



FACULTAD DE INGENIERIA Y CIENCIAS AGROPECUARIAS
INGENIERIA AGROINDUSTRIAL Y DE ALIMENTOS

DISEÑO DE PLANTA PARA LA MULTIPLICACION INVITRO DE CACAO
CCN-51 (*Theobroma cacao*) CONSERVANDO EL VALOR GENETICO PARA
BIOGREEN C.A

Trabajo de Titulación presentado en conformidad a los requisitos establecidos
para optar por el título de
Ingeniero Agroindustrial y de Alimentos

Profesor Guía
Pedro Romo – Leroux Armijos

Autor
Agustín Omar Cobos Alvear

Año
2012

DECLARACIÓN DEL PROFESOR GUÍA

“Declaro haber dirigido este trabajo a través de reuniones periódicas con el/la estudiante, orientando sus conocimientos para un adecuado desarrollo del tema escogido, y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulen los Trabajos de Titulación.”

.....

Pedro Romo-Leroux Armijos

Msc Biología Molecular Bioquímica y Horticultura

Bs Biología Molecular Bioquímica y Nutrición Animal

1709554313

DECLARACIÓN DE AUTORÍA DEL ESTUDIANTE

“Declaro que este trabajo es original, de mi autoría, que se han citado las fuentes correspondientes y que en su ejecución se respetara las disposiciones legales que protegen los derechos de autor vigentes”.

.....
Agustín Omar Cobos Alvear
171251644-0

AGRADECIMIENTO

A mi padre que con sus sabios consejos que me ha guiado de la mejor manera.

A Biogreen C.A que me ha brindado facilidad de realizar la presente investigación para su empresa.

Al ingeniero Pedro Romo-Leoux mi profesor guía, el cual es un excelente profesional me ha guiado de manera incondicional.

Al ingeniero Pablo Moncayo que me ha brindado apoyo incondicional a lo largo de la presente investigación.

Al Ingeniero Miguel Flores que me guió en la presente tesis en lo que trata estadística.

A mi hija Amelia Cobos que es mi inspiración.

DEDICATORIA

Con gran cariño a mi padre que ha estado junto a mí apoyándome, a cada instante de mi vida, de manera incondicional en todos los aspectos, dándome un modelo a seguir de un gran hombre.

A mi hija Amelia Cobos que es el regalo más grande que me ha brindado la vida.

A mi familia que me ha demostrado que siempre estarán para apoyarme.

A mis amigos que siempre han estado en las buenas y malas.

Resumen

La presente investigación fue realizada para la empresa Biogreen C.A cuyo objetivo principal fue el investigar los diferentes beneficios que ofrece el cultivo de tejidos in vitro para la multiplicación de cacao CCN-51.

Para la realización de esto se utilizó tres tipos de tratamientos (procedimientos in vitro hasta la multiplicación), dos de estos son de autoría de Biogreen C.A y de Agustín Cobos; y solo uno es un tratamiento testigo de Pensilvania State University. Dentro de estos tratamientos existen varios medios de los cuales, en el caso de Biogreen C.A ,solo se pueden mencionar la formulación del medio como tal y no sus soluciones madre por sigilo corporativo; del tratamiento testigo se mencionará la composición completa de la solución para medios y también de las soluciones madre.

Los resultados obtenidos del monitoreo semanal de los tratamientos fueron comparados entre sí con el fin de encontrar el procedimiento adecuado y el cual se pueda emplear en la multiplicación in vitro del cacao CCN-51.

Se realizó un modelo de diseño de planta donde se menciona puntualmente el layout de actividades, flujo de producto y flujo de personal.

También se efectuaron dos análisis financieros de los cuales, uno es correr únicamente la línea de cacao CCN-51 en la planta actual de Biogreen C.A y vale resaltar que en el presente análisis financiero se tomó únicamente en cuenta los costos de la nueva línea y no se tomó en cuenta los activos fijos debido a que Biogreen C.A es una empresa consolidada; en el otro análisis se toma en cuenta la construcción de una nueva planta más la aplicación de la nueva línea de cacao CCN-51. En ambos se tomaron en cuenta los indicadores financieros TIR y VAN.

Además esta investigación está orientada para que Biogreen C.A en un futuro comercialice plantas de cacao CCN-51 que han seguido un procedimiento in vitro, lo cual nos daría como resultado plantas inocuas y con genética élite.

ABSTRACT

The present investigation was made for the company Biogreen C.A which its principal objective was investigating the different benefits that tissue culture offers for multiplying CCN-51 Cacao.

For the achievement of this tree types of treatments where used (tissue culture protocols for multiplying calion), two of this treatments are copyright of Biogreen C.A and Agustin Cobos ; and one witness treatment based on media described on Pennsylvania State University. There is several tissue culture mediums in each treatment in which, in the case of Biogreen C.A, just the formulation of the final mediums are writhen and the mother solutions no because of copyright; the witness treatment the final mediums formulation is going to be written and also de mother solutions formulation.

The results obtained of the weekly monitoring of the treatments where compared between each other with the objective of finding the adequate procedure tissue culture and witch can be applied in the in vitro multiplication of cacao CCN-51.

A plant design model is made where its mentions punctually the layout of activities, product flow and staff flow.

Also two financial analysis where preformed, one is just running the new line of CCN-51 cacao in the current plant of Biogreen C.A and a highlight of the present analysis is that it only considers the cost of the new line of cacao and not the steady assets because Biogreen C.A is a consolidated company; In the other financial analysis the construction of a new production plant is taking into considered plus adding the new line of cacao CCN-51. In both cases financial indicators like ANT and IRM are used.

Also this investigation is orientated for in a future Biogreen C.A sales CCN-51 cacao plants that have passed an in vitro procedure, what would give use as a result innocuous and genetically superior plants.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
1. MARCO TEÓRICO.....	4
1.1 Tecnología in vitro en plantas	4
1.1.1 Introducción.....	4
1.1.2 Historia.....	4
1.1.3 Tipos de cultivo de tejidos	5
1.1.4 Composición de medios de cultivo	6
1.1.5 Proceso in vitro	7
1.1.6. Ventajas de la multiplicación in vitro.....	10
1.2 Cacao CCN-51	11
1.2.1 Historia.....	11
1.2.2 Características de CCN-51.....	12
1.2.3 Identificación botánica	12
1.2.4 Lineamientos técnicos agrícolas.....	13
2.2.4.1 Nutrición.....	15
2.2.4.2 Rendimiento	15
2.2.4.3 Plagas y enfermedades	16
2. MERCADEO Y COMERCIALIZACIÓN	18
2.1. Productos en el mercado	18
2.1.1 Productos principales y subproductos	18
2.1.2 Productos sustitutos	19
2.2. Área de mercado o zona de influencia	19
2.2.1 Ubicación geográfica.....	20
2.2.2 Población consumidora	20
2.2.3 Ingresos del cliente	21
2.2.4 Comportamiento de consumidor	21
2.2.5 Análisis de la demanda	21

2.2.6	Análisis de oferta	24
2.2.7	Oferta futura	24
2.2.8	Análisis de la oferta demanda	25
2.3.	Precio del producto.	25
2.3.1	Mecanismo de formulación de precio del producto.	25
2.3.2	Canales de comercialización	25
2.3.3	Políticas de ventas y precios	27
2.3.4	Promoción y publicidad	27
3.	INGENIERÍA DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN .	28
3.1	Especificaciones.....	28
3.1.1	Especificaciones de la materia prima	28
3.1.2	Especificaciones insumos	29
3.1.3	Especificaciones de medios de cultivo a usar	33
3.1.4	Especificación material que contiene los medios de cultivo ..	42
3.1.5	Especificación de producto terminado	42
3.2	Maquinaria y equipo	43
3.3	Metodología	49
3.3.1	Pruebas de medios de cultivo	49
3.3.2	Tipo de diseño experimental	49
3.3.3	Pruebas estadísticas utilizadas	50
3.3.4	Formulación de medios	50
3.3.5	Tratamientos	54
3.3.6	Presentación de medios de cultivo	54
3.4	Programa de manejo.....	58
3.4.1	Uso de protocolos in vitro	58
3.4.2	Protocolo internacional o testigo (Universidad de Pensilvania)	59
3.4.3	Protocolo Biogreen C.A	61
3.4.4	Programa de monitoreo	71
4.	RESULTADOS	73
4.1	Resultados de programa de monitoreo semana a semana	73

4.2 Formación de callo.....	78
4.2.1 Traslencia a medio secundario 27/01/12.....	79
4.2.2 Traslencia a medio de desarrollo	80
4.3 Explantos contaminados.....	81
4.4 Explantos muertos	83
4.5 Aparición del primer callo en días	85
4.6 Prueba de igualdad de hipótesis no paramétrica CHI cuadrado	86
5.DISEÑO DE PLANTA DE MULTIPLICACION IN VITRO.....	89
5.1 Infraestructura.....	89
5.2 Localización de la planta.....	89
5.3 Fundamentos Generales.....	89
5.4 Techo e iluminación	90
5.5 Paredes.....	90
5.6 Pediluvios.....	90
5.7 Suelos.....	91
5.8 Ventilación	91
5.9 Layout.....	91
5.10 Planta general	93
5.11 Flujo de producto.....	94
5.12 Flujo de personal	95
6. PLAN FINANCIERO.....	96
6.1 Introducción.....	96
6.2 Plan financiero para adición de nueva línea para cacao in vitro CCN-51	96
6.2.1Costo de fabricación.....	96
6.2.1.1 Requerimientos de materia prima	97
6.2.1.2 Requerimiento material físico medio	102
6.2.1.3 Requerimientos servicios auxiliares	102

6.2.1.4	Resumen de costos de fabricación.	105
6.2.1.5	Costos fijos y variables	108
6.2.2	Capital de trabajo	109
6.2.3	Necesidad de capital	110
6.2.4	Financiamiento	110
6.2.5	Perdida y ganancia	111
6.2.6	Flujo de caja	112
6.2.7	Indicadores financieros	114
6.3	Plan financiero de construcción de nueva planta de multiplicación in vitro para Biogreen C.A	115
6.3.1	Inversiones	115
6.3.2	Inversión en obras físicas	115
6.3.3	Inversiones en maquinarias y equipos	115
6.3.4	Activos fijos	116
6.3.5	Costos de fabricación	116
6.3.6	Capital de trabajo	116
6.3.7	Depreciación	117
6.3.8	Necesidad de capital	118
6.3.9	Financiamiento	118
6.3.10	Perdida y ganancia	118
6.3.11	Flujo de caja	120
6.3.12	Indicadores financieros	121
7.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	123
7.1	Conclusiones	123
7.2	Recomendaciones	126
	Referencias	128

