales en áreas uniformes. Por otro lado, la incompatibilidad se ha relacionado con una menor producción (Phillips, 2008).

El fenómeno de incompatibilidad en cacao fue reportado por primera vez por Pound en 1932. Debido a este fenómeno el polen de una flor de una planta no consigue fecundar los óvulos de las flores de la misma planta, carácter de autoincompatibilidad.

Debido a la autoincompatibilidad de la mayor parte de las flores del cacao, donde puede llegar a ser parcial o total, menos del 5% de éstas son fecundadas y llegan a dar fruto (León, 2000).

## **1.5. Diversidad del cacao**

Los árboles de cacao se dividen en tres grupos genéticos: Criollo, Forastero y Trinitario.

### **Criollos**

Palabra que significa nativo, pero de ascendencia extranjera, se originaron en Sudamérica, son conocidos también como híbridos de cacao dulce. Se caracteriza por su aroma, la mazorca es de color roja o amarilla una vez se encuentra en estado de madurez, corrientemente con 10 surcos profundos, muy rugosos, cascara suave y semillas redondas medianas a grandes, los cotiledones frescos son de color blanco o violeta pálido. Se cultiva principalmente en México, Guatemala, Nicaragua, Ecuador, Colombia y Venezuela. El árbol es de porte bajo y menos robustos que los otros genotipos y tiene bajo rendimiento. Se ha reportado que los Criollos son muy susceptibles a las enfermedades, esencialmente a *Phytophthora spp* y *Ceratocystis*; y no perduran a ataques constantes de plagas (Díaz y Urbina, 2015).

### **Forasteros**

Los forasteros son un grupo grande que abarca tipos cultivados, semi-cultivados y silvestres, tales como el cacao ordinario de Brasil, África Occidental y el cacao nacional del Ecuador, igualmente distinguidos como forastero amazónico, porque se encuentran distribuidos de manera natural en la cuenca del río Amazona. Es la variedad mayor cultivada en las regiones cacaoteras de África y Brasil y provee más del 80% de la producción mundial. La mazorca de este grupo son todas amarillas en su estado maduro y con surcos y rugosidades poco conspicuas, lisas y de extremo redondeado o punta muy corta (Díaz y Urbina, 2015).

En la actualidad la mayor parte de árboles plantados de Forastero son híbridos. Estos híbridos son preferidos debido a la mayor resistencia a las enfermedades conocidas y a que tienen una mayor producción (ITC, 2001).

## Trinitarios

Los Trinitarios no son encontrados en estado silvestre se originaron del cruzamiento artificial del criollo y forastero. Se caracteriza por una amplia variabilidad de formas, tamaños y comportamiento, siendo hoy en día el tipo de cacao que predomina en Colombia y del cual se están seleccionando la mayoría de los materiales sobresalientes que posteriormente se clonan y son recomendados por Fedecacao (FEDECACAO, 2013). También se pueden encontrar en México, América Central, Trinidad, Ecuador, Venezuela y África.

### **1.6. Propagación del cacao**

La planta del cacao se puede propagar de manera sexual mediante semillas y por reproducción asexual o vegetativa, donde los métodos que se utilizan son por estacas, injertos y acodos; y a través de técnicas de cultivo *in-vitro por* medio de la embriogénesis somática (Chantásig, 2014).

### **1.7. Biotecnología**

Según Trigo *et al*; 2002 “Biotecnología es cualquier técnica que utilice organismos vivos o sustancias derivadas de dichos organismos para crear o modificar un producto, mejorar plantas o animales, o desarrollar microorganismos para usos específicos. La biotecnología moderna se refiere a las aplicaciones de los nuevos desarrollos en tecnología de ADN recombinante, técnicas avanzadas de cultivo de células y tejidos e inmunología moderna.” En concepción clásica la biotecnología puede examinarse bajo varios puntos de vista, tecnología agropecuaria, tecnologías no fermentativas, tecnologías farmacéuticas, tecnologías en procesos microbiológicos y biotecnologías avanzadas (Torres, 2010).

### **1.8. Biotecnología Agrícola**

La biotecnología agrícola posee el gran potencial de ser un instrumento vital para la investigación agrícola en América Latina y el Caribe. Los avances de la biotecnología agrícola, impulsados por los avances de la biotecnología médica, están innovando el conocimiento de los mecanismos de crecimiento y producción de sustancias útiles en plantas y animales; de igual forma para su propagación.

Estos adelantos de la ciencia empiezan a proyectarse como tecnologías útiles para los agricultores de América Latina (Trigo *et al*; 2002).

### **1.9. Micropropagación de Especies Vegetales**

La propagación vegetativa de plantas mediante el uso de técnicas de cultivo *in-vitro* se conoce como micropropagación, palabra que hace alusión a que la cantidad de material vegetal necesario para iniciar el cultivo es pequeña, mucho menos que en las técnicas tradicionales de propagación vegetativa, también conocidas colectivamente como macropropagación. La propagación vegetativa mediante cultivo *in-vitro* se puede realizar de diferentes formas; la multiplicación a partir de yemas ya existentes (apicales o axilares); la formación de brotes adventicios o embriones somáticos adventicios partiendo: a) de explantes constituidos por porciones de tejidos u órganos extraídos de la planta madre; o b) células desorganizadas (suspensiones celulares) o tejidos (cultivos de callo) establecidos por proliferación celular dentro del propio explante (Castillo, 2013).

### **1.10. Embriogénesis somática**

Según Tisserat *et al*; 1979. Citado por (Seijo, 2003) “La embriogénesis somática es la formación de un embrión a partir de una célula, sin la necesidad de la fusión de gametos.”. Esta técnica, teóricamente, es el más eficaz para la producción masiva de plantas *in-vitro* dado a la naturaleza bipolar del embrión, la posibilidad de ser automatizado todo el proceso productivo y los altos coeficientes de multiplicación en cortos períodos de tiempo (Seijo, 2003).

#### ➤ Embriogénesis somática directa e indirecta

Embriogénesis Directa, es la formación de embriones somáticos directamente desde una estructura organizada tales como segmentos de embriones cigóticos o embriones cigóticos completos y/o tallos (Williams y Maheswaran, 1986).

Embriogénesis Indirecta, en este proceso las células del tejido deben sufrir varias divisiones mitóticas en presencia de una auxina durante la inducción del estado de célula embriogénica. Estas divisiones mitóticas dan lugar a un callo, aunque también se pueden obtener a partir de suspensiones celulares y protoplastos (Seijo, 2003).

Fases de la Embriogénesis somática indirecta se definen en 1. Inducción de callo primario, 2. Desarrollo del callo secundario, 3. Expresión del embrión somático, 4. Conversión del embrión somático en planta (Chanatásig, 2014).

### **1.11. Cultivo *in vitro* de especies vegetales**

El cultivo *in vitro* de especies vegetales es una técnica que consiste esencialmente en aislar una porción de la planta órganos, tejidos, células o

protoplastos (explante); y proporcionarle artificialmente las condiciones físicas, químicas y de asepsia apropiadas; para obtener el desarrollo y producción de plantas en su totalidad (Roca y Mroginski, 1991). El mayor beneficio del cultivo *in vitro* en la propagación de plantas es que el tiempo de producción se acorta de manera contundente.

### **1.12. Reguladores de crecimiento vegetal**

Los reguladores de crecimiento vegetal (RCV) son sustancias mensajeras (químicas y orgánicas) que pueden influir en múltiples procesos fisiológicos de las plantas, existen grupos principales, los cuales son: promotores del crecimiento (auxinas, citosinas y giberelinas) que actúan las dos primeras en división celular y la última en elongación celular; inhibidores de crecimiento (ácido abscísico) actúa contra el estrés hídrico provocando el cierre de estomas; etileno, inhibe el crecimiento en longitud de tallos y raíces y los tallos se engrosan (el etileno aumenta el grosor de las células parenquimáticas), (Hurtado y Merino, 1997).

### **1.13. Desinfección de material-proceso de autoclave para esterilización**

Hay una gran variedad de sustancias químicas manejadas para controlar o exterminar microorganismos, en los principales grupos de estas sustancias antimicrobianas están:

**Alcoholes (alcohol etílico):** Se utilizan como desinfectantes y como antiséptico, el mecanismo más probable para la acción parece incluir la alteración de las membranas celulares, así como la desnaturalización de las proteínas (Alba y Araujo, 2008). El alcohol etílico rectificado (95%) provoca gran deshidratación en los microorganismos, de manera que impide su penetración en los mismos. Por lo tanto, las concentraciones óptimas oscilan entre el 60% y 90% en agua destilada, siendo la preparación más efectiva al 70%. Concentraciones por debajo del 50% no causan ningún efecto. La materia orgánica inactiva los alcoholes, por lo que se recomienda limpiar la superficie antes de desinfectar con alcohol (Vignoli, 2006).

**Detergentes:** Los detergentes son compuestos que permiten variar la tensión superficial del agua y son los causantes de la humectación, penetración, emulsión y suspensión de la suciedad. Consiste en dejar la suciedad o partículas de suciedad en solución, evitando que estas se vuelvan a redepositar (Alba y Araujo, 2008).

**Derivados clorados:** Los hipocloritos son los compuestos más usados a nivel industrial e institucional y vienen en forma líquida (hipoclorito de sodio) o sólida (hipoclorito de calcio). Su uso está limitado por su efecto corrosivo, su inactivación

por materiales orgánicos y su inestabilidad relativa. El compuesto activo que se libera es el ácido hipocloroso. Se postula que pueden inhibir reacciones enzimáticas claves para la célula, desnaturalizan proteínas bacterianas e inactivan ácidos nucleicos (Meza, 2006).