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Autoclave	43
Figura 2 Mechero	44
Figura 3 Cámara de crecimiento	45
Figura 4 Cámara de flujo laminar	46
Figura 5 pH metro	46
Figura 6 Refrigerador uso de laboratorio.....	47
Figura 7 Balanza	48
Figura 8 Pinzas	48
Figura 9 Bisturí	49
Figura 10 Tratamiento T1.....	55
Figura 11 Tratamiento B1 (M2)	55
Figura 12 Tratamiento B2 (X3)	56
Figura 13 Tratamiento BS (X3 AG)	57
Figura 14 Tratamiento T2.....	57
Figura 15 Tratamiento BD (MCO)	58
Figura 16 Planta de cacao.....	62
Figura 17 Flor de cacao	62
Figura 18 Lavado inicial explantos	63
Figura 19 Lavado final explantos.....	64
Figura 20 Siembra de explantos.....	65
Figura 21 Mira microscópica de stamoides de siembra	65
Figura 22 Explantos sembrados en medios B1,B2 Y T1. En cámara Obscura	66
Figura 23 Cámara de maduración de medios	66
Figura 24 Revisión semanal de tratamientos	67
Figura 25 Corte de material genético invalido previo a siembra	68
Figura 26 Etapa globular de callo.....	69
Figura 27 Etapa torpedo de callo	70
Figura 28 Callos maduros en medio.....	70

Figura 29 Corte de callo maduros	71
Figura 30 Contaminación bacteriana.....	81
Figura 31 Contaminación por hongos	82
Figura 32 Contrastes Callos, Contaminados y muertos. Prueba CHI cuadrado	87
Figura 33 Layout por actividades	92
Figura 34 Diseño de planta en general	93
Figura 35 Flujo de producto.....	94
Figura 36 Flujo de personal.....	95

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Composición de los medios de cultivo.....	6
Tabla 2 Identificación botánica del cacao CCN51	12
Tabla 3 Requerimiento de nutrientes de cacao CCN51	15
Tabla 4 Rendimiento de cacao CCN51	15
Tabla 5 Demanda aparente de cacao en la región costera de Ecuador (2010).....	22
Tabla 6 Solución del medio T1 Pensilvania State University.....	34
Tabla 7 Solución del medio T2 Pensilvania State University.....	34
Tabla 8 Solución Macro A	35
Tabla 9 Solución Macro B	36
Tabla 10 Solución DKW 100X Micro elementos.....	36
Tabla 11 DKW 1000X Solución de vitaminas.....	37
Tabla 12 B5 1000X solución de vitaminas	37
Tabla 13 Aminoácidos 1000X solución	38
Tabla 14 Solución medio B1 crecimiento primario	39
Tabla 15 Solución medio B2 crecimiento primario	39
Tabla 16 Solución medio BS crecimiento secundario	40
Tabla 17 Solución medio BD medio desarrollo.....	41
Tabla 18 Comparación de medios de crecimiento primario	51
Tabla 19 Comparación de medios de crecimiento secundario	52
Tabla 20 Medio Desarrollo	53
Tabla 21 Tratamientos de la investigación	54
Tabla 22 Registro semanal Inicio y Final.....	72
Tabla 23 Registro semanal de la investigación	73
Tabla 24 Resumen supervivencia de callos 27/01/12	79
Tabla 25 ANOVA supervivencia de callos 27/01/12	79
Tabla 26 Resumen supervivencia callos. Transferencia medio desarrollo	80
Tabla 27 Índice producción de callo final de la investigación	80
Tabla 28 ANOVA supervivencia de callos, Transferencia medio de desarrollo.....	80

Tabla 29 Resumen contaminación medios.....	82
Tabla 30 Índice de explantos contaminados final de la investigación	82
Tabla 31 ANOVA contaminación medios	83
Tabla 32 Resumen de explantos muertos	84
Tabla 33 Índice de explantos muertos al final de la investigación	84
Tabla 34 ANOVA Explantos muertos	84
Tabla 35 Numero de días aparición primer callo	85
Tabla 36 ANOVA numero de días aparición primer callo	86
Tabla 37 Tabla de distribución de tratamientos.....	87
Tabla 38 Costo de solución 20X.....	97
Tabla 39 Costo de solución 100X.....	98
Tabla 40 Costo de solución 1000X.....	98
Tabla 41 Costo de solución Quelato	99
Tabla 42 Costo Solución fitohormonal 1 (Sigilo corporativo)	99
Tabla 43 Costo azúcar	100
Tabla 44 Costo AGAR.....	100
Tabla 45 Costo Solución Solución fitohormonal 2 (Sigilo corporativo)	101
Tabla 46 Costo de solución vitaminas.....	101
Tabla 47 Costo Myo-Inositol.....	101
Tabla 48 Costo agua destilada.....	102
Tabla 49 Requerimientos eléctricos	103
Tabla 50 Costos equipos seguridad industria.....	104
Tabla 51 Requerimientos de mano de obra	105
Tabla 52 Costo de planta actual.....	106
Tabla 53 Costos solución X3.....	107
Tabla 54 Costos solución X3AG.....	107
Tabla 55 Costo solución MCO.....	108
Tabla 56 Total de costos fijos y variables del procedimiento B1	109
Tabla 57 Total de costos fijos y variables línea CCN51 hasta multiplicación	109
Tabla 58 Capital de trabajo para línea cacao CCN51	110
Tabla 59 Necesidad de capital para línea cacao CCN51	110
Tabla 60 Pérdida y ganancia de línea de cacao CCN51 en año 1	111

Tabla 61 Pérdida y ganancia de línea de cacao CCN51 en año 10	112
Tabla 62 Flujo de caja de línea de cacao en 1 año	113
Tabla 63 Flujo de caja de línea de cacao en 10 años	113
Tabla 64 Indicadores Financieros TIR y VAN línea cacao CCN51	114
Tabla 65 Inversión obras físicas, nueva planta Biogreen C.A	115
Tabla 66 Activos fijos de nueva planta Biogreen C.A.....	116
Tabla 67 Capital de trabajo de nueva planta Biogreen C.A.....	117
Tabla 68 Depreciación, nueva planta Biogreen C.A.....	117
Tabla 69 Necesidad de capital , nueva planta Biogreen C.A	118
Tabla 70 Perdida y ganancia de nueva planta Biogreen C.A en el primer Año.....	119
Tabla 71 Perdida y ganancia de nueva planta Biogreen C.A en 10 año	119
Tabla 72 Flujo de caja ,nueva planta Biogreen C.A en 1 años.....	120
Tabla 73 Flujo de caja de nueva planta Biogreen C.A en 10 años.....	121
Tabla 74 Indicadores financieros TIR y VAN de nueva planta Biogreen C.A	122

INTRODUCCIÓN

ANTECEDENTES BIOGREEN C.A

El laboratorio meristemático de Biogreen C.A, inició sus actividades en el año 1989 como Agrogenotec, con una cámara de flujo laminar la cual se dedicaba a la germinación de orquídeas obtenidas por hibridación con el fin de obtener nuevos colores y formas redondas en las especies de Catleyas y Phalenopsis. También en la misma cámara se utilizaba para la germinación de especies de orquídeas ecuatorianas.

El laboratorio observa la necesidad del mejoramiento genético de cultivos, reproducción de una manera ecológica, eficiente y segura de plantas de importancia económica. Dada la necesidad, observada en el 2010, se realiza la formación de una nueva compañía más fuerte partiendo de la antigua, consolidando así la compañía Biogenética Green C.A también llamada Biogreen C.A para poder brindar servicios adicionales a pequeños y grandes productores. Esta compañía ofrece una mejor venta, seguimiento, desarrollo de variedades de plantas resistentes a enfermedades; servicio y asesoría en el diseño de fertilización orgánica, inorgánica y mixta; asesoría fitosanitaria; desarrollo de hongos beneficiosos, bacterias y plantas carnívoras.

Productos que ofrece Biogreen C.A

- Cultivo de tejidos:
Biogreen C.A a adquirido una vasta experiencia en la reproducción in vitro de variedades agrícola, forestal y florícola; lo cual le ha permitido realizar mejoramiento genético tendiente a alcanzar mayor productividad en cultivos, adaptando las plantas al medio. Se ha logrado la obtención de variedades propias a base de investigación y desarrollo.
- Fertilizantes orgánicos foliares :
Biogreen C.A realiza la producción de fertilizantes orgánicos foliares; los cuales son equilibrados y completos en su composición. Estas soluciones se encuentran adecuadamente concentradas, teniendo en su contenido

todos los macro y micro elementos. Todos los elementos presentes en los foliares de Biogreen C.A son seleccionados de tal manera que puedan tener una doble funcionalidad en lo posible y sean de fácil absorción para la planta; un ejemplo de esto, es el fósforo en los foliares el cual esta en forma de fosfitos, que sirve para la protección contra los hongos y para potenciar el sistema inmunológico propio de las plantas. Uno de los nombres comerciales de un foliar de Biogreen C.A es BIO-FOL.

- **Microrganismos benéficos:**

Son protectante y erradicantes de hongos, bacterias e insectos, los cuales en su mayor parte son de amplio espectro. Estos tienen acción de largo plazo ya que son soluciones muy concentradas de células vivas y/o esporas las mismas que se establecen en el lugar donde son aplicadas siendo favorable para el crecimiento. Los nombres comerciales que Biogreen C.A brinda al público son BIO-PROT, BIO-FUNG, BIO-INBO, BIO-INVE.

JUSTIFICACIÓN Y ALCANCE

Justificación

Actualmente, la industria del cacao es una de las más pujantes agroindustrias en el Ecuador. El crecimiento en los últimos años ha sido muy grande y sostenido tanto en hectariaje como en volumen de exportación. El cacao es el producto insignia del Ecuador. Tomando en cuenta que el 50% del éxito de una industria tienen que ver con la siembra; por ello hay mucho trabajo tecnológico por hacer en esta industria. Más aún cuando en cacao existe en el campo una variación genética palpable. Sin duda este proyecto de titulación presenta un aporte importantísimo para la sustentabilidad de la industria del cacao.

Alcance

La presente investigación busca establecer un sistema de propagación in vitro, que sea muy seguro desde el punto de vista de mantenimiento de la genética y a la vez eficiente y rentable para la producción de plantas élite para la industria del cacao en el Ecuador.

OBJETIVOS

Objetivo general

Diseñar una planta para el cultivo de tejidos mediante multiplicación in vitro de cacao CCN-51 con muy pocos índices de variación somática manteniendo un rápido crecimiento in vitro.

Objetivos específicos

- Inferir el balance hormonal en las diferentes medios in vitro utilizadas.
- Validar el sistema de reproducción clonal con alta reproducibilidad y manteniendo la estabilidad de características genéticas vs. un sistema con menos probabilidad de generar variación genética que el testigo que se está usando.
- Caracterizar el explanto ideal por factores genéticos y no solamente de reproducción.
- Determinar los costos y beneficios que hay en el diseño de planta para la multiplicación in vitro de cacao CCN 51 conservando el valor genético para Biogreen C.A
- Obtener líneas genéticas superiores de cacao.