Calor húmedo: El calor húmedo como vapor saturado a presión es el método más seguro y más utilizado, en la esterilización con calor húmedo la causa de la muerte del microorganismo es distinta que la esterilización con calor seco; en efecto con calor húmedo el microbio muere porque se coagula la proteína celular, mientras que el calor seco destruye principalmente por medio de un proceso de oxidación. La esterilización al vapor es el empleo de vapor saturado a presión durante, por lo menos, 15 minutos a una temperatura de 121 °C en un recipiente de presión regulada (Vignoli, 2006).

#### **1.14. Antecedentes**

A principios de los 90, se reportó la embriogénesis somática por medio de tejido asexual (de partes florales) y la conversión de embriones somáticos a plantas; donde se indujo la embriogénesis somática en explantes de yemas de flores inmaduras de *Theobroma cacao L.* Se evaluó la influencia de la composición hormonal y la duración de la inducción. La tasa de embriogénesis fue variada entre los explantes de varios genotipos. Se desarrollaron plántulas con hojas y raíces transferidas en invernadero a partir de embriones somáticos (López *et al.*;1993).

Diferentes investigaciones para el progreso de protocolos para la propagación de cacao por cultivo de tejidos se han reportado pero los resultados más destacados se han alcanzado por Embriogénesis Somática, con fuentes de explante de embriones cigóticos, estaminoides y pétalos, pero con baja eficiencia y bajas tasas de conversión a plántula (Urrea *et al.*; 2011).

En busca de un protocolo de desinfección eficiente para *T. cacao l.* según Urrea *et al.*; 2011, determinaron que “la estreptomocina a 250 ppm como la concentración más adecuada para el control bacteriano en los explantes florales”, donde “el protocolo de asepsia optimizado permitió obtener resultados promedios de desinfección del 85% para el clon ICS95 y del 96% para el clon BIOB, porcentajes considerados altos para genotipos cuya procedencia fue de campo, donde se reconoce que la carga microbiana es mayor que para plantas provenientes de invernadero.”

Los efectos del medio de cultivo, el tipo de explante y el tiempo de cultivo en la inducción de estructuras proembriogénicas, después de 5 a 7 días en el medio de inducción, los explantes de cacao iniciaron la formación de callos en ambos medios de cultivo en el PCG e INDI (Henao *et al.*; 2017).

Según Díaz *et al*; 2015 lograron ver que en “los primeros 14 días, en el medio de cultivo PCG-DKW, se observó un incremento en el tamaño y volumen de los estaminodios y los pétalos del cacao en todos los cultivares, lo cual dio lugar a la formación de callos. Sin embargo, en algunos casos se observó necrosis de los explantes y no se formaron.”

Li *et al*; 1998 lograron inducir callo en estaminodios de cacao y notaron un crecimiento rápido del callo utilizando el medio DKW (Woody Plant Medium) para crecimiento primario y medio PCG (Primary Callus Growth) suplementado con Thidiazuron (TDZ).

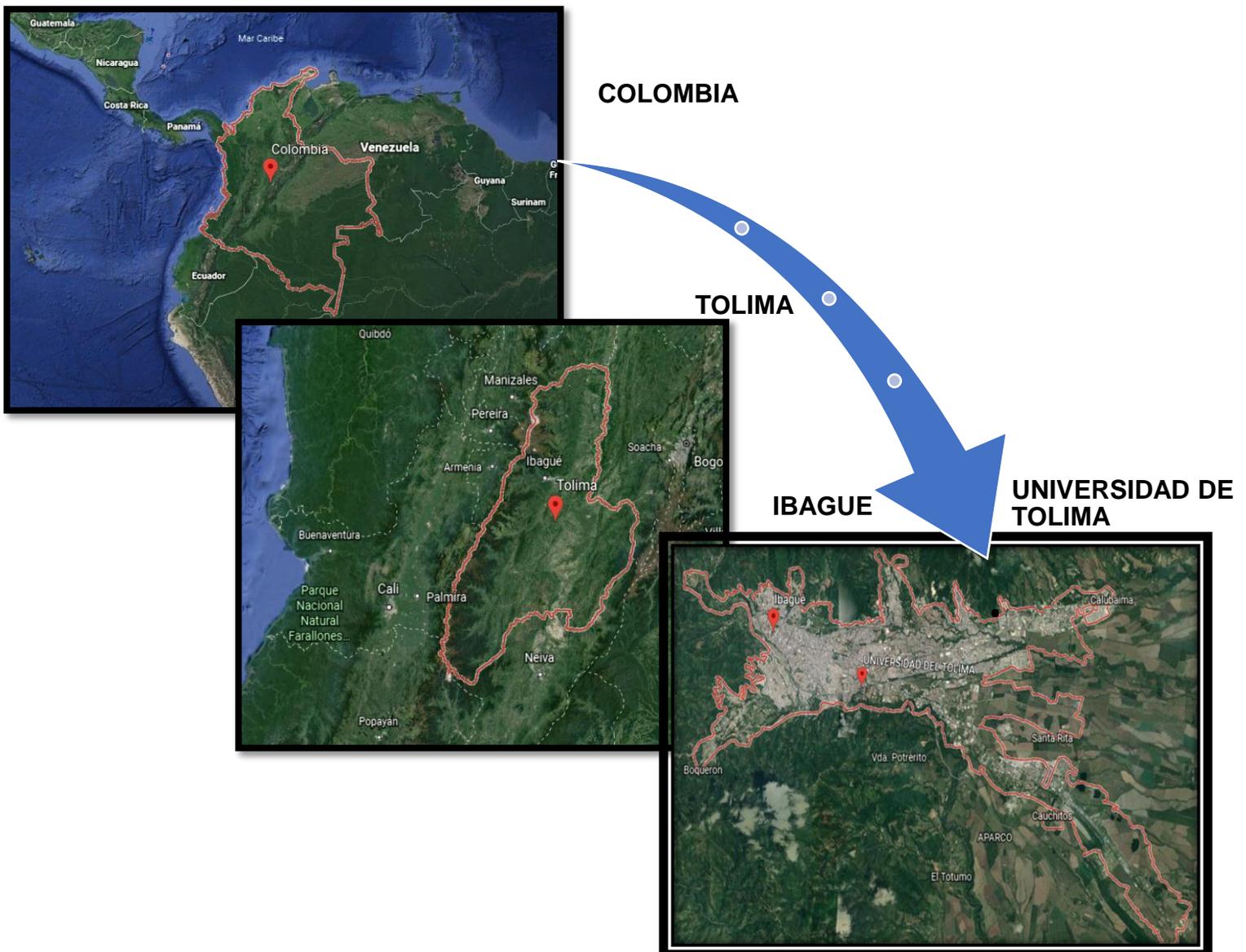
Chanatásig, 2004 obtuvo diferentes respuestas en inducción de callo por parte de tres clones (SCA6, UF273 y PA 169) en medio PCG con diferentes concentraciones de glucosa (20, 30,40 y 50 g/L) y sacarosa (20, 30,40 y 50 g/L). Donde a los 14 y 28 días encontró mayor desarrollo de callo en el clon SCA6 con respecto a los otros dos clones siendo en el medio PCG con glucosa en una concentración de 20 g/L la que mejor favoreció la inducción de callo.

## 2. METODOLOGÍA

### 2.1. Ubicación del lugar de trabajo

El desarrollo de la pasantía supervisada y del proyecto se ejecutó en el Laboratorio de Protección de Plantas de la Universidad del Tolima en la línea de Cultivo de Tejidos, Ibagué-Tolima, Colombia (figura 2).

**Figura 2.** Ubicación Geográfica de Colombia y de la ciudad de Ibagué -Tolima.



**Fuente:** GoogleEarth

## Perfil de la entidad

El laboratorio de protección de plantas (LPP) inicio en febrero del 2001 con investigaciones encaminadas primordialmente en ciencias básicas y biotecnología vegetal, en las áreas de biología general y ciencias biológicas. Sus líneas de investigación son: Cultivo de tejidos, Palinología, Genética y Biotecnología Vegetal.

## 2.2. Material vegetal

Para el proyecto se utilizaron botones florales de cacao de los clones CCN51 y ICS95, que fueron recolectados en cultivos del municipio de Mariquita, Tolima. Algunas de las características de estos clones son presentadas en la tabla 2.

**Tabla 2.** Características de los clones estudiados.

Clon	Origen	Tipo genético	Compatibilidad	Color del fruto	Producción	Resistencia a enfermedades		
						<i>Monilia</i>	<i>Phytophthora</i>	<i>Escoba de bruja</i>
ICS 95	Trinidad	Trinitario	Autocompatible	Rojo	Media	R	T	S
CCN 51	Ecuatoriano	Forastero	Autocompatible	Rojo	Alta	T	S	T

R= resistente, S= susceptible, T= tolerante. **Fuente:** Autor

## 2.3. Reguladores de crecimiento

Los reguladores (2,4-D y TDZ) para los medios de cultivo se prepararon siguiendo la metodología del CACAO TISSUE CULTURE, PROTOCOL BOOK OF USDA.

- Regulador 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético), en concentración (1mg/ml)

Se prepararon 25 ml del regulador agregando 12,5 ml de etanol al 95% para disolver el polvo del regulador 2,4-D. Para completar el volumen de la solución se adicionó agua Milli-Q (agua tipo I). Almacenándolo a 4 °C.

- Regulador Thidiazuron (TDZ). En concentración (0,2 mg/ml).

Un 1 mg de TDZ se diluyó en 1ml de Dimetilsulfóxido (DMSO) y luego se añadió 4ml de agua Milli-Q para obtener la concentración, posteriormente se separó en tubos micro-fuga en cantidades de 1ml. Almacenándolo a 4 °C.

## 2.4. Medios de cultivo

Medio MS (MURASHIGE Y SKOOG, 1962).