1. MARCO TEORICO

1.1 TECNOLOGÍA INVITRO EN PLANTAS

1.1.1 Introducción

Cuando se habla de cultivos in vitro, hablamos de tomar una porción de un explanto y colocarla en un medio nutritivo estéril donde se regenerará una o varias plantas (Segretin.E, 2006, pp 2). Lo que permite la multiplicación in vitro es la totipotencia celular. Totipotencia es el potencial o capacidad inherente de una célula de una planta para desarrollarse en una planta completa, siempre y cuando sea adecuadamente estimulada; Las células que expresan mayor totipotencialidad son las meristemáticas, las cuales podrán seguir dos caminos la de diferenciación (capacidad que tiene una célula madura para regresar a condiciones meristemáticas y el desarrollo de un nuevo punto de crecimiento) y la re diferenciación (habilidad de una célula para reorganizarse en un nuevo órgano).

1.1.2 Historia

Los orígenes sobre el cultivo de tejidos en plantas in vitro, fue gracias a las ideas de el científico alemán Gottlieb Haberlandt, el cual brindó sus estudios, a la Academia Germana de ciencia en 1902, con sus experimentos de cultivos de células individuales. Estos experimentos aportan importante información sobre las propiedades y potencialidad de las células como un órgano elemental. A pesar de que sus experimentos no fueron exitosos en relación al cultivo de tejidos, el predijo que se puede cultivar exitosamente embriones artificiales a partir de células vegetativas. De esta manera estableciendo la definición de totipotencia e indicando la técnica de cultivar células y aisladas plantas en soluciones nutritivas (Thorpe.T, 2006, pp 9-11).

Los estudios de Haberlandt dieron, la pauta para que otros investigadores desarrollen los trabajos. Gautheret (1934), Nobecourt (1937) y White (1934) lograron el primer éxito en el desarrollo de cultivo de tejidos. Gautheret obtuvo

la formación de callos de explantos de cambium de arboles y tejido de floema. En 1957 Skoog (Descubridor de las Citoquininas) y Miller observaron que la formación de tallos y raíces son controlados por el balance de auxinas/citoquininas. En 1958 la embriogénesis somática fue descrita por primera vez por Steward, Mapes, Mears y Reinert. De 1964 a 1966 la producción de plantas haploides se obtuvo gracias a Guha, Maheshwari, Bourgin y Nirsch. De los años 60 a los 70 el cultivo de protoplastos, fusión y desarrollo de híbridos somáticos fue descubierto por Cocking (1960); Belliard, Vedel, Pelletier 1979; Gleba y Sytnik 1984. El último logro se realizó en los años 80 gracias a la tecnología de recombinación DNA y la producción de plantas transgénicas (Schell1987; Schell and Vasil 1989) (Taji, Kumor y Lalshmanan, 2002, pp 3)

1.1.3 Tipos de cultivos de tejido (Tipos de cultivo in vitro)

Según Pierik. R (1997), una planta está conformada por diferentes órganos, cada uno compuesto por distintos tejidos, los cuales están hechos de varias células. Debido a que las distintas partes de una planta están compuestas de varios tipos de células también existen diferentes formas de realizar cultivos in vitro, las cuales son:

- Cultivo de planta intacta: una semilla se puede desarrollar de manera in vitro lo cual, finalmente da una planta.
- Cultivo de embriones: son embriones aislados los cuales se pueden obtener a partir de la remoción de la cobertura de una semilla.
- Cultivo de órganos: un órgano aislado de una planta se lo desarrolla de manera in vitro. Dentro de éste se pueden distinguir algunos como; cultivo de meristemas, cultivo de los ápices de tallos, cultivo de raíz, ect. Por lo regular la parte de la planta que ha sido aislada es denominada explanto y el cultivo de éste se denomina cultivo de explanto.
- Cultivo de callo: Es el aislamiento de un tejido diferenciado, el cual se denomina callo y; este proceso se denomina cultivo de callo.

- Cultivo de una sola célula: Es el crecimiento de una sola célula, la misma que es obtenida de un tejido, callo o susceptión celular con la ayuda de enzimas o mecánicamente.
- Cultivo de protoplastos: Es el cultivo de protoplastos obtenidos de las células por medio de la utilización de enzimas en las paredes celulares.

Para realizar el cultivo de tejidos se puede aplicar cualquiera de los distintos tipos de cultivos de tejidos esto también va de la mano, con el tipo de planta ya que en ciertas plantas un tipo de células pueden resultar mastotipotentes que otras.

1.1.4 Composición de los medios de cultivo

La composición de los medios de cultivo in vitro puede variar según el investigador o la empresa en la cual se esta desarrollando la planta in vitro; y sus proporciones podrán variar según cada planta, ya que cada una tiene distintas necesidades, pero como una línea general se puede tomar en cuenta la tabla a continuación

Tabla1:

Composición de los medios de cultivo

Composición de los medios de cultivo	
Componentes	Características
Agua destilada	Representa el 95% del medio nutritivo.
Fuente de carbono	Se usa generalmente sacarosa. Se necesita ya que los explantos no son completamente autótrofos y no pueden cubrir sus necesidades con la fotosíntesis, que se las cobre mediante el in vitro.

(Continua)

Tabla 1:
Continuación

Composición de los medios de cultivo	
Componentes	Características
Sustancias inorgánicas	Macroelementos (Nitrógeno-fosforo- potasio-calcio-magnesio-azufre). Microelementos (hierro-cobalto-zinc-boro-magnesio-molibdeno-cobre).
Vitaminas	B1, B2, B6, E, ácido fólico, ácido nicotínico.
Hormonas y reguladores de crecimiento	Auxinas: Promueven la elongación celular, la formación de callos y raíces adventicias; inhiben la formación de brotes axilares adventicios. Citoquininas: Promueven la división celular, regulan el crecimiento y el desarrollo de los tejidos vegetales.
Materiales inertes	Como soportes, incluyen agar y otros polisacáridos, papel de filtro, etc.

Adaptado de: Álvarez .M, 2011, Multiplicación de plantas.

1.1.5 Proceso In Vitro

El proceso de propagación in vitro apunta a producir clones (verdaderas copias de plantas en números grandes). El proceso es usualmente dividido en las siguientes etapas:

- **Etapa 0:** De pre preparación o selección y pre tratamiento de plantas adecuadas.
- **Etapa I:** Iniciación de los explantos, esterilización de superficie, establecimiento de los explantos madre.
- **Etapa II:** Sub cultivación para multiplicación/ proliferación de explantos.

- **Etapa III:** Crecimiento de tallos y enraizamiento.
- **Etapa IV:** Endurecimiento

Estas son las etapas de modo universal que se aplica a la mayor parte de plantas, sin embargo, se pueden presentar cambios los cuales dependerán de las plantas a ser utilizadas para el cultivo de tejidos in vitro. Una regla general que se tiene presente al aplicar los procesos, es aproximar las condiciones ex vitro de las plantas a ser utilizadas.

Etapa 0

Aquí se trata el cuidado apropiado del crecimiento de la planta madre. En lo posible esta deberá ser en un medio controlado en un invernadero en un medio libre de enfermedades e insectos. Si es posible, para evitar contaminación de la planta en el momento de realizar el cultivo in vitro, hay que hacer la aplicación oportuna de fungicidas y pesticidas. Si el caso fuese que se realiza la recolección en campo, este tendrá que ser llevado al lugar donde se va realizar la introducción in vitro y proceder a una desinfección íntegra. Si es necesario, se puede realizar una aplicación de fungicidas y pesticidas sin importar cual sea el caso.

Etapa I

En esta etapa se refiere a la inoculación de los explantos en un medio estéril para iniciar un cultivo aséptico. Un explanto limpio en condiciones asépticas puede multiplicarse varias veces. Esta etapa es crítica, debido a que la mortalidad de los explantos se presenta por contaminación, la misma que se hará notoria durante el lapso de 3 a 5 días durante los cuales se pueden descartar los medios contaminados. Los procedimientos estándares a realizar a las plantas antes de la introducción son:

Plantas de tejidos suaves:

1. Lavar explantos de plantas perianuales por 1 - 2 horas en agua destilada. Este paso se puede omitir para plantas que se encuentren en crecimiento en invernaderos.

2. Lavar explantos en agua destilada tres o cuatro veces por periodos de 5 a 10 minutos.
3. Surgir explantos en etanol al 95% por 3 a 5 segundos.
4. Lavar con agua destilada por 5 minutos.
5. Esterilizar con hipoclorito de sodio al 5% por 20 a 25 minutos.
6. Lavar con agua destilada tres veces por periodos de 10 minutos.
7. Secar explantos en papel absorbente esterilizado.
8. Trasferir explantos de manera individual al medio.

Para especies que sean leñosas:

1. Recolectar los tallos y flores para almacenar a una temperatura de 5°C hasta usarlos.
2. Sumergir en etanol de 3 a 5 segundos.
3. Sumergir en 1% hipoclorito de sodio (cloro al 20%) por 10 minutos.
4. Colocar en 2% sacarosa y 200 PPM de 8-citrato hydroxyquinoline a 23°C.
5. Recortar la parte baja de tallos y remplazar la solución por 2 días.
6. Quitar cualquier material que no sea útil para la multiplicación.
7. Esterilizar con hipoclorito de sodio al 5% por 20 a 25 minutos.
8. Lavar con agua destilada tres veces, durante períodos de 10 minutos.
9. Secar explantos en papel absorbente esterilizado.
10. Trasferir explantos de manera individual al medio.

No se debe olvidar de esterilizar siempre las pinzas y el bisturí cuando se los utilice para la transferencia de los explantos a la solución fresca. Todos los contenedores tendrán que estar adecuadamente esterilizados. Si los explantos se vuelven pálidos o marrones al final del protocolo, se debe reducir la intensidad del hipoclorito de sodio, o como alternativa se les puede poner a los explantos en 10% de hipoclorito de sodio por 2 minutos. Cualquier caso de contaminación podrá ser presenciado después de 2 a 3 días.

Etapa II

Es la fase de propagación durante la cual los explantos son cultivados en el

medio apropiado para la multiplicación de tallos. El objetivo es obtener propagación sin perder la estabilidad genética. En esta etapa en ocasiones se requiere realizar cortes de los explantos, de esta manera se puede seguir multiplicando mas individuos.

Etapa III

Esta etapa es la que trata sobre el enraizamiento. Los tallos que crecieron en un medio in vitro y que fueron obtenidos en la etapa II, están encaminados a desarrollar una planta. Si el material de proliferación provino de flores o meristemas, tendrán que ser separados después del enraizamiento. Es esencial obtener plantas en buen estado y bien enraizadas con el fin de obtener una buena etapa de endurecimiento. Ésta etapa es considerada como la que mas costos genera en la operación, puede ser del 35 a 75% de los costos totales. Es muy recomendado combinar el enraizamiento y la aclimatación.