Se desinfecto el área de trabajo con alcohol al 70% para ofrecer condiciones asépticas, luego, se diluyeron las sales de la A hasta la G, en agua destilada esterilizada. Se agregó sacarosa 30 g/L, después se adicionaron los reguladores 2,4-D (1 mg/ml stock) y/o (0,2 mg/ml stock), 2 ml o 0.4 ml por litro de medio y TDZ (0,2 mg/ml stock) y/o (1 mg/ml stock), 25 ul o 125 ul por litro de medio. Se equilibró el pH entre 5,6 o 5,7 con el pH-metro Basic Sartorius. Se adiciono agar 8 g/L y se colocó a calentar hasta llegar al punto de ebullición. Se pasó a servir 10 ml del medio en cada caja Petri de (35x10mm). Posteriormente se esterilizó en autoclave por 20 min a 15 PSI (Ver tabla 3).

**Tabla 3.** Composición y preparación de soluciones stock del medio de MS.

SOLUCIÓN		Sales	Concentración del stock g/L	g/ 500 ml	[Fina l] mg/L	Cantidad de Sal para 200 ml [] deseada	Alícuota para 1 L de medio	
NUTRIENTES	MACRO	A	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	82.5	41.25	1650	[10]	20ml
		B	KNO <sub>3</sub>	95.0	47.50	1900	[10]	20ml
		C	CaCl <sub>2</sub> * 2H <sub>2</sub> O	88.0	44.00	440	[40]	5ml
		D	KH <sub>2</sub> PO <sub>3</sub>	34.0	18.00	170	[40]	5ml
	MICRO	E	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1.24	0.62	6.2	[40]	5ml
			Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> *2H <sub>2</sub> O	0.05	0.025	0.25		
			CoCl <sub>2</sub> *6H <sub>2</sub> O	0.005	0.0025	0.025		
			KI	0.166	0.083	0.83		
		F	MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	74.0	37.00	370.0	[40]	5ml
			MnSO <sub>4</sub> *4H <sub>2</sub> O	3.45	1.725	22.3		
G	ZnSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	1.76	0.86	8.6	[40]	5ml		
	CuSO <sub>4</sub> *5H <sub>2</sub> O	0.005	0.0025	0.025				
SUPLEMENTOS NUTRICIONALES	Tiamina		0.02	0.01	0.01			
	Ac. Nicotínico		0.1	0.05	0.05			
	Piridoxina		0.1	0.05	0.05			
	Glicina		0.1	0.20	0.20			
OTROS COMPONENTES	Inositol		100mg/L	50mg/L				
	Sacarosa		30	15				
	Agar		8	4				

Fuente: Bitácora de medios de cultivos del Laboratorio de Protección de Plantas 2007.

**Medio PCG** (Primary Callus Growth Medium).

### Sales macro y micro del medio PCG

La preparación de las sales DKW (Woody Plant Medium) macro, micro y DKW vitaminas para el medio PCG se realizaron con la metodología del CACAO TISSUE CULTURE PROTOCOL BOOK OF USDA, 2003; diluyendo cada uno de los nutrientes que las componen, en agua destilada esterilizada (Ver tabla 4). Luego se esterilizaron en autoclave por 20 min a 15 PSI.

**Tabla 4.** Composición y preparación de soluciones stock DKW (Woody Plant Medium) macro, micro y vitaminas del medio PCG.

SOLUCIÓN		Nutrientes	Concentración del stock g/L
DKW 10X elementos macro de las soluciones	<b>A</b>	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	14.16
		Ca (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	19.69
	<b>B</b>	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	1.49 agregar primero
		K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	15.59
		MgSO <sub>4</sub> . 7 H <sub>2</sub> O	7.40
		KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2.65
DKW 100X micro elementos		Zn (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	1.7
		H <sub>2</sub> O	3.34
		MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	0.025
		CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0.480
		H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.039
		Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	3.38
		FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	4.54
		Na -EDTA	
SOLUCIÓN		Nutrientes	Concentración del stock g/100 ml
DKW 1000X vitaminas		Myo-Inositol	10
		Tiamina-HCL	0.2
		Ácido Nicotínico	0.1
		Glicina	0.2

**Fuente:** CACAO TISSUE CULTURE PROTOCOL BOOK OF USDA, 2003.

## Procedimiento de preparado del medio PCG

Para realizar el medio PCG, primero se desinfecto el área de trabajo con alcohol al 70%. Se disolvieron en agua destilada esterilizada las sales DKW macro (10X) A y B 100ml/L, micro (100X) 10 ml/L y las vitaminas 1ml/L (Ver tabla 5). Luego se agregó glucosa 20 g/L, glutamina 250 mg/L, Myo- Inositol 100 mg/L, después se adicionaron los reguladores 2.4-D (1 mg/ml stock) y/o (0.2 mg/ml stock), 2 ml o 0.4 ml por litro de medio y TDZ (0.2 mg/ml stock) y/o (1 mg/ml stock), 25 ul o 125 ul por litro de medio. Se equilibró el pH a 5.8 (1M KOH) con el pH-metro Basic Sartorius. Se adiciono agar 30 g/L y se colocó a calentar hasta llegar al punto de ebullición. Se pasó a servir 10 ml del medio en cada caja Petri de (35x10mm). Posteriormente se esterilizó en autoclave por 18 min a 15 PSI.

**Tabla 5.** Composición y cantidades del medio PCG.

Cantidad del medio	1L
DKW macro A (10X)	100 ml
DKW macro B (10X)	100 ml
DKW micro (100X)	10 ml
DKW vitaminas (1000X)	1 ml
Glucosa	20 g
Glutamina	250 mg
Myo-Inositol	100 mg
2,4-D (1 mg/ml stock) o (0,2 mg/ml stock)	2 ml o 0.4 ml
TDZ (0,2 mg/ml stock) o (1 mg/ml stock)	25 ul o 125 ul
pH	5.8 (1 M KOH)
Agar	30 g
Tiempo de esterilización en autoclave	18 min

**Fuente:** CACAO TISSUE CULTURE, PROTOCOL BOOK OF USDA, 2003.

### 2.5. Recolección y desinfección del material vegetal.

La colecta de las flores en estado de botón floral, fue entre las 8 y 9 de la mañana, con el objetivo de impedir la apertura de estos por la acción de la luz solar. Para la desinfección se utilizó el protocolo utilizado por (Urrea *et al*; 2011).

### Protocolo para la recolección del material desde campo hasta las ubicaciones del sitio de disección.

Se recolectaron los botones florales en tubos falcón con 50 ml de NaClO al 1% a 4 °C, en cada tubo se depositaron de 50 a 60 botones florales, se agitaron manualmente durante 2 o 3 minutos, luego se enjuagaron 3 veces con agua destilada autoclavada y se almacenaron en la misma a 4°C, manteniéndolos a

esta temperatura hasta el sitio de disección y se siguió con el protocolo simplificado en el laboratorio como se observa en la figura 3:

**Figura 3.** Botones florales de *Theobroma cacao* L. en agua destilada esterilizada a 4°C.



**Fuente:** Autor

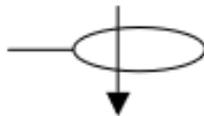
### **Protocolo para la esterilización superficial de botones florales en laboratorio.**

Los botones florales se colocaron en NaClO 1%, luego se dejaron en agitación durante 30 minutos en el agitador magnético KIKA KS 250 Basic. Posteriormente se cambió el NaClO 1% por la solución del antibiótico (estreptomocina de 250 ppm) donde en cada 50 ml de agua destilada se aplicaron 12.5 mg del antibiótico; y se agitaron de nuevo los explantes en el antibiótico durante 30 min. Luego se realizaron 3 lavados con agua destilada autoclavada.

### **2.6. Siembra del material vegetal**

Se introdujeron a la cámara de flujo laminar los medios y los botones florales después de la desinfección. Se rebanaron con ayuda del bisturí N°4 los botones florales en una posición 1/3 de la longitud de la flor (Ver Figura 4.), luego se pasó a la siembra de los explantes (Estaminodios y Base de pétalos) en cada uno de los medios y cada tratamiento presentados en la tabla 6.

**Figura 4.** Corte para extracción de explantes del botón floral del cacao.



**Fuente:** Autor

Los explantes fueron colocados en cajas Petri conteniendo 10 ml de medio de cultivo. En cada caja Petri se colocó 5 estaminoides y 5 bases de pétalos, pertenecientes a un mismo botón, distribuidos uniformemente en toda la superficie

del medio, asegurando un buen contacto de los explantes con el medio de cultivo (tabla 6).

**Tabla 6.** Medios de Cultivo y tratamientos a utilizar para la Inducción de Callo en explantes (Estaminodios y Base de pétalos) de *Theobroma cacao L.*

MEDIOS DE CULTIVO	TRATAMIENTOS	2,4D mg/ml stock	TDZ mg/ml stock	Explantes
PCG	T1	(1 mg/ml stock)	(0,2 mg/ml stock)	Base de pétalos Estaminodios
	T2	(0,2 mg/ml stock)	(1 mg/ml stock)	Base de pétalos Estaminodios
MS	T1	(1 mg/ml stock)	(0,2 mg/ml stock)	Base de pétalos Estaminodios
	T2	(0,2 mg/ml stock)	(1 mg/ml stock)	Base de pétalos Estaminodios

**Fuente:** Autor

Posteriormente se dejaron en el cuarto de cultivo *in vitro* del laboratorio el cual cuenta con condiciones controladas de temperatura y luminosidad. Para su evaluación se dejaron en oscuridad las 24 horas del día, se realizaron observaciones con el estereoscopio OLYMPUS SZX16 a los 14 y 30 días para ver el comportamiento de los explantes en cada uno de los tratamientos.

## 2.7. Muestra sembrada y variables de respuesta.

Para el estudio se sembraron un total de 400 base de pétalos y 400 estaminodios de los dos clones, de estos 100 por cada tratamiento. Para evaluar la respuesta de los explantes de los dos clones, se establecieron las siguientes variables de estudio:

- Asepsia de los explantes según el protocolo de Urrea *et al*; 2011, donde se determinó el porcentaje de asepsia del total de los explantes sembrados por cada clon, como muestra la siguiente expresión (ecuación 1):

$$\text{Ecuación 1. Porcentaje de asepsia} = \frac{N^{\circ} \text{ de explantes contaminados}}{N^{\circ} \text{ total de explantes sembrados}} * 100$$

N° total de explantes sembrados= 400

- Interacción entre medio de cultivo y tipo de explante

Por cada tratamiento de los dos medios se observó explantes con presencia de callo (PC), oxidados (Oxi) y sanos sin callo (SC) en cada uno de los clones. De esta manera se evaluó el comportamiento de los explantes y como influyo cada medio con sus respectivos tratamientos en los dos clones. Las siguientes expresiones matemáticas (ver ecuaciones 2,3 y 4) plasman como se obtuvieron cada una de las variables consideradas.

#### **Ecuación 2.**

$$(\%) \text{ explantes PC} = \frac{N^{\circ} \text{ de explantes con presencia de callo}}{N^{\circ} \text{ total de explantes sembrados por tratamiento}} * 100$$

#### **Ecuación 3.**

$$(\%) \text{ explantes Oxi} = \frac{N^{\circ} \text{ de explantes oxidados}}{N^{\circ} \text{ total de explantes sembrados por tratamiento}} * 100$$

#### **Ecuación 4.**

$$(\%) \text{ explantes SC} = \frac{N^{\circ} \text{ de explantes sin callo}}{N^{\circ} \text{ total de explantes sembrados por tratamiento}} * 100$$

N° total de explantes sembrados por tratamiento= 100

- Viabilidad de los explantes base de pétalos y estaminodios a producción de callo.

En esta variable se comparó los explantes base de pétalos y estaminodios de forma independiente, estableciendo cual obtuvo una mejor reacción a la producción de callo de cada clon. Con la siguiente (ecuación 5.) expresión se determinó esta variable:

#### **Ecuación 5.**

$$\% \text{ explantes con producción de callo} = \frac{N^{\circ} \text{ de explantes con callo}}{N^{\circ} \text{ total de explantes sembrados}} * 100$$

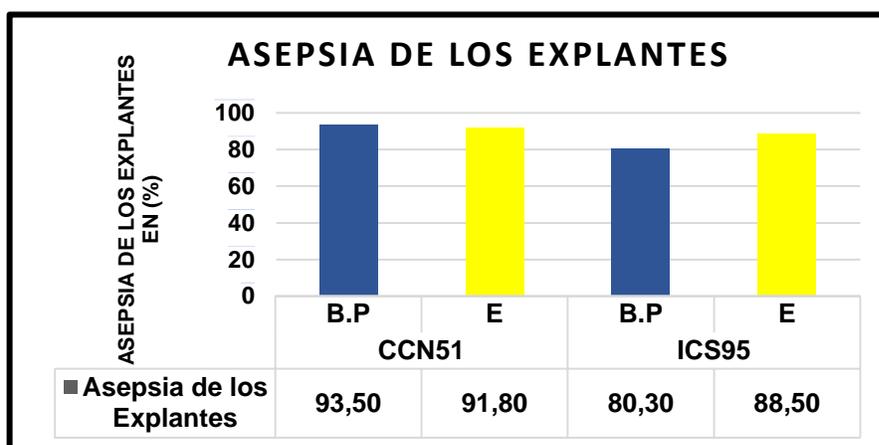
N° total de explantes sembrados= 400

### 3. RESULTADOS Y DISCUSION

#### 3.1. Establecimiento de cultivos asépticos.

Los resultados de la Figura 5, plasman los niveles logrados de asepsia en los explantes (Base de pétalos y Estaminodios) de los clones ICS95 y CCN51, obteniendo valores promedios por encima del 80% y 90% respectivamente, estos son similares a los logrados por Urrea *et al*; 2011, donde lograron el 85% de desinfección en el clon ICS95 y el 96% en el clon BIOB.

**Figura 5.** Asepsia de los explantes en los clones CCN51 y ICS95.



. E= estaminodios, B. P= Base de pétalos. **Fuente:** Autor

Por otra parte, son pocos los autores que han escrito sobre la asepsia de los explantes de cacao, uno de ellos es Chanatásig, 2004 que utilizando el tratamiento establecido por Rivera (2003), el cual consiguió niveles de asepsia cercanos al 100% en tres clones de cacao.

De igual forma obtener cultivos totalmente estériles es muy difícil y más de genotipos donde su procedencia es de campo, de este modo, se logró corroborar que el protocolo de desinfección de Urrea *et al*; 2011, es eficiente para el establecimiento de cultivos asépticos en explantes del cacao (base de pétalos y estaminodios), y se obtuvo que para el clon CCN51 también se puede manejar este protocolo de desinfección.

### 3.2. Interacción entre medio de cultivo y tipo de explante de cada clon.

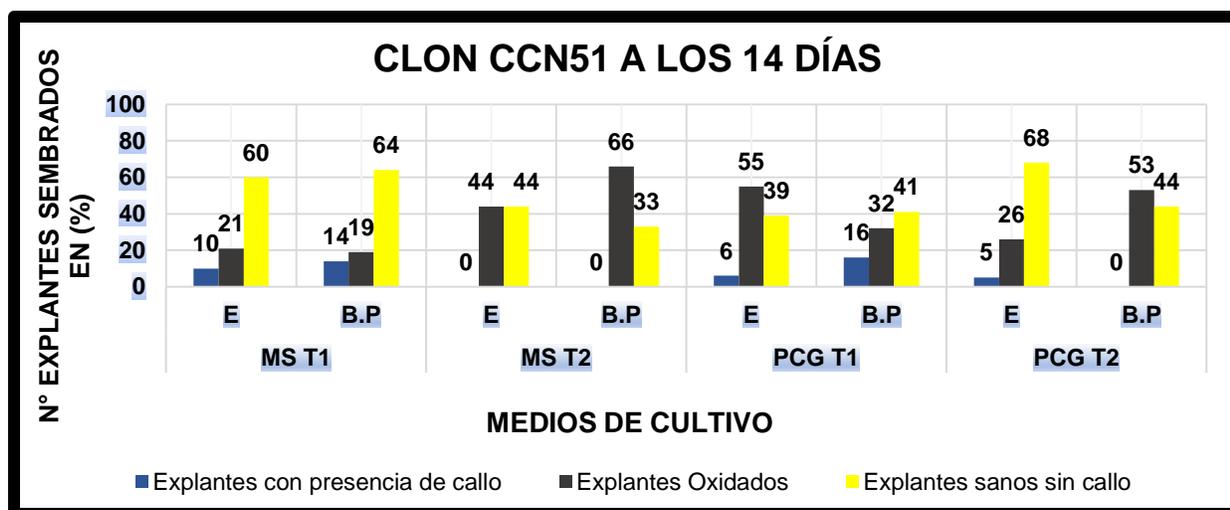
#### 3.2.1. Clon CCN51

➤ Observación a los 14 días.

La Figura 6, muestra que a los 14 días de siembra la mejor interacción a la inducción de callo se dio en los medios MS y PCG con el tratamiento T1 (2,4-D 1 mg/ml y TDZ 0,2 mg/ml Stock) , que oscilaron entre el 6-16% en los dos explantes, el medio PCG con el tratamiento T2 (2,4-D 0,2 mg/ml y TDZ 1 mg/ml Stock) se presencié callo solo en el explante estaminodio con un 5%; estos resultados son significativamente menores a los comparados con los de (Monsalve *et al*; 2005) que logro en el clon CCN51 entre el 10-62% de explantes con callo en los medios CEP1 y CEP2 con sales basales DKW 100% con una concentración de 2,4-D (2mg/l) y TDZ (0,005 mg/l); y una concentración de 2,4-D (2 mg/l) respectivamente.

Por otro lado, se evidencio que la oxidación se presentó en los dos medios y en cada tratamiento, donde se obtuvo valores promedios en un rango del 19% al 66% de oxidación tanto en estaminodios como en base de pétalos, según Azofeita, 2009 esto se debe que en el establecimiento *in vitro* de tejidos vegetales de algunas especies de plantas, especialmente las leñosas, son limitadas por oscurecimientos letales en los explantes y en el medio de cultivo. Finalmente se obtuvo un porcentaje superior del 30% de explantes sanos sin callo en los dos medios.

**Figura 6.** Comportamiento del Clon CCN51 a los catorce días de siembra en los medios de cultivo.



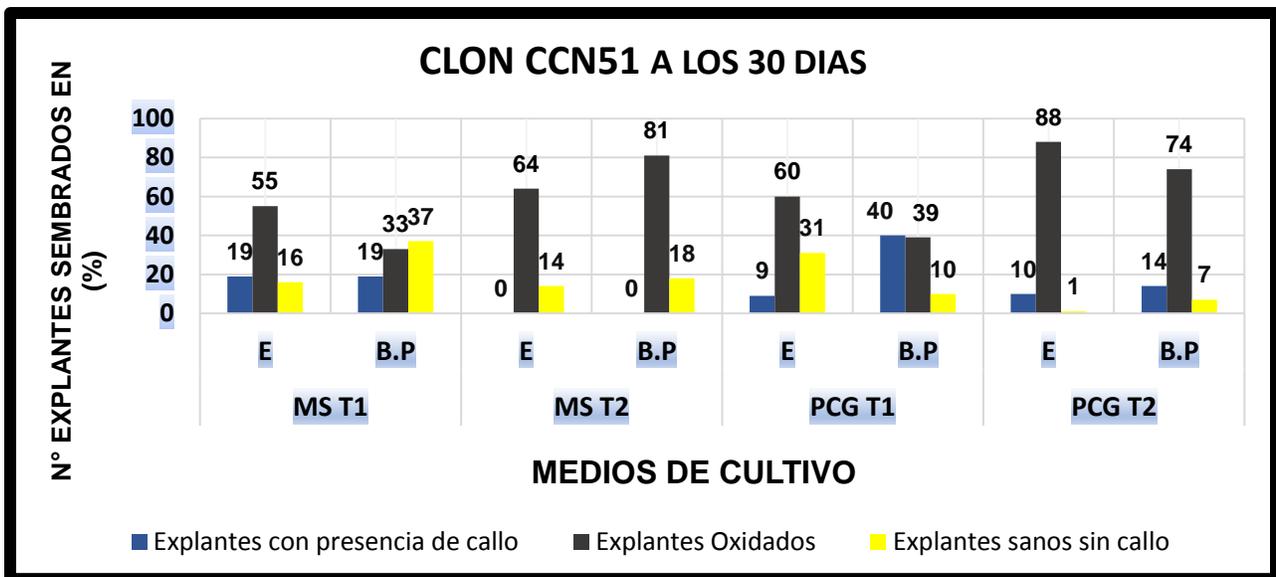
E= estaminodios, B.P= Base de pétalos. Fuente: Autor.