Etapa IV

En esta etapa las plantas son aclimatadas y endurecidas. Esta es la etapa final del cultivo de tejidos, fase en la cual las plántulas están listas para ser trasferidas a un invernadero. Las condiciones son controladas y dadas por grados de intensidad. Este proceso puede durar aproximadamente de 6 a 8 semanas (Ashloowalia, Prakash y Savangikar, 2002, pp 7-9)

1.1.6 Ventajas de la multiplicación in vitro

A continuación se van a enlistar las ventajas de la multiplicación in vitro :

- Propagación masiva de plantas.
- Propagación de individuos adaptados ya a una zona.
- Propagación acelerada de material vegetal deseable.
- Clonación de individuos con características deseables.
- Obtención de plantas libres de plagas.
- Producción de semillas sintéticas.

- Conservación de germoplasma.
- Producción de nuevos híbridos.
- Mejora genética de plantas.
- Germinación de semillas.
- Producción de haploides.
- Estudios fisiológicos diversos.

1.2 Cacao CCN-51

1.2.1 Historia

El cacao CCN-51 fue desarrollado aproximadamente en 1970, por Homero U. Castro. Ésta variedad de cacao no fue plantada ampliamente hasta alrededor de 1997 a 1998. La gran razón por la que, el cacao CCN-51 se volvió popular durante el periodo de tiempo mencionado, fue porque el fenómeno del niño destruyó la mayor parte de los cultivos de cacao nacional, lo cual promovió a la gran mayoría de agricultores a dicho cambio.

El cacao CCN-51 también llamado Don Homero, gracias al nombre del inventor Homero U. Castro, quien trabajaba de manera independiente en Naranjal, Ecuador en una plantación de cacao. El inventor Homero U. Castro, describe al cacao CCN-51 como una cruce de F1 de IMC-67 (Iquitos Marañon Collection, tipo genético cacao amazónico) y O-1 de ICS-95 (Imperial College Selection, tipo genético Híbrido de cacao trinitario), donde O-1 era un cacao de altura recolectado por él mismo, en el Valle de los canelos en el este del Ecuador. Las siglas CCN quieren decir Colección Castro Naranjal, y el 51 es la cruce de número de variedades.

Se tiene información que el cacao CCN-51 crece en el norte de América central, sur de Perú y el este de Brasil, entre otros lugares de las Américas. Pero no se tiene reporte que dicho cacao crezca en otras partes del mundo.

Aproximadamente 20% de la producción actual del Ecuador proviene del cacao CCN-51 (Stern G, 2011, pp 1).

1.2.2 Características de cacao CCN-51

A continuación se presentan algunas de las características principales de cacao CCN-51

- Es auto compatible lo que quiere decir que tiene una habilidad de combinación general.
- Elevada producción rendimientos superiores a 4000 kg/ha de almendra seca.
- Altos niveles de resistencia a, la Escoba de bruja (*Crinipellis perniciosa*) y Mal de machete (*Ceratocystis fimbriata*), principales enfermedades en cacao.
- En condiciones de baja humedad relativa es tolerante a Moniliasis (*Monilia roleri*) (Espinosa José, 2006).

1.2.3 Identificación botánica

Para realizar una mejor identificación se va proceder a dar la clasificación botánica del cacao:

Tabla 2:

Identificación botánica del cacao CCN 51

División	Espermatofita
Clase	Angiosperma
Sub Clase	Dicotiledónea
Orden	Malvales
Sub Orden	Malvinas
Familia	Estericuliaceas
Tribu	Bitnerieas
Genero	Theobroma cacao (Lineo)
Especie	Cacao

Tomado de Batista Lépido, 2009, El Cultivo de Cacao.

Es un árbol de pequeña talla que puede alcanzar 2.50 m de altura, su producción inicia a partir del tercer año. Se pueden realizar dos cosechas anuales (EQUAQUIMICA, 2008). La raíz es pivotante y puede alcanzar en buenos suelos hasta 2 m. Su tallo es recto y puede tomar formas muy variadas lo cual viene dado por las condiciones ambientales y manejo. Las hojas son simples, enteras y pigmentadas de una amplia gama de colores, el tamaño de la hoja varía según la cantidad de luz presente. Las flores son pequeñas y se encuentran en grupos llamados cojines florales, las cuales se desarrollan en el tronco y ramas principales. El nacimiento de las flores se da antes de las hojas y por lo regular en el mismo lugar. A partir de las flores se desarrollan los frutos o mazorcas gracias a la ayuda de algunos insectos pequeños, pero solo el 10% de las flores se convierten en mazorcas. El número de granos por mazorca es de 45, con un porcentaje de cascarilla del 15.2%, 84.8 % almendras y 52.48 % de grasa; cuenta con un pH 5.02 (Barona Víctor, 2009, pp 11).

1.2.4 Lineamientos técnicos agrícolas

A continuación se presenta lineamientos técnicos agrícolas para el cacao CCN-51:

- **Precipitación:**

1200mm a 400mm. Es más importante una buena distribución del agua durante el año que el volumen total de lluvias.

- **Temperatura:**

La temperatura media anual debe ser aproximadamente 24 °C y tener cuidado que nunca exceda 30 °C.

- **Altitud:**

Desde el nivel del mar hasta los 1500mm.

- Condiciones de suelos:

Los suelos más apropiados para el cacao son los aluviales, francos y los profundos con subsuelos permeables. Los cuales se deben localizar en llanuras u ondulaciones que permitan prácticas agrícolas modernas.

- Periodo vegetativo:

El cacao en un cultivo de ciclo económico prolongado (más de 50 años) esto se da si tiene el adecuado cuidado.

- Propagación del cultivo:

La manera más común de propagar cacao es por medio de semillas, la cual cuenta con el riesgo de no poder predecir las características de los árboles resultantes, los cuales pueden resultar siendo machos, hembras o hermafroditas.

La manera de propagación por injertos o estacas, exige adiestramiento y personas que realicen la propagación, lo cual es un costo mayor que la propagación por semillas.

- Época de siembra:

Las épocas de mayor precipitación.

- Preparación de la semilla u órgano reproductor:

Selección de las plantas madre: Siempre se buscarán las mejores plantas constituidas, fijándose siempre en las características específicas como; ser representativas del tipo o clon, tener buena estructura (desarrollo y conformación), estar libre de plagas y enfermedades, no presentar deficiencias nutricionales, tener de 8 a 20 años (edad de máxima producción) y poseer alta producción (100 a 200 frutos al año).

De esta manera, si se desea obtener semillas se lo puede hacer de las mazorcas que se presenten más sanas, y si se desea material vegetal también para asegurarse de obtener individuos más sanos y fuertes.

- Densidad de población por hectárea:

Esto dependerá del manejo: 3.0 m X 3.0 m (1111 arboles de cacao), 3.0 m X 3.5 m (952 arboles de cacao) y 3.5 m X 4.0 m (714 arboles de cacao) (Sullca.B, 2008, pp 1-5).

1.1.4.1 Nutrición

El cumplimiento de los requerimientos nutricionales es una de las prácticas que va ayudar a obtener el máximo potencial del cacao CCN-51 y estos requerimientos de nutrientes se encuentran divididos según la edad del cultivo; como en la siguiente tabla 3:

Tabla 3:

Requerimiento de nutrientes de cacao CCN-51

Etapa del cultivo	Edad de la planta en meses	Requerimientos nutricionales medio en kg ha-1						
		N	P	K	Ca	Mg	Mn	Zn
Vivero	5-12	2.4	0.6	2.4	2.3	1.1	0.04	0.01
Desarrollo	28	136	14	151	113	47	3.9	0.1
Producción	50-87	438	48	633	373	129	6.1	1.5

Tomado de ECUAQUIMICA, 2008, Cultivo de cacao: Información Técnica.

1.1.4.2 Rendimiento

El rendimiento promedio del cacao va depender de una buena nutrición, dándonos los siguientes rendimientos:

Tabla 4:

Rendimiento de cacao CCN-51

Año	3	4	5	6	7
qq/ha/año	8	15	21	50	60

Tomado de ECUAQUIMICA, 2008, Cultivo de cacao: Información Técnica.

Una de las cualidades deseables del cacao CCN-51, es su rendimiento frente a otras variedades, ya que en estas últimas sus rendimientos son menores.

1.1.4.3 Plagas y enfermedades del cacao CCN-51

Sullca (2008) sugiere que las principales plagas y enfermedades son:

Plagas

- El chinche del cacao (*Monolonium* spp): Este insecto chupa la sábila de los brotes nuevos, hojas tiernas y frutos. Las condiciones que favorecen su aparición es el exceso de sombra en la plantación. El control que se realiza en los períodos donde hay mayor incidencia de hojas y aparición de los frutos, es el raleo. Se puede también controlar de manera orgánica con el producto de Biogreen C.A BIOINVE.
- *Xyleborus*. spp: Esta plaga está presente en plantaciones maduras. Actúa taladrando las ramas y el tronco. En las heridas que quedan entran hongos y como consecuencia mata a la planta.
- *Xylosandrus compactus*: Se puede presentar desde el inicio de la etapa de vida hasta la edad de 1 año 5 meses. Los insectos realizan orificios por donde penetran y como consecuencia de esto, la planta puede morir por el ataque de hongos patógenos. El control se puede realizar mediante la eliminación de las plantas afectadas.
- Azteca *Paraensis bondari*: Son insectos que están asociados e los insectos chupadores y secretan sustancias azucaradas, haciendo que aumente en posibilidades el ataque de hongos. El control se realiza mediante la eliminación mecánica del nido y luego aplicando insecticida donde se encontraba el nido.

- *Selenopsis* spp, *Atta sexdens* L, *Atta cephalotes* y *acromyrmex*: Estos insectos cortan las hojas de cacao con una probabilidad de llevarla a la muerte por defoliación parcial o total. El control es destruir el hormiguero donde se localiza la reina.

Enfermedades

Se puede realizar el control de manera biológica con el producto de Biogreen C.A BIOFUNG.

- Escoba de bruja (*Crenipellis pemiciosa*): Esta enfermedad ataca todos los tejidos que se encuentran en crecimiento en la planta. Es una enfermedad que se presenta principalmente en las zonas de mayor precipitación. El control se realiza mediante una poda de todo tejido atacado por la enfermedad, después de lo cual, éste debe ser cubierto.
- Pudrición parda (*Phytophthora palmivora*): Puede encontrarse en cualquier parte, es inóculo y es desmanado por lluvias, viento, insectos o por el hombre; los daños se pueden observar en el fruto y en el tronco. El control es a través de pulverizaciones mensuales partiendo desde la mayor floración con fungicidas cúpricos; remoción de las partes afectadas; cortar de manera inmediata la parte afectada y sellar con solución cúprica la enfermedad que se encuentra en el tronco.
 Moniliasis (*Moniliophthora roren*): Ataca a las mazorcas jóvenes donde se presentan ligeras protuberancias. En las mazorcas adultas pueden aparecer manchas oscuras o erupciones blancas en la superficie. El control se realiza retirando el material enfermo y sobre ésta se aplica el mismo azufre mojable y zinc

2. Mercadeo y Comercialización

2.1 Producto en el mercado

El fin de la investigación es la multiplicación in vitro de cacao CCN-51. Esto se realizó para que Biogreen C.A venda plantas endurecidas de cacao CCN-51 en su vivero, ubicado en la Provincia de Los Ríos en el cantón Quevedo, donde se encuentra el pueblo de Buena Fe. A 15 minutos del mismo está localizado el vivero de Biogreen C.A, donde se realizan plantas a la medida para los clientes selectos de Biogreen C.A; debido a que el mercado de Biogreen C.A se encuentra mayormente en la región litoral del Ecuador. La presente investigación se enfocará en dicha región y en el mercadeo del cacao CCN-51 como planta, ya que se venden plantas in vitro por pedido de clientes.