➤ Observación a los 30 días

Como muestra la figura 7, los medios MS T1 (2,4-D 1 mg/ml y TDZ 0,2 mg/ml Stock), PCG T1 (2,4-D 1 mg/ml y TDZ 0,2 mg/ml Stock) y PCG T2 (2,4-D 0,2 mg/ml y TDZ 1 mg/ml Stock) obtuvieron un aumento en los explantes con callo logrando un rango del 9-40%, estos se asemejan a los obtenidos por (Monsalve *et al*; 2005), lo cual indica que estos medios a los 30 días dieron un mejor desarrollo a la inducción de callo; pero no son tan significativos como los obtenidos por (Cabrera, 2011) donde alcanzaron valores del 100% de explantes con callo del clon CCN 51 con una concentración de 2,4- D de 5 mg/L en medio MS. En la figura 8 se puede observar los callos obtenidos del clon CCN51 en los medios que lograron este estado.

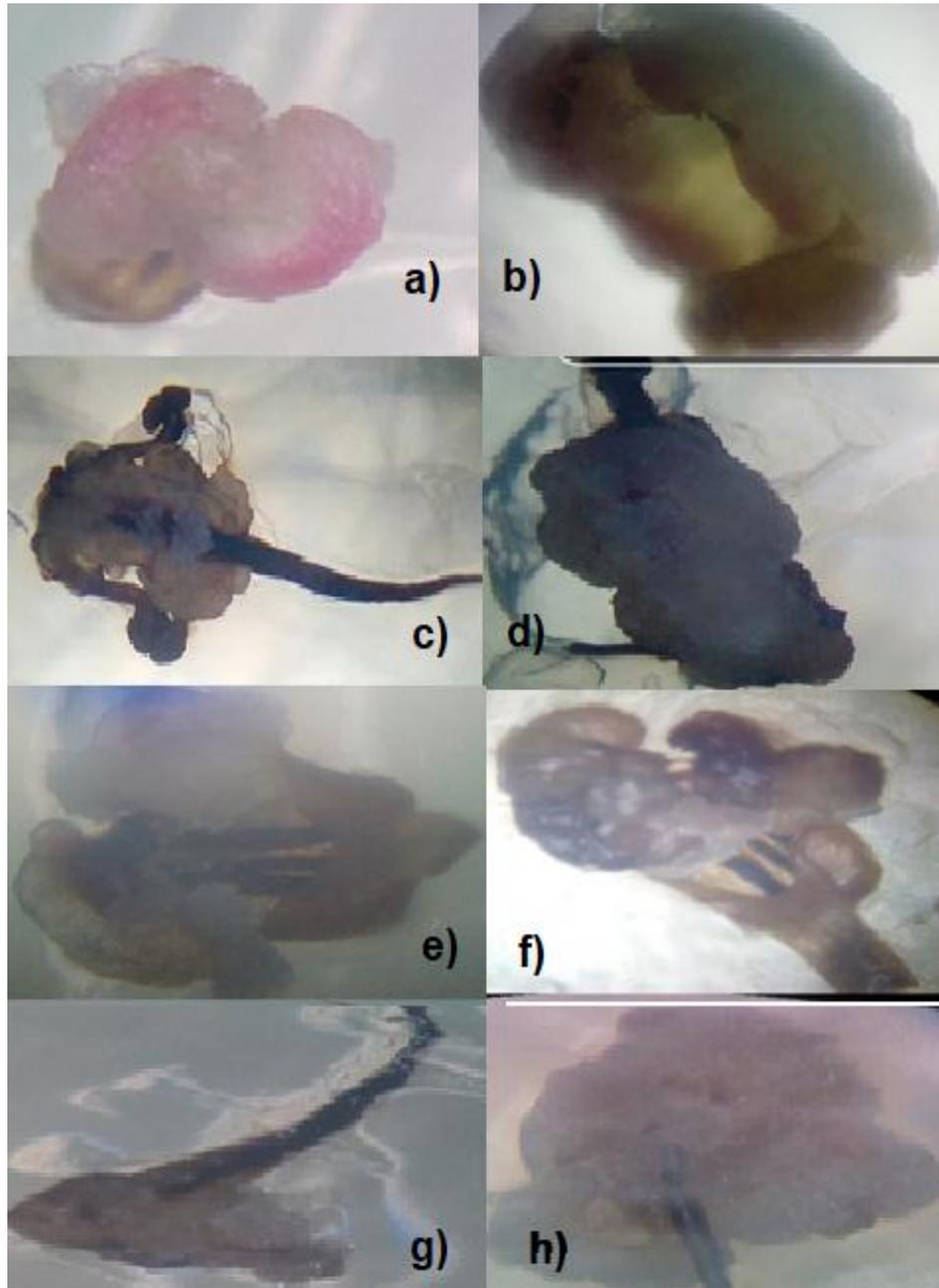
La oxidación a los 30 días en cada tratamiento de los dos medios fue alta donde se alcanzó un rango del 55% al 88% en estaminodios y en base de pétalos del 33% al 81% de explantes oxidados; esto puede ser relacionado según Azofeita, 2009 “por el efecto abrasivo del agente desinfectante aplicado durante la asepsia del explante, los cortes que sufre el explante, composición del medio de cultivo, volumen y calidad del frasco de cultivo”. Con lo anterior el porcentaje de explantes sanos sin callo disminuyó en todos los tratamientos.

**Figura 7.** Clon CCN51 a los treinta días de siembra en los medios de cultivo.



E= estaminodios, B.P= Base de pétalos. **Fuente:** Autor.

**Figura 8.** Formación de callo en explantes de cacao del clon CCN51.



a) y b) base de pétalo en medio MS T1 a los 14 y 30 días de siembra respectivamente. c) y d) estaminodios en medio MS T1 a los 14 y 30 días de siembra consecutivamente. e) y f) base de pétalo en medio PCG T1 a los 14 y 30 días de siembra respectivamente. g) y h) estaminodios en medio PCG T2 a los 14 y 30 días de siembra correspondientemente. **Fuente:** Autor.

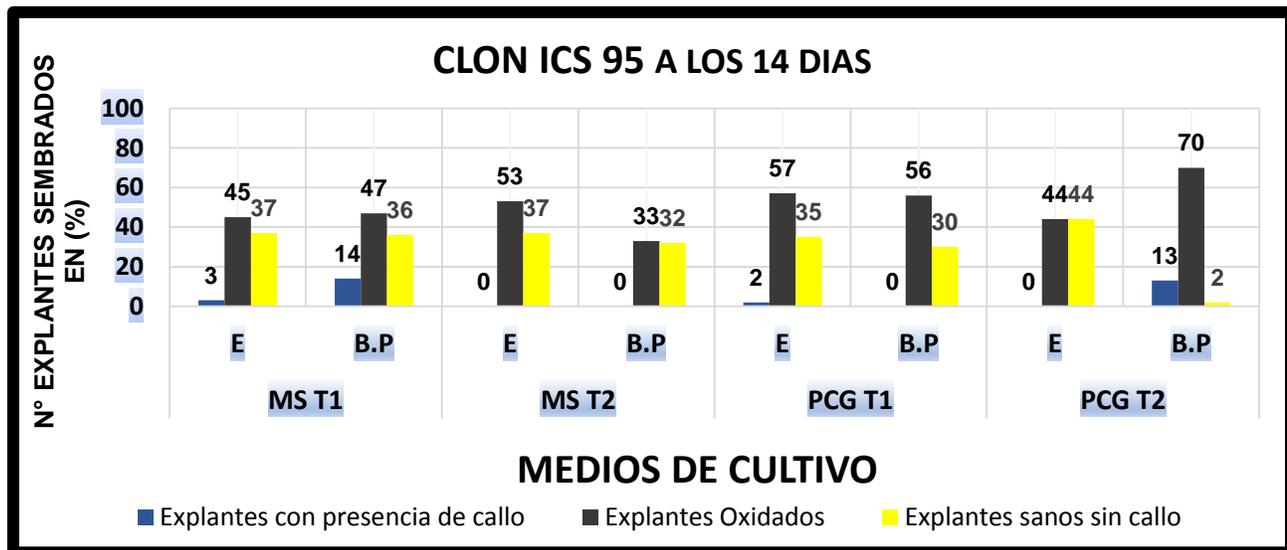
### 3.2.2. Clon ICS95

➤ Observación a los 14 días

A los 14 días de siembra del clon ICS95 como muestra la figura 9, se logró un bajo porcentaje de inducción de callo, alcanzando así solo en el medio MS con el T1 (2,4-D 1 mg/ml y TDZ 0,2 mg/ml Stock) callo en los dos explantes con un porcentaje para estaminodios del 3% y en base de pétalos del 14%; el medio PCG con los tratamientos T1 (2,4-D 1 mg/ml y TDZ 0,2 mg/ml Stock) y T2 (2,4-D 0,2 mg/ml y TDZ 1 mg/ml Stock) solo lograron callo en un explante, el primero en estaminodios y el otro en base de pétalos y su porcentaje fue menor al 14%. Para este clon Monsalve *et al*; 2005, encontró un comportamiento intermedio en cuanto a la respuesta del clon CCN51 en los medios CEP1 y CEP2 con sales basales DKW 100% con una concentración de 2,4-D (2mg/l) y TDZ (0,005 mg/l); y una concentración de 2,4-D (2 mg/l) respectivamente, donde no encontró diferencias significativas.