En la actualidad a nivel nacional no hay una empresa que ofrezca plantas estables de cacao CCN-51, por este motivo el producto que Biogreen C.A va ofertar como resultado de la investigación son plantas de cacao CCN-51 obtenidas a partir de multiplicación in vitro.

La investigación se realizó en cacao CCN-51 por las características antes mencionadas sobre dicha variedad, esto sumado a las bondades de la multiplicación in vitro y presencia de individuos resistentes a monilla y más productivos que otros en campo.

2.1.1 Producto principal y subproductos

El producto principal, para Biogreen C.A, sería la planta de cacao CCN-51 obtenida a partir de la multiplicación in vitro. Esto quiere decir que se tomará una parte de una planta de cacao madre cuidadosamente seleccionada; la misma que va a reproducir otras plantas con la ayuda de un medio nutritivo. Finalmente después de todo el proceso in vitro, se obtendrá una planta completa lista para la comercialización.

El proceso de obtención puede variar y éste depende de cada compañía; así mismo como sucede con la parte vegetal que es seleccionada de la planta

madre para obtener plantas de cacao CCN-51. Más adelante en el capítulo 7 de la presente investigación, se describirá a detalle la manera de obtención de cacao CCN-51 para Biogreen C.A donde se utilizará diseño experimental para fijar el mejor procedimiento para la obtención de callos de cacao CCN-51. El medio donde se desarrolle la planta también dependerá de cada empresa individualmente ya que pueden contar con formulaciones propias.

Para la comercialización dentro de la región litoral, la planta individual será vendida a las 16 semanas luego de arribar a vivero y el cliente también contará con asesoría de Biogreen. CA.

2.1.2 Productos sustitutos

El cacao es un cultivo que cuenta con algunas variedades, lo cual hace que el agricultor seleccione de acuerdo con las características que el mismo busca. El único sustituto es otra variedad de cacao (las mas comunes trinitario, criollo y forestare) o inclusive la misma en algunos casos, las cuales pueden ser ofertadas por INIAP (Estación experimental tropical Pichiligue), Sol Plantas, Bonanza por la vida, Vitroplant, Meristemas S.A y entre otros pequeños productores. El factor que no se puede sustituir es el hecho que la obtención del cacao de Biogreen C.A es a partir de in vitro lo cual no se esta realizando a nivel nacional, lo cual representa la obtención de líneas más productivas y resistentes.

2.2 Área de mercadeo o zona de influencia

El mercado que Biogreen C.A busca es el de toda la región litoral del Ecuador donde se planta cacao. Se puede inclusive competir con otras variedades de cacao, basando como zona de influencia en plantas de cacao aquellas ubicadas en la región litoral, las cuales según el INEC están divididas por región y variedades: Común 266663, Mejorado 75435, Híbrido Nacional (CCN-51) 29010, Híbrido internacional 1782 (INEC, 2010). Dando un total de 372 860 hectáreas en la costa Ecuatoriana como área de mercado.

2.2.1 Ubicación geográfica

El laboratorio de Biogreen C.A está ubicado en el Parque Metropolitano del sur de Quito, el sector de la antigua hacienda Aispur S/N, a 45 minutos del aeropuerto de Quito en automóvil. Aquí se realizarán las plantas in vitro de cacao CCN-51 para luego ser enviadas al vivero de Biogreen C.A ubicado en la Provincia de Los Ríos en el cantón Quevedo donde a 15 minutos del mismo se encuentra el pueblo de Buena Fe, aquí terminan el ciclo in vitro las plantas.

Cuando se menciona el probable mercado, se hace relación a la región costera del Ecuador, ya que es en este sector donde se realiza la mayor explotación del cultivo de cacao y sus distintas variedades.

No se complementa el resto de mercado nacional ya que la presente investigación se focaliza en la costa Ecuatoriana, es decir a nivel regional.

2.2.3 Población consumidora

El principal consumidor es el mercado nacional a nivel de la región costa, este se encuentra limitado hacia los clientes vigentes de Biogreen C.A, que son agricultores y grupos cacaoteros.

El producto, al ser cacao CCN-51 in vitro, tendrá que ser solicitado con anterioridad aproximada de 6 meses, también estará ligado a la cantidad de plantas requeridas, esto es por que los procesos de Biogreen C.A son de alto nivel.

En la región costera del Ecuador Biogreen C.A cuenta con grupos de productores agrícolas que ya reconocen la calidad de los productos de Biogreen C.A, siendo esto una nueva línea de plantas que Biogreen C.A busca sacar al mercado. Sus clientes buscan la misma calidad y confianza que ofrecen los otros productos de Biogreen C.A.

2.2.3 Ingresos del cliente

El cliente ecuatoriano cuenta con dólares como moneda nacional al momento, y esto es importante ya que los clientes por lo general son agricultores o grupos agrícolas y estos dependen del precio del cacao que se tiene a nivel nacional. Al momento el quintal (45.36 KGR) de cacao CCN-51 tiene un valor comercial fluctuante de \$140 el saco en promedio anual (Anecacao, 2012).

El consumidor ecuatoriano depende mucho del precio del cacao ya que tanto al agricultor independiente como a los grupos agrícolas le afecta mucho esto; sin embargo estos se encuentran en plena capacidad para adquirir las plantas de cacao CCN-51 in vitro, las cuales se obtendrán bajo pedido ya que el costo adicional que estas puedan significar, se compensará en los costos futuros visto que Biogreen C.A brinda material certificado a sus clientes.

2.2.4 Comportamiento del consumidor

El agricultor de cacao busca obtener el mayor rédito económico al momento de la cosecha, esto lo realiza por medio de su cultivo. Biogreen C.A brinda a sus clientes plantas de cacao CCN-51 in vitro, las mismas que cuentan con todas las bondades que posee el cultivo de tejidos de plantas por el medio in vitro así como el seguimiento técnico que ofrece Biogreen C.A a sus clientes para que puedan sacar el mayor provecho del cultivo.

2.2.5 Análisis de la demanda

El cultivo de cacao a nivel nacional especialmente en la costa, es considerado un cultivo de importancia que cuenta con fluctuaciones periódicas en el precio. Para la presente investigación se analizará la demanda a nivel provincial, basándose en el mercado costero al que se quiere llegar a tener como posible comprador; tomando en cuenta que el cultivo de cacao puede tener varias densidades. Con fines de la investigación se tomaron datos promedios y

condiciones óptimas de cultivo, tomando como base una producción de 30 QQ por hectárea y que cuentan con 1500 plantas cada una (Darío Hoy, 1990). En la siguiente tabla se observará la demanda aparente basándose en los datos anteriores:

Tabla 5:

Demanda aparente de cacao en la región costera de Ecuador (2010)

Provincia	Variiedad	Producción (Kg)	# de plantas demandadas
Esmeraldas	Común	4334000	2870198
	Mejorado	3537000	239006
	Hibrido nacional (CCN-51)	4948000	3276821
	Hibrido Internacional	246000	162913
Manabí	Común	14147000	9368874
	Mejorado	1001000	662913
	Hibrido nacional (CCN-51)	255000	168874
	Hibrido Internacional	1000	6622
Guayas	Común	16646000	11023841
	Mejorado	21788000	14429139
	Hibrido nacional (CCN-51)	6787000	4494701
	Hibrido Internacional	867000	574172

(Continua)

Tabla 5:

Continuación

Provincia	Variiedad	Producción (Kg)	# de plantas demandadas
El Oro	Común	3320000	2198675.7
	Mejorado	4896	3242
	Hibrido nacional (CCN-51)	768	508
	Hibrido Internacional	293	194
Los Ríos	Común	31045	20560
	Mejorado	11629	7701
	Hibrido nacional (CCN-51)	5592	3703
	Hibrido Internacional	150	99

Tomado de INEC, 2010

Observando los datos se puede decir que existe una demanda de plantas de cacao de 49512756 a nivel de la región costera ecuatoriana, la misma que puede ser complementada con plantas de cacao CCN-51 in vitro de Biogreen C.A.

Viendo la tabla anterior se puede observar que a nivel provincial, en la región costera la provincia con mayor demanda en plantas de cacao es Guayas con un total de 30521853 de plantas de cacao. Entre tanto la provincia que requiere la menor cantidad de plantas de cacao es Los Ríos.

Las ventajas principales de las plantas in vitro de cacao CCN-51 es que éstas no cuentan con enfermedades, sino que vienen con resistencias superiores a enfermedades comparadas con aquellas que no son in vitro. Además son plantas de alto mérito genético, esto quiere decir que provienen de plantas madres que cuentan con las mejores características agronómicas y adaptación a nuestro medio, lo cual le brinda al agricultor un mayor rango de seguridad al momento de seleccionar una planta.

Demanda futura:

La demanda futura de plantas in vitro de cacao CCN-51 va a estar condicionado por la demanda de cacao de los agricultores que soliciten las plantas in vitro de cacao CCN-51, y estos a su vez estarán condicionados por el mercado y lo que el mismo agricultor requiera ya que, cada variedad de cacao cuenta con diferentes características.

2.2.6 Análisis de la oferta

Al momento, a nivel nacional no existe un empresa o laboratorio que produzca cacao CCN-51 de manera in vitro, es por eso que Biogreen C.A desarrolla la presente investigación para ser líder en la oferta de cacao CCN-51 en el mercado Ecuatoriano en especial en la región costera donde está focalizado el mercado del cacao y sus distintas variedades.

La oferta se puede observar únicamente en universidades en el exterior al igual que a nivel nacional y por otra parte también Biogreen C.A, todos estos se encuentran en constante investigación, para la obtención de medios que ayuden a conseguir éxito en el desarrollo de una planta de cacao CCN-51 a partir de la tecnología in vitro, la misma que le brindará un éxito al agricultor.

La oferta presente en el mercado, es únicamente de plantas de cacao CCN-51 sin que sigan un proceso de multiplicación in vitro, es decir, se realiza a manera de propagación vegetativa o por semillas lo cual, a la larga o a la corta, puede producir problemas evidentes; por consiguiente no muestra competencia frente al producto que ofrecerá Biogreen C.A, el mismo que busca mejores plantas sin problemas y como resultado le ofrece mayores ganancias a los agricultores.

2.2.7 Oferta futura

La oferta para el futuro será grande ya que la agricultura día a día busca la tecnificación con el fin de obtener más de su cultivo. La propuesta que Biogreen C.A busca lanzar al mercado Ecuatoriano está hecha focalizándose precisamente en la región costera porque el cacao CCN-51 de obtención in

vitro, ayudará a los agricultores en la obtención de mejores beneficios en un cultivo.