En cuanto a la oxidación se presentaron altos porcentajes en los dos medios, donde para los explantes se tornó en un rango del 33% al 70% de oxidación; esto pudo darse a los factores nombrados por (Azofeita, 2009) anteriormente. Por último, el porcentaje de explantes sanos sin callo para cada medio con sus respectivos tratamientos estuvo entre el 30% al 44% en los dos explantes, excepto en el explante base de pétalo en el medio PCG T2 que fue del 2%.

**Figura 9.** Clon ICS95 a los catorce días de siembra en los medios de cultivo.

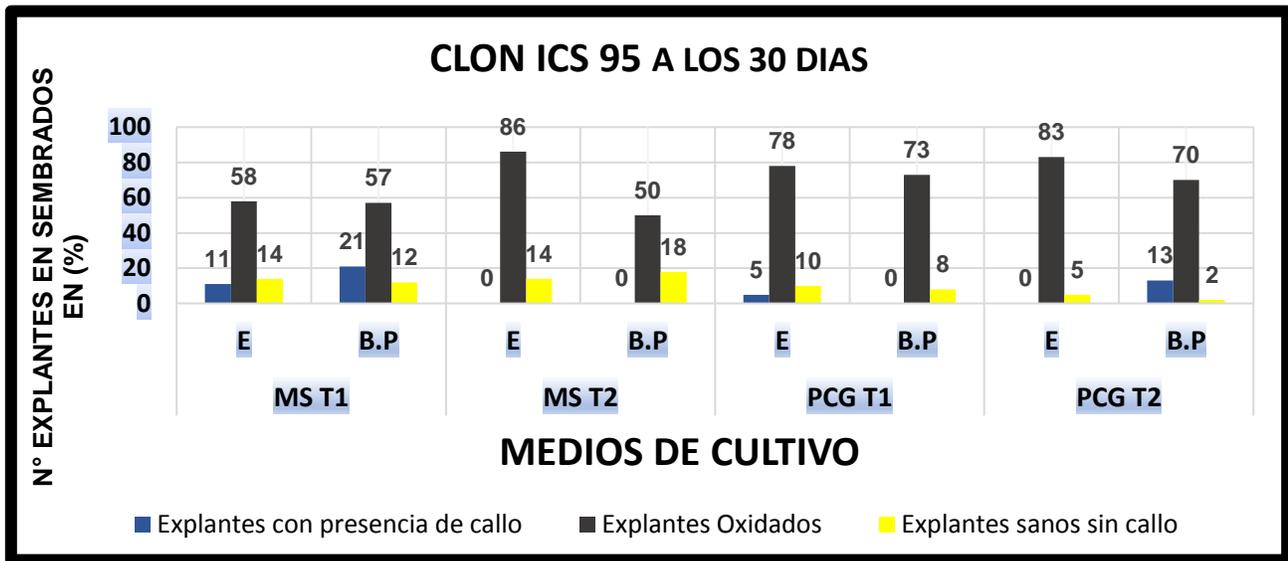


E= estaminodios, B.P = Base de pétalos. **Fuente:** Autor.

➤ Observación a los 30 días

En la Figura 10, se muestra el clon ICS95 en los medios a los treinta días donde el comportamiento fue poco en la inducción de callo, en cuanto explantes oxidados los porcentajes obtenidos siguieron aumentando obteniendo valores hasta el 80 %, por ende, disminuyo de manera considerable los explantes sanos sin callo. En la figura 11 se muestran los explantes que consiguieron el estado de callo a los 14 y 30 días en los medios.

**Figura 10.** Clon ICS 95 a los treinta días de siembra en los medios de cultivo.

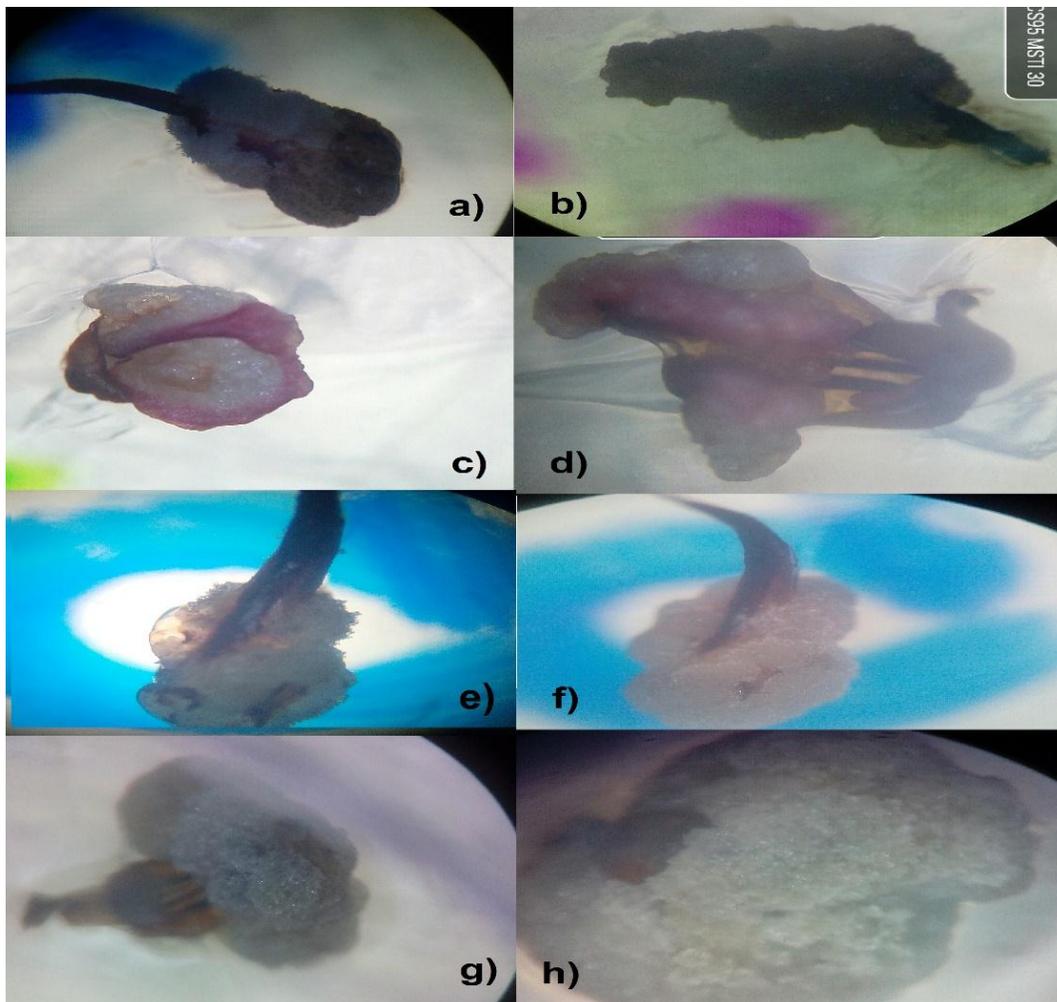


E= estaminodios, B.P = Base de pétalos. **Fuente:** Autor

De esta manera el clon CCN51 fue más susceptible a la inducción de callo que el clon ICS95 con los medios, donde sobresale el tratamiento 1 (2,4-D 1 mg/ml y TDZ 0,2 mg/ml Stock) del medio MS el cual consiguió inducir callo en cada explante de los dos clones.

Las hormonas de crecimiento 2,4-D y TDZ son el factor determinante en la inducción de callo donde en concentraciones que favorezcan a cada clon se podrían obtener un avance en la inducción de callo. Donde según sus estudios de Li *et al*; 1998, Monsalve, 2005 las bajas concentraciones de TDZ usadas en esta etapa afectan positivamente el crecimiento del callo, y por otro lado Cabrera, 2011 encontró que aumentando la concentración de 2,4-D por encima de 5 mg/L disminuye la inducción de callo.

**Figura 11.** Formación de callo en explantes de cacao del clon ICS95.



a) y b) Estaminodios en medio MS T1 a los 14 y 30 días de siembra respectivamente. c) y d) Base de pétalos en medio MS T1 a los 14 y 30 días de siembra consecutivamente. e) y f) Estaminodios en medio PCG T1 a los 14 y 30 días de siembra respectivamente. g) y h) Base de pétalos en medio PCG T2 a los 14 y 30 días de siembra correspondientemente. **Fuente:** Autor.

### 3.3. Viabilidad de explantes a inducción de callo

La Figura 12, compara los explantes (Base de pétalos y estaminodios) de cada clon en la producción de callo, obteniendo en los dos clones CCN51 y ICS95 el doble de producción de callo en el explante base de pétalos a comparación con los estaminodios; teniendo en cuenta que en el clon CCN51 en el medio MS T2 fue nula la presencia de callo en los dos explantes y que en el clon ICS95 la presencia de callo en base de pétalo fue nula en los medios MS T2 y PCG T1; y en estaminodios fue ausente en los medios MS T2 y PCG T2.

**Figura 12.** Comparación de explantes (Base de pétalos y estaminodios) en la producción de callo.



Fuente: Autor

Estos resultados son similares a los de (Cabrera, 2011) donde los explantes base de pétalos mostraron mejores resultados (100%, 85,7% y 81,8%) en la formación de callos en medios de cultivo con altas concentraciones de 2,4-D al compararse con los estaminoides (60%, 88,8% y 44,4%). Sin embargo, son contrarios a los de (Díaz López, 2015 y Chantásig, 2004 ), estos autores encontraron que a los 14 días de cultivo el estaminodio mostró una tendencia a formar mayor cantidad de callo que la base de pétalo; Monsalve *et al*; 2005 afirma que esta tendencia de los estaminodios puede deberse a la naturaleza de las células que los conforman o a su forma recta y alargada, que a diferencia de los petaloides que tienen una curva en forma de cuello de cisne entre la capucha y la lígula, que le dificulta un mayor contacto con el medio. Con lo anterior se puede deducir que las concentraciones de las hormonas afectan directamente en la ausencia o presencia de callo en los explantes de cacao.