2.2.8 Análisis Oferta Demanda

La oferta a nivel nacional de cacao CCN-51 in vitro, actualmente no existe a nivel nacional, por este motivo la única oferta que se puede encontrar en el mercado en este momento es la de plantas de cacao CCN-51 por medio de semilla o de manera vegetativa; las mismas que pueden parecer similares a las plantas de cacao CCN-51 desarrolladas de manera in vitro pero que en realidad no lo son ya que, la tecnología in vitro brinda ventajas adicionales a las plantas de cacao CCN-51 desarrolladas de manera tradicional.

Lo que se puede apreciar en la tabla 4 sobre la demanda de plantas de cacao, es que el mercado es vasto en especial en la provincia del Guayas. Debido a que Biogreen C.A trabaja mediante órdenes de producción, se espera poder satisfacer la demanda insatisfecha de las plantas de cacao CCN-51; pues éste es un mercado que se puede explotar de manera directa y no se encuentra distribuido. Es un producto que no cuenta con competencia directa por el hecho de que no se ha desarrollado de manera in vitro el cacao a nivel nacional.

2.3 Precio de producto

El precio del producto va ser establecido mediante un mecanismo de formación del mismo, explicado a continuación.

2.3.1 Mecanismo de formación del precio del producto

Biogreen C.A determina la venta de plantas CCN-51 in vitro mediante pedido previo. Cada planta tendrá un costo como individual.

El estudio de mercado permitió establecer de manera preliminar el precio que debe tener el producto, en base a los siguientes factores:

- Los precios de la competencia (plantas obtenidas por propagación vegetativa y semillas; laboratorios de meristemos que podrían comercializar plantas en el futuro).
- La reacción esperada de los competidores.
- El tipo de consumidor.

El precio de la competencia que en este caso serían los viveros que realizan la propagación de cacao CCN-51 por medio vegetativo o semilla, es alrededor de \$0.50 centavos o \$1.05 dólares, tomando en cuenta que son plantas no certificadas.

El organismo que mayor competencia puede representar para Biogreen C.A, es INAP con plantas de \$1 dólar, es sanitariamente aceptable pero cuentan con una mala selección genética y variación.

Biogreen C.A ofrecerá plantas de cacao CCN-51 in vitro certificadas, que garantizarán una selección genética óptima. Las plantas de Biogreen C.A van a tener un costo de \$1.05 dólares.

Lo que se puede predecir es que, a raíz del descubrimiento de Biogreen C.A se puede generar una competencia futura por parte de los laboratorios de meristemos del Ecuador como: Microsistemas S.A, Nuevo Sol, INIAP (Estación Pichilingu), Bonanza (Cañar), Vitroplant (Pichincha), Biotecnología Vegetal (Manabí), Onelabt S.A (St. Elena) (IICA, 2011).

2.3.2 Canales de comercialización

Las plantas de cacao CCN-51 in vitro van a ser comercializadas por medio de publicidad panfletaria a los clientes actuales, y para aquellos clientes externos por medio de centros y ferias agrícolas.

Una vez que el cliente se decida en hacer la compra del producto, este se lo realizará mediante una llamada telefónica para luego llenar un contrato; o también se la puede realizar yendo directamente al vivero de Biogreen C.A para llenar el contrato.

2.3.3 Política de ventas y precios

Los precios serán fijados por Biogreen C.A, los mismos que están directamente influenciados por la demanda y la oferta del mercado costero ecuatoriano. Actualmente establecido en \$1.05.

Biogreen C.A trabaja mediante depósitos bancarios. Primero el cliente puede llamar hacer la orden de producción y, una vez comprobado que el cliente realiza el depósito bancario del pedido, se comenzará a procesar según estipula el contrato de Biogreen C.A.

2.3.4 Promoción y publicidad

Con el fin de posicionarse en el mercado de cacao, Biogreen C.A. va a realizar una campaña publicitaria continúa a nivel de la región litoral.

La campaña de promoción del cacao CCN-51 in vitro comprende:

- La presentación del producto en ferias agrícolas a nivel nacional con el fin de captar la mayor atención posible del mercado agrícola y focalizándose especialmente en la región costera.
- Difundir panfletos en los centros agrícolas en la región litoral, los mismos que explicarán las ventajas de las plantas de cacao CCN-51 in vitro sobre las plantas comunes de cacao CCN-51.
- Realizar campañas publicitarias por medio de la página web de Biogreen C.A así como en páginas web que estén relacionadas con la agricultura para captar mayor atención del sector agrícola.
- Se cuenta con una organización de comercialización establecida con varios agentes de ventas.

3. INGENIERÍA DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

3.1 Especificaciones

Las especificaciones a continuación trataran todo aspectos directamente relacionados con la presente investigación.

3.1.1 Especificaciones de la materia prima

La materia prima, para la multiplicación in vitro de cacao CCN-51, es materia vegetal de una planta madre de alto mérito genético. Para la presente investigación se utilizaron las flores no abiertas y los ápices de las plantas de cacao.

Características físicas de la materia prima.

La planta madre tiene que tener óptimas condiciones para ser seleccionada antes de obtener la materia vegetal de la misma ya que de una planta madre se podrán obtener varias plantas idénticas a la madre; las características que se busca en una planta madre en líneas generales para ser seleccionada son:

- Constitución, fijándose en la estructura (Desarrollo y conformación)
- Libre de plagas y enfermedades. El tema de selección genética está a cargo de los especialistas de Biogreen.
- Libre de deficiencias nutricionales.
- La edad que oscile entre los 8 a 20 años, porque es la edad más productiva del cacao CCN-51
- Alta producción, es decir que brinde de 100 a 200 frutos año.

Una vez ya seleccionada la planta madre, el material que se busca en ella, en esta investigación son las flores de cacao antes de abrirse y los ápices sanos de la planta madre.

3.1.2 Especificaciones Insumos

Los insumos utilizados para obtener cacao CCN-51 in vitro, dependerán del medio que se realice, el cual variará dependiendo de la etapa de crecimiento de la planta, laboratorio y formulación. Los insumos que conforman un medio nutritivo utilizado en multiplicación in vitro son en gran parte lo que se presentó en la Tabla 1 (Composición de cultivos). Biogreen C.A obtiene la mayor parte de los insumos que utiliza de la casa comercial norte americana SIGMA-ALDRICH C.A. Los insumos que se mencionan a continuación, son aquellos insumos que se utilizaron en los medios donde se realizó la investigación de obtención de cacao CCN-51 in vitro para Biogreen C.A.

- Agua destilada:
Es agua estéril, libre de cualquier impureza inclusive libre de minerales.
- Nitrato de calcio:
Es un compuesto inorgánico, con el color sal, absorbe comúnmente la humedad del aire y se encuentra por lo general como tetrahidato. Es utilizado como componente del fertilizante, se encuentra como un florecimiento en el estiércol que este en contacto con piedra caliza o concreta (Dinkinperu, 2009).
- Nitrato de Amonio
Es un cristal blanco y sólido a temperatura ambiente y presión estándar. Es comúnmente utilizado en la agricultura como un fertilizante de alto contenido de nitrógeno (Pollex, 2012).
- Cloruro de calcio:
Es un líquido cristalino, producto de la reacción entre carbonato de calcio y ácido clorhídrico, obtenido luego de un proceso de neutralización y filtración. Por lo regular se ocupa en plantas con el fin de dar firmeza a la corteza y aporte de calcio en forma de fertilizante (OxyChille. 2012).

- Sulfato de potasio:

Es un fertilizante inorgánico con una presentación de gránulos esféricos blancos, que brinda una fuente libre de cloruros y nitratos. Es el conjunto del azufre y potasio. Los efectos combinados en la planta producen la estimulación de la producción de vitaminas, almidones y azúcares (Fertisquisa, 2007).

- Sulfato de magnesio:

Es una fuente de magnesio de rápida asimilación, el uso en una planta se realiza por períodos prolongados de tiempo. Ya que la alta presencia de magnesio facilita la realización del proceso de fotosíntesis, realiza la activación del metabolismo de carbohidratos, grasas y proteínas, interviene en el transporte de fosfato, incrementa la resistencia de plantas frente a enfermedades, potencializa la absorción de nutrientes de la planta, garantiza la formación de proteínas en las plantas, incorpora amino ácidos, y en la composición de algunas enzimas y coenzimas (Agrimen, 2012).

- Fosfato de potasio:

Es un líquido incoloro e inorgánico que complementa la nutrición normal de una planta. Su función es actuar como un nutriente a base de fósforo y de potenciar las defensas naturales de las plantas por medio de la producción de fitoalexinas las que por acción de estímulo ayuda en el crecimiento de la planta (Ram, 2009).

- Nitrato de Zinc:

Es un cristal incoloro pero también se lo puede encontrar en forma líquida. Es de fácil absorción; el nitrógeno presente aumenta la eficiencia de la planta para la absorción de nutrientes; el zinc que está presente estimula la formación de células y aumenta el desarrollo radical, incrementa el tamaño de las hojas y el crecimiento en general de la planta (Antalien, 2010).

- **Sulfato de magnesio:**
Es una sal blanca, procedente de fuentes salinas naturales donde queda como residuo después de haberse evaporado el agua. Constituye la parte central de la molécula de clorofila, por este motivo es importante debido a que al momento de realizar la fotosíntesis interviene en la absorción y migración de fosforo, en la formación lipídica, fija el nitrógeno a la planta, y en la formación y acumulación de reservas de azúcares (ALECO, 2009).
- **Sulfato de Cobre:**
Es un compuesto químico derivado del cobre que tiene forma de cristales azules. Sirve para suplir las funciones del cobre en el campo de las enzimas como citocromos, plifenoles, ect. Forma parte de la plastocianina en los cloroplastos, y participa en la trasferencia de electrones para realizar la fotosíntesis (Agrisagi, 2009).
- **Acido Bórico:**
Es blanco y cristalino. Debido a la presencia de Boro, el cual es un micronutriente esencial para el crecimiento de las plantas, es utilizado en combinación a otros compuestos químicos para corregir deficiencias (Minera Santa Rita, 2006).
- **Molibdato de sodio:**
Son cristales blancos y finos como escamas. Este compuesto químico sirve para sintetizar y activar la enzima nitrato reductasa, además transforma el fósforo inorgánico en orgánico (IPNI, 2008).
- **Sulfato de hierro:**
Es un granulado de color verde manzana. Sirve para el transporte de oxígeno y realizar síntesis enzimática para la respiración (IPNI, 2008).
- **EDTA:**
Son las siglas que significan acido etilendiaminotetraacético, es una

sustancia utilizada como agente quelante. Ayuda en la absorción de los micro elementos en la planta, para que los elementos no se precipiten en el medio de cultivo y evita fitotoxicidades (WALCO S.A, 2000).

- Myo-Inositol:

Es un carbohidrato, pero no una azúcar clásica. Participa en el almacenamiento y transporte de auxinas, en la biosíntesis de ácido phytico, biosíntesis de la pared celular y la producción de moléculas de estrés (Styer. C, 2000, pp 1).

- Thiamina-HCL:

Es una vitamina utilizada para el crecimiento celular al momento de realizar cultivos in vitro (Misawa.M, 1994, pp 1).

- Acido Nicotínico:

Es una vitamina que forma parte del complejo B. Su función es realizar la canalización de varios procesos metabólicos (PhytoTechnology Laboratories INC, 2003, pp 3).

- Glicina:

Es uno de los aminoácidos que forma las proteínas de todos los seres vivos. Se utiliza en medios como precursor de aminoácidos. En altas cantidades este puede ser perjudicial (Miroginski L, 1995, pp 32).

- Pyridoxina:

Es una vitamina del complejo B (B6). Tiene la función de hacer crecer las células de la planta (PhytoTechnology Laboratories INC, 2003, pp 3).

- Alanina:

Es un aminoácido. Que ayuda en los efectos de tolerancia hipoxica en las raíces de las plantas (Nepalao, Lucena y Olveira, 2007, pp 2)

- **Leucina:**
Es uno de los aminoácidos esenciales, interviene en la síntesis de proteínas, resistencia al estrés, y efectos en la fotosíntesis.
- **Lisina:**
Es un aminoácido, interviene en la síntesis de proteínas, resistencia al estrés, y efectos en la fotosíntesis.
- **Triptófano:**
Es un aminoácido. Síntesis de proteínas, Resistencia al estrés, efectos en la fotosíntesis (AGRARES, 2005, pp 3).

3.1.3 Especificación de medios de cultivo a usar

Para la elaboración de un medio de cultivo in vitro se toma en cuenta varias soluciones pre elaboradas denominadas madres las cuales cuenta con vitaminas, minerales, hormonas y elementos propios de cada solución madre. Estas soluciones al combinarse forman un medio de cultivo. La formulación de soluciones madres se realiza con el fin de obtener de una manera fácil y oportuna grandes cantidades de medios para cuando se los requiera.

Los medios de cultivo elaborados en la presente proyecto de titulación son propiedad de la empresa Biogreen C.A, por lo cual se colocará únicamente la formulación de los medios en los cuales se desarrolló el presente proyecto y no las soluciones madre que conforman los mismos medios, esto es por el sigilo empresarial, de Biogreen C.A.

El medio de cultivo testigo, en este caso el de Pennsylvania State University, será colocado de manera completa, al igual que los medios de cultivo como las soluciones madre que integran dichos medios, pues se obtuvo de documentos de uso público.

Medio testigo Pensilvania State University

Medio de crecimiento primario (T1)

En la tabla a continuación se presenta la formulación del medio T1

Tabla 6:

Solución del medio T1 Pensilvania State University

Componente	Unidad	valor
DKW macro A (10x)	ml	100
DKW macro B (10x)	ml	100
DKW micro (100x)	ml	10
DKW vitaminas (1000x)	ml	1
Glucosa	g	20
Glutamina	mg	250
Myo- Inositol	mg	100
2,4D	ml	2
TDZ	ul	25
H2O Destilado	l	1
pH		5.8
Phytigel	g	2
Autoclave	min	18

Tomado de Maximova Siela, 2010, Integrated System for Vegetative Propagation of Cacao.

Medio crecimiento secundario (T2)

A continuación se presenta la formulación del medio T2

Tabla 7:

Solución del medio T2 Pensilvania State University

Componente	Unidad	valor
McCown's Salts	MI	100
B5 vitaminas	MI	1
Glucosa	Gr	20

(Continua)

Tabla 7:

Continuación

Componente	Unidad	valor
2,4D	MI	2
6-BA	UI	50
H2O Destilado	L	1
pH		5.8
Phytigel	G	2.2
Autoclave	Min	18

Tomado de Maximova Siela, 2010, Integrated System for Vegetative Propagation of Cacao

Soluciones madres testigos

Solución madre DKW macro A y B

A continuación se presenta la formulación de la solución madre DKW macro A y B

Tabla 8:

Solución Macro A

Componente	Unidad	valor
H2O Destilado	l	1
Nitrato de calcio	g	14.16
Sulfato de potasio	g	10.69

Tomado de Maximova Siela, 2010, Integrated System for Vegetative Propagation of Cacao

Tabla 9:

Solución Macro B

Componente	Unidad	valor
H2O destilado	l	1
Cloruro de calcio	g	1.49
Sulfato de potasio	g	15.5
Sulfato de magnesio	g	7.40
Fosfato de potasio	g	2.65

Tomado de : Maximova Siela, 2010, Integrated System for Vegetative Propagation of Cacao

DKW 100X Micro elementos.

A continuación se presenta la formulación de la solución madre DKW 100X micro elementos.

Tabla 10:

Solución DKW 100X Micro elementos.

Componente	Unidad	valor
H2O Destilado	l	1
Nitrato Zinc	g	1.700
Sulfato de magnesio	g	3.340
Sulfato de cobre	g	0.025
Acido Bórico	g	0.480
Molibdato de sodio	g	0.039
Sulfato de hierro	g	3.380
Dihidrato de disodio	g	4.540

Tomado de Maximova Siela, 2010, Integrated System for Vegetative Propagation of Cacao

DKW 1000X Solución de vitaminas.

A continuación se presenta la formulación de la solución madre DKW 1000X solución de vitaminas.

Tabla 11:

DKW 1000X Solución de vitaminas

Componente	Unidad	Valor
H2O Destilado	ml	100
Myo-Inositol	g	10.0
Thiamina	g	0.2
Acido nicotínico	g	0.1
Glicina	g	0.2

Tomado de Maximova Siela, 2010, Integrated System for Vegetative Propagation of Cacao

B5 1000X Solución de vitaminas.

A continuación se presenta la formulación de la solución madre B5 1000C solución de vitaminas.

Tabla 12:

1000X Solución de vitaminas.

Componente	Unidad	Valor
H2O Destilado	ml	50
Myo-Inositol	g	5.0
Thiamina	mg	500
Acido Nicotínico	mg	50
Pyridoxina	mg	50

Tomado de Maximova Siela, 2010, Integrated System for Vegetative Propagation of Cacao

Aminoácidos 1000X solución

A continuación se presenta la formulación de la solución madre aminoácidos 1000X.

Tabla13:

Aminoácidos 1000X solución

Componente	Unidad	Valor
H2O Destilado	ml	100
Arginina	mg	43.55
Glicina	mg	18.76
Leucina	mg	32.80
Lisina	mg	45.65
Triptófano	mg	51.05

Tomado de Maximova Siela, 2010, Integrated System for Vegetative Propagation of Cacao

Todo medio se realiza en base de soluciones madre que al final forman el medio a utilizar; en el caso del medio testigo en las tablas 6 a la 13, son el medio final al cual se adiciona las soluciones madres que se encuentran en sus respectivas proporciones.

Medios Biogreen Agustín Cobos

Medio Biogreen Medio de crecimiento primario “B1” (X3)

A continuación se presenta la formulación de la solución del medio de crecimiento primario B1 (X3).

Tabla 14:

Solución medio B1 crecimiento primario

Componente	Unidad	Valor
Agar gel	gr	2
X20	ml	50
X100	ml	10
X1000	ml	1
Quelato	ml	16,7
Azúcar	gr	30
Myo- Inositol	mg	100
Solución fitohormonal (Sigilo corporativo)	ml	3
Vitaminas	ml	1
H2O Destilada	litro	1
pH		5.5 – 6
Autoclave	min	30

Medio Biogreen Medio de crecimiento primario “B2” (M2)

A continuación se presenta la formulación de la solución del medio de crecimiento primario B2 (M2)

Tabla 15:

Solución medio B2 crecimiento primario

Componente	Unidad	Valor
Gel	gr	2
X20	ml	50
X100	ml	10
X1000	ml	1

(Continua)

Tabla 15:

Continuación

Quelato	ml	16,7
Azúcar	gr	40
Myo- Inositol	mg	100
Solución fitohormonal (Sigilo corporativo)	ml	5
Vitaminas	ml	1
H2O Destilada	l	1
pH		5.5 – 6
Autoclave	min	30

Medio Biogreen Medio de crecimiento secundario “BS” (X3 AG)

A continuación se presenta la formulación de la solución del medio de crecimiento primario BS (X3 AG)

Tabla 16:

Solución medio BS crecimiento secundario.

Componente	Unidad	Valor
Gel	gr	2
X20	ml	50
X100	ml	10
X1000	ml	1
Quelato	ml	16,7
Azúcar	gr	30
Myo- Inositol	mg	100
Solución fitohormonal 1 (Sigilo corporativo)	ml	3
Vitaminas	ml	1

(Continua)

Tabla 16:

Continuación.

Componente	Unidad	Valor
H2O Destilada	litro	1
pH		5.5 – 6
Solución fitohormonal 2 (Sigilo corporativo)	ml	1
Autoclave	min	30

Medio Biogreen de desarrollo “BD” (MCO)

A continuación se presenta la formulación de la solución del medio de desarrollo BD (MCO)

Tabla 17:

Solución medio BD medio desarrollo.

Componente	Unidad	Valor
Gel Agar	gr	2
X20	ml	50
X100	ml	10
X1000	ml	1
Quelato	ml	16.7
2.4d	ml	8
Solución fitohormonal 3 (Sigilo corporativo)	ml	0.44
Azúcar	Sigilo corporativo	
Myo- Inositol	mg	100
Vitaminas	ml	1
H2O destilada	l	1
pH		5.5 – 6
Autoclave	min	30

Por motivo de sigilo empresarial no se pondrán las fórmulas madre de Biogreen C.A. Por fórmula madre nos referimos a X20, X100, X1000, Quelato, Vitaminas, AG3.

3.1.4 Especificaciones de material que contiene los medios de cultivo

Los empaques o lugares donde se coloca el medio para realizar la multiplicación in vitro, es un material exclusivo de Biogreen C.A para el uso respectivo y es fruto de una investigación que realizó el personal de Biogreen C.A por años. Por motivos de sigilo empresarial, no se va a mencionar en la presente investigación, pero cabe recalcar que éste no permite la entrada de hongos o patógenos.

3.1.5 Especificaciones de producto terminado

El producto terminado en la presente investigación, se considera el hecho de lograr que el cacao CCN-51 se multiplique en un medio óptimo obtenido por formulación y eliminación de los medios de cultivos que no nos dieron éxito.

Una vez obtenido el cacao CCN-51 por multiplicación in vitro, Biogreen C.A se encargará de endurecer las plantas en su vivero con el fin de obtener plantas de CCN-51 in vitro, las cuales tienen todas las bondades de los cultivos de tejidos. Las cuales son las siguientes:

- Plantas estériles (libre de enfermedades).
- Genéticamente superior por la selección realizada.
- En el caso del cacao en particular plantas hermafroditas.
- Porcentajes de mutantes bajo.
- Homogeneidad del cultivo.
- Mayor tiempo de la vida útil en la plantación.
- Resistencia a enfermedades ya que en la selección, se han tomando en cuenta estos factores.
- Plantas con mejor adaptabilidad a un cultivo comercial de alto rendimiento.