#### **4. CONCLUSIONES**

El protocolo de desinfección utilizado fue óptimo para los clones ICS95 y CCN51 obteniendo niveles altos de asepsia en cada uno de los explantes.

De los tratamientos utilizados el que mejor dio respuesta a la inducción de callo fue el T1 con (2.4-D en concentración de 1 mg/ml stock) y (TDZ en concentración de 0.2 mg/ml stock) de los dos medios.

El clon CCN51 obtuvo mayor porcentaje de callo de un 9% a un 40% a comparación del ICS95 que obtuvo un rango entre un 5% a 21%, en los medios utilizados.

El medio MS con el T2 con (2.4-D en concentración de 0,2 mg/ml stock) y (TDZ en concentración de 1 mg/ml stock) no influyo para que los explantes de los dos clones llegaran a inducir callo.

Los porcentajes logrados de explantes oxidados afectan en gran medida en los niveles alcanzados de inducción de callo en los dos clones.

La inducción de callo en los clones ICS95 y CCN 51 es determinada por el tipo de hormona y la concentración utilizada.

Los explantes de pétalos mostraron mejores resultados en la formación de callos al compararse con los estaminoides.

## **5. RECOMENDACIONES**

Emplear diferentes protocolos de desinfección y así determinar que influencia tienen en la oxidación de explantes.

Realizar nuevos experimentos para optimizar el proceso usando antioxidantes y así disminuir el porcentaje tan alto de oxidación y aumentar la inducción de callo en los explantes florales.

Utilizar los tratamientos con los mejores resultados aumentando el tamaño de la muestra.

Continuar con la investigación para lograr obtener embriones somáticos a partir de los explantes florales de cacao de los clones ICS95 y CCN 51.

## BIBLIOGRAFÍA

- Alba Torres, N., & Araujo Estrada, F. L. (2008). *Evaluación de los desinfectantes utilizados en el proceso de limpieza en el área fitoterapéuticos en laboratorios Ltda.* Bogotá.
- Arévalo, E., Zuñiga, L., Arévalo, C., & Adriazola, J. (2004). *Cacao: Manejo integrado del cultivo y transferencia de tecnología en la Amazonía peruana.* Instituto de cultivo tropicales. Perú.
- Azofeita, Á. (2009). *Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados in vitro.* *Agronomía meso americana*, 153-175.
- Cabrera, P. (2011). *Formación de callos y establecimiento de suspensiones celulares en el cultivo de cacao (Theobroma cacao L.).* La Maná, Cotopaxi, Ecuador.
- Castillo, M. C. (2013). *Aplicación de la micropropagación y criopreservación a la conservación ex situ de especies vegetales de interés.* Universidad de Alicante. Alicante, España
- Chanatásig Vaca, C. I. (2004). *Inducción de la embriogénesis somática en clones superiores de cacao (Theobroma cacao L.), con resistencia a enfermedades fungosas.* Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza CATIE. Turrialba, Costa Rica.
- Díaz López, A. A., Sánchez, D., Valera Leal, J., & Vegas García, A. L. (2015). *Formación de embriones somáticos en cinco cultivares de Theobroma cacao L. cultivados en Venezuela.* *Bioteología Vegetal*, (27-34).
- Díaz Téllez, E. Y., & Urbina Espino, J. W. (2015). *Estudio sobre la auto- inter-compatibilidad de 5 clones de cacao (Theobroma cacao L.).* Managua, Nicaragua.
- Doster, N., Roque, J., Cano, A., La Torre, M., & Maximilian, W. (2012). *Hoja Botánica: Cacao.* Giacomotti Comunicación Gráfica S.A.C. Lima-Perú.
- FAO. (2010). *CACAO Operaciones Postcosecha.* AGST/FAO Danilo Mejía, PhD, FAO. Veracruz, México.
- FEDECACAO. (10 de junio de 2011). *Mayores Oportunidades para el cacao.* *Revista de la Federación Nacional de Cacaoteros*, (Pág.7).
- FEDECACAO. (Diciembre de 2013). *Guía ambiental para el cultivo del cacao.* Ministerio de agricultura y desarrollo rural. Colombia.

- Henao Ramírez, A. M., de la Hoz Vasquez, T., Ospina Osorio, T. M., Atehortúa Garcés, L., & Urrea Trujillo, A. I. (2017). *Evaluation of the potential of regeneration of different Colombian and commercial genotypes of cocoa (Theobroma cacao L.) via somatic embryogenesis*. ScienceDirect, 148-156.
- Hurtado, D., & Merino, M. (1997). *Cultivo de Tejidos Vegetales*. Ed, Trillas.
- ICCO. (2017). *ICCO Cuts Estimate for Global Cocoa Deficit in 2015–16*. Obtenido de <https://www.wsj.com/articles/icco-cuts-estimate-for-global-cocoa-deficit-in-2015-16>
- ITC. (2001). International Trade Centre. *Cocoa; A Guide to Trade Practices*. Geneva: Product and Market Development, 180.
- J. Trigo, E., Traxler, G., E. Pray, C., & G. Echeverría, R. (2002). *Biología agrícola y desarrollo rural en América Latina y el Caribe: implicaciones para el financiamiento*. Banco Interamericano de desarrollo. Washington D.C.
- Jaimes Suárez, Y., & Aránzazu Hernández, F. (septiembre de 2010). *Manejo de las enfermedades del cacao (Theobroma cacao L.) en Colombia, con énfasis en monilia (Moniliophthora roreri)*. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria – Corpoica & la Federación Nacional de Cacaoteros – Fedecacao.
- León, J. (2000). *Botánica de los Cultivos Tropicales*. (Vol. Tercera edición). San José, Costa Rica.
- Li, Z., Abdoulaye, T., Maximova, S., & Guiltinan, M. (1998). *Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration from Floral Explants of Cacao (Theobroma cacao L.) Using Thidiazuron*. In Vitro Cell. Dev. Biol.- Plant.
- López Báez, O., Bollon, H., Eskes, A., & Pétiard, V. (1993). *Embryogenèse Somatique de cacaoyer (Theobroma cacao L.) à partir de Pièces Florales*. *Compte-Rendus de L'Académie de Sciences*, 579-584.
- M&O Consulting. (2008). *Estudio de Caracterización del Potencial Genético del Cacao en el Perú*. Marco General de la Diversidad Genética del Cacao. (pág. 4). Perú.
- Meza Vera, F. E. (02 de 2006). *Desinfectantes químicos*. Obtenido de [http://www.provinas.net/files/boletin\\_tecnico\\_002.pdf](http://www.provinas.net/files/boletin_tecnico_002.pdf)
- Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. (Julio de 2011). *Corporación Colombia Internacional*. SIPSA.
- Monsalve, L., García, C., & Sigarrosa, A. (2005). *Obtención de embriones somáticos primarios de Theobroma cacao en clones de interés regional para el departamento Norte de Santander*, 21-28. Colombia: Revista Respuesta.

- Mroginski, L., & Roca, W. (1991). *Establecimiento de cultivos de tejidos*. En W. Roca, & L. Mroginsk, *Cultivo de Tejidos en la Agricultura*, CIAT, Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cali, Colombia (pág. 26).
- Phillips, W. (2008). *Catálogo de cultivares de cacao*. (Series Técnicas, Boletín Técnico 18-60 p). (P. d. CATIE, Ed.) Turrialba, Costa Rica.
- Proamazonía. (2004). *Programa para el desarrollo de la Amazonía. Manual del Cultivo del Cacao*. Ministerio de agricultura, Perú.
- Ramírez Davila, C. A. (2004). *Diagnóstico regional del cultivo del Cacao*. Revista Nacional de la federación de cacaoeros.
- Richardson, J., & et al. (2015). *The age of chocolate: a diversification history of Theobroma and Malvaceae*. Obtenido de <http://dx.doi.org/10.3389/fevo.2015.00120>
- Roca, W., & Mroginski, L. (1991). *Cultivo de Tejidos en la Agricultura: Fundamentos y Aplicaciones*. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cali, Colombia.
- Seijo, M. F. (2003). *Aspectos básicos de la embriogénesis somática*. 3(4), 195-209.
- Solano, W. (2008). *Embriogénesis somática en clones superiores de cacao (Theobroma cacao L.) obtenidos en el programa de mejoramiento genético del CATIE.*, CATIE: Tesis de Maestría. 86. Costa rica.
- Sosa, F. (3 de octubre de 2016). *Agro Blog*. Obtenido de Theobroma Cacao III (Caracterización): <http://blogdelagro.blogspot.com/2016/08/theobroma-cacao-iii-caracterizacion.html>
- Torres G., L. A. (2012). *Manual de producción de cacao fino de aroma a través de manejo ecológico*. Cuenca, Ecuador.
- Torres, H. (2010). *Biotecnología*. Dirección General de Investigación y Desarrollo de la Universidad Nacional de Buenos Aires., Buenos Aires, Argentina.
- Urrea Trujillo, A. I., & et al. (27 de octubre de 2011). *Regeneración vía embriogénesis somática de una variedad colombiana élite de Theobroma cacao L.*, XIII(2), 39-50.
- Urrea Trujillo, A. I., Atehortúa Garcés, L., & Gallego Rúa, A. M. (2011). *Regeneración vía embriogénesis somática de una variedad colombiana élite de Theobroma cacao L.* Resvista Colombiana de Biotecnología, 39-50.
- Vera Chang, J., Cabrera Verdezoto, R., Morán Morán, J., Neira Rengifo, K., Haz Burgos, R., Vera Barahona, J., Cabrera Verdesoto, C. (2016). *Evaluación*

*de tres métodos de polinización artificial en clones de cacao (Theobroma cacao L.) CCN-51. Scientific Electronic Library Online.*

Vignoli, R. (2006). Esterilización, desinfección y antisepsia. En *temas de bacteriología y virología médica*.

Williams, E., & Maheswaran, M. (1986). *Somatic embryogenesis: Factors influencing coordinated behaviour of cell as an embryogenic group*. Annals of Botany.

## ANEXOS

### Anexos A: Tareas generales en la pasantía supervisada.

1) Área *ex vitro* y control de plántulas.



2) Control del captador volumétrico de polen y esporas tipo Hirst.



3) Propagación *in vitro* de especies del banco de germoplasma.



4) Esterilización de material vegetal contaminado del banco de germoplasma.



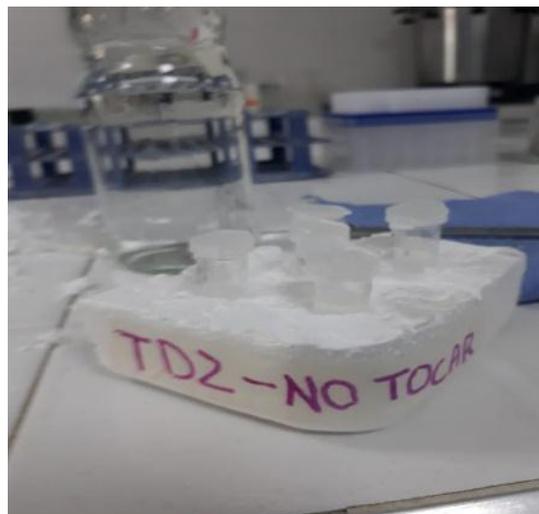
**Anexos B:** Actividades realizadas para el proyecto de pasantía.

1) Preparación de hormona para medios.

TDZ



2) Hormona TDZ en concentración (0.2 mg/ml).



3) Elaboración de hormona 2.4-D para medios.

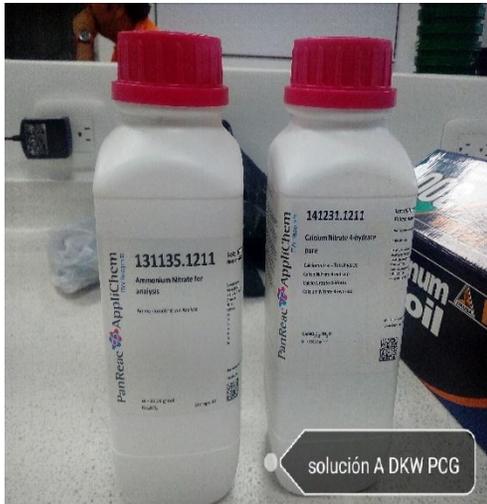


4) Hormona 2.4-D en concentración (1mg/ml).



**Fuente:** Autor

5) Elementos Macro para soluciones DKW A del Medio PCG.



6) Elementos Macro para soluciones DKW B del Medio PCG.



7) Elementos Micro para soluciones DKW micro del Medio PCG.



8) Vitaminas para la solución del Medio PCG.



Fuente: Autor

9) Material a Esterilizar. (Cajas Petri).



10) Sales A hasta la G para el medio MS.



11) Preparación del Medio MS.



12) Medio MS T1 Y T2.



**Fuente:** Autor

13) Elaboración del Medio PCG.



14) Medio PCG T1 Y T2.



14) Tubos Falcon con Hipoclorito al 1%.



15) Cámara de flujo Laminar y Herramientas para sembrar.

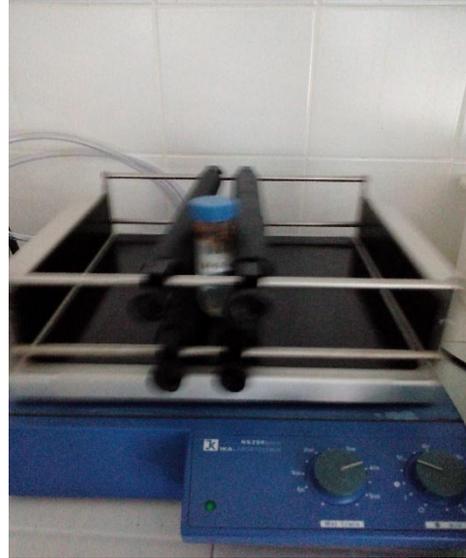


Fuente: Autor

16) Botones florales *Theobroma cacao l.*



17) Agitación de explantes (Protocolo de desinfección).



18) Preparación de HOCl para desinfección de la cámara de flujo laminar.



19) Siembra de Explantes Florales.

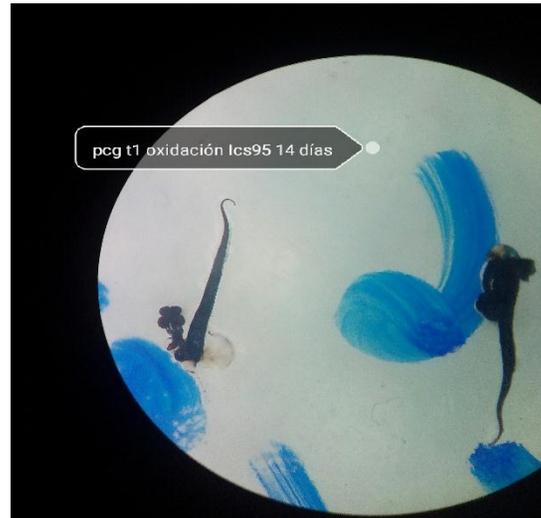


Fuente: Autor

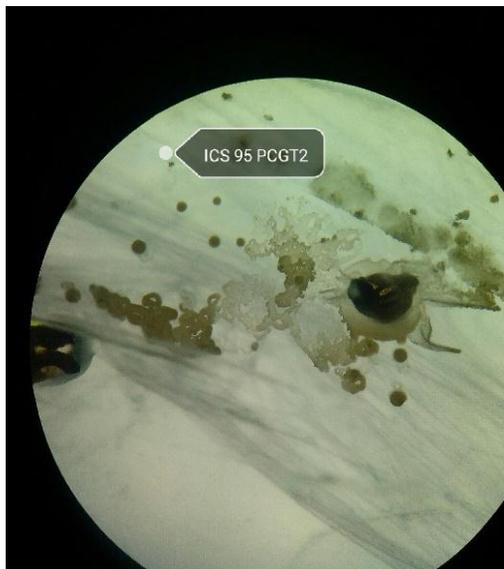
21)Estaminodios del Clon CCN51 a los 14 días de siembra. (oxidados).



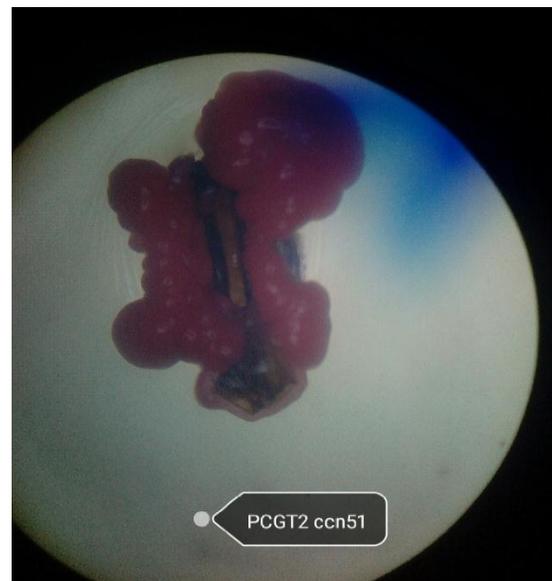
22)Estaminodios del Clon ICS 95 a los 14 días de siembra. (oxidados).



23)Base de pétalo del clon ICS 95 en medio PCG T2 contaminado.

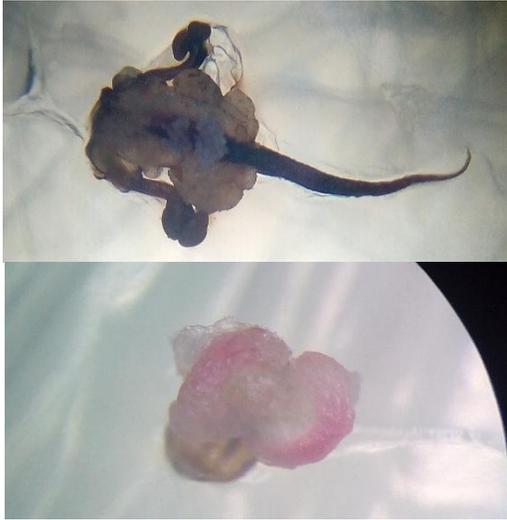


24)Base de pétalo del clon CCN 51 en medio PCG T2 contaminado.



Fuente: Autor

25) Estaminodio y base de petalo del Clon CCN51 con callo en el medio MS T1 a los 14 días de oscuridad.



26) Estaminodio y base de pétalo del Clon ICS95 con callo en el medio MS T1 a los 14 días de oscuridad.



27) Estaminodio y base de petalo del Clon CCN51 con callo en el medio PCG T1 a los 30 días de oscuridad.



28) Estaminodio del Clon ICS95 con callo en el medio PCG T1 a los 14 días de oscuridad.



Fuente: Autor

## Anexos C: Equipos utilizados

- 1) Balanza analítica OHAUS-Aventurer TM.



- 2) Plancha de calentamiento y agitadora magnética Heidolph-MR Hei-Standard.



- 3) Phmetro Sartorius-pHbasic.



- 4) Autoclaves para material limpio y contaminado.



Fuente: Autor

5) Agitador magnético Kika KS 250basic



6) Destilador de agua AUTWOMATIC.



7) Cámara de flujo laminar.



8) Estereoscopio OLYMPUS SZX16.



Fuente: Autor.