- Rentabilidad alta por los factores mencionados anteriormente ya que el carácter genético confiere a la planta un buen promedio productivo.

3.2 Maquinarias y equipos

Para la maquinaria y equipos utilizados por motivo de sigilo de sus instalaciones, las figuras presentadas a continuación no pertenecen a las utilizadas en Biogreen C.A:

- Autoclave:

Es un dispositivo básico para empezar la operación, sirve para esterilizar material de laboratorio, utilizando vapor de agua a alta presión y temperatura, la alta presión evita que el agua llegue a ebullición a pesar de su alta temperatura. El fundamento de esterilización de la autoclave es que coagula las proteínas de los microorganismo debido a la presión y temperatura produciendo finalmente una desnaturalización del ADN (F.A.C, 2008).

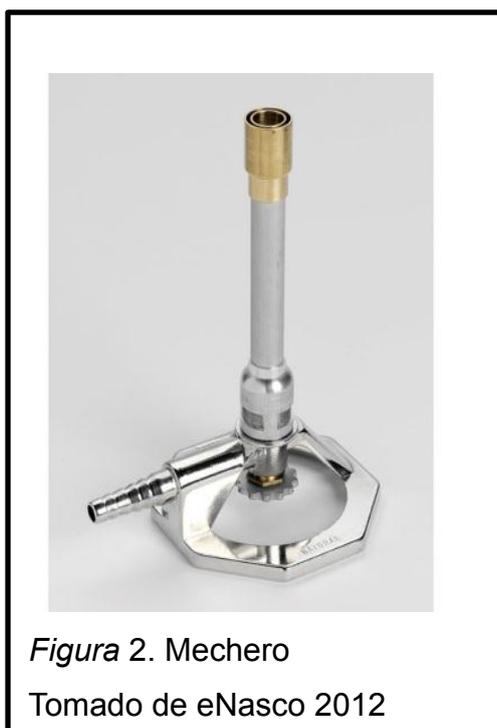


Figura 1. Autoclave

Tomado de Absolute Medical Equipment., 2012

- Mecheros:

Existen varios tipos de mecheros en el mercado, el más común es el mechero Bunsen para el uso de laboratorio a la final todos cumplen la misma función de dar un fuente controlada de calor por medio del fuego. El mechero Busen esta constituido por un tubo vertical que va enroscado a un pie metálico con ingreso para el flujo de combustible el cual es regulado por una llave (Laboratorio Químico 3.0, 2010).



- Cámara de crecimiento o cuarto de crecimiento:

Estas cámaras son diseñadas con el fin de simular las condiciones del día o la noche para ayudar en el crecimiento y desarrollo de una plántula antes de entrar en la etapa de crecimiento. Una cámara de crecimiento tiene la facultad de controlar la temperatura y humedad de la misma mediante programación previa (SHEL LAB, 2012). El cuarto de crecimiento persigue el mismo principio que la cámara de crecimiento pero la diferencia es que los aparatos utilizados para regular la temperatura y humedad son mayores y la superficie requerida

es mayor, ya que esta va a tener acogida para un mayor número de plantas en crecimiento. En el caso de cacao la temperatura ideal es 25 C° - 30 C°.



Figura 3. Cámara de crecimiento

SHEL LAB, 2012

Dimensiones: Ancho x Dimensión Alto/34.5 x 34.5 x 77.5 (cm)

- Incubadora (Obscura):

Esto se puede considerar como el cuarto de crecimiento o la cámara de crecimiento con la única diferencia que éste se encuentra con las luces apagadas, por el simple motivo que en algunas etapas del crecimiento las plantas necesitan horas de oscuridad.

- Cámara de flujo laminar:

Este equipo es uno de los más importantes de la operación ya que, la mayor parte de las actividades en un laboratorio in vitro se realizan dentro de este. Una cámara de flujo laminar brinda un ambiente casi estéril, mediante el cual pasa el aire por filtros HEPA (high efficiency particulate), estos filtros remueven 99.99% de los materiales que se encuentren en el aire como (polvo, esporas,

micelas) y brinda aire filtrado a un lugar cerrado con una saliente pequeña (Forister y Burger, 2008, pp 1).



- pH metro:

Un pH metro mide el pH de las soluciones utilizando un electrodo de vidrio. El electrodo está hecho de un vidrio bien delgado que permite el paso de los iones de hidrógeno. El aparato mide el potencial eléctrico y convierte esta información en una lectura de pH de una muestra (University of Wisconsin Madison, 1996).



- Refrigerador:

Es parte importante de los materiales de un laboratorio ya que algunas formulaciones, enzimas, vitaminas y minerales requieren estar en temperaturas bajas por un período de tiempo prolongado caso contrario estas pueden producir cambios en ellas. Una refrigeradora de laboratorio garantiza que la misma, no va tener fluctuaciones de temperatura como una refrigeradora normal, la cual puede experimentar cambios en sus temperaturas dependiendo de los cambios de voltaje.



Figura 6 Refrigerador uso de laboratorio

Mc Queen Laboratory Supply Company, 2012

Dimensiones:77.5 X 34 X 35.5

- Balanza:

Es un instrumento básico en cualquier laboratorio ya que da con exactitud cualquier peso que se requiera, en un laboratorio de meristemas es aún más indispensable ya que este instrumento puede pesar inclusive en microgramos, lo cual en ocasiones es necesario para la formulación de medios.

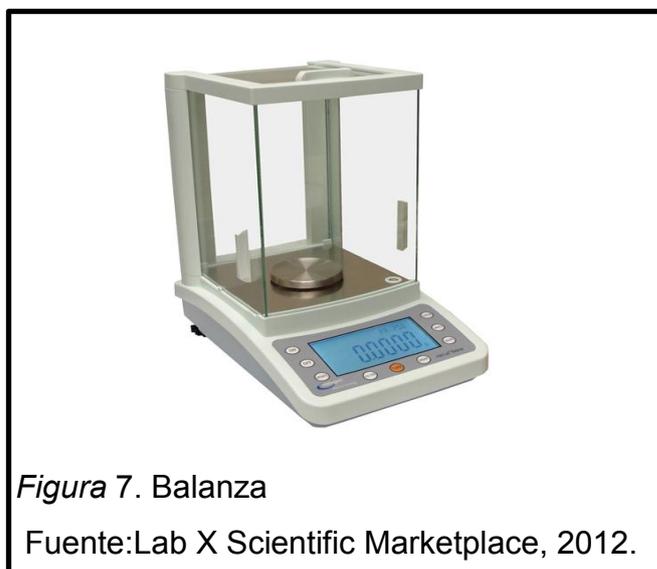


Figura 7. Balanza

Fuente: Lab X Scientific Marketplace, 2012.

- Pinzas y bisturí:

Las pinzas son un instrumento indispensable en el laboratorio, es un sistema simple de palancas que pueden ser operados mecánicamente con las manos, en este caso se utiliza las pinzas para no producir contaminación por contacto con las manos, de esta manera se mantiene la inocuidad.

Los Bisturí es un instrumento utilizado para realizar cortes de manera inocua en este caso es un estilo de bisturí al que se le cambia la hoja cada vez que se utilice la cámara de flujo laminar.



Figura 8. Pinzas

Tomado de AUXILAB S.L. 2012



3.3 Metodología

3.3.1 Pruebas de medios de cultivo:

Se van a probar dos medios de cultivo Biogreen C.A frente a un medio cultivado testigo de la Pensilvania State University. Se realizaron monitoreos semanales y las formulaciones de los mismos son registradas.

3.3.2 Tipo de diseño experimental

Se escogió un diseño completamente al azar (DCA) y una prueba de igualdad de hipótesis CHI cuadrado (prueba no paramétrica) con el fin de evaluar los distintos parámetros en la presente investigación, en lo referente a lo que es los explantos en el medio:

- Explantos contaminadas
- Explantos muertas
- Formación de callo

Se estudiaron 3 tratamientos (Procedimientos de obtención in vitro hasta multiplicación) con 30 replicas por tratamiento las cuales estarán en 3 medios para poder tener de manera estandarizada a los individuos (plantas) dentro de

cada medio. La unidad experimental es plantas de cacao selectas de las cuales extrajimos sus flores.

3.3.3 Pruebas estadísticas utilizadas

Se realizó análisis de varianza (ANOVA) para comprobar la hipótesis referente a los parámetros mencionados en el numeral 4.3.2 para que de esta manera encontrar de una manera estadística cuál de los procedimientos de multiplicación in vitro es el óptimo.

El nivel de significancia utilizado para la ANOVA es de 95%.

En el caso de rechazar la hipótesis para poder comprobar que tratamientos (Procedimientos de multiplicación in vitro) son distintos se utilizara el método de comparación de medias LCD a un nivel de significancia del 95%.

Para garantizar la hipótesis de igualdad entre los procedimientos se realizo una prueba de igualdad de hipótesis CHI cuadrado (Prueba no paramétrica) con el fin de descartar la igualdad.

Todos los cálculos se efectuaron en el software estadístico Minitab.

3.3.4 Formulación de medios

Las formulaciones de todos los medios de cultivo en la presente investigación cumplen con los requerimientos necesarios para que finalmente se obtenga un callo.

Para comprobar en estudio, los medios se van a dividir en medio de crecimiento primario, medio de crecimiento secundario y medio de desarrollo.

Las tablas 18,19 y 20 detallan los ml o gr requeridos de las distintas soluciones para cada medio de cultivo.

Tabla 18:
Comparación de medios de crecimiento primario

MEDIOS		
MEDIO DE CRECIMIENTO PRIMARIO (ml y gr)		
T1 (Penn State)	B1(X3) (Biogreen)	B2 (M2) (Biogreen)
DKW macroA 100ml	X20 50ml	X20 50ml
DKW macroB 100ml	X100 10ml	X100 10ml
DKW micro 10ml	X1000 1ml	X1000 1ml
DKW Vitaminas 1ml	Vitaminas 1ml	Vitaminas 1ml
Glucosa 20 gr	Azúcar 30gr	Azúcar 40gr
Glutamina 250 mg	Quelato 16.7	Quelato 16.7
Myo-inositol 100mg	Myo-inositol 100mg	Myo-inositol 100mg
2,4 D 2ml	Solución fitohormonal (Sigilo corporativo) 3ml	Solución fitohormonal (Sigilo corporativo) 5ml
TDZ 25	N/A	N/A
pH 5.8	pH 5.5 - 6	pH 5.5 - 6
Phytigel 2 g	Gel 2gr	Gel 2gr
H2O Desti 1l	H2O Desti 1l	H2O Desti 1l

Tabla 19:

Comparación de medios de crecimiento secundario.

MEDIOS	
MEDIO DE CRECIMIENTO SECUNDARIOS (ml y gr)	
T2 (Penn State)	BS(X3 AG) (Biogreen)
McCown's Salts 100 ml	X20 50ml
B5 vitaminas 1 ml	X100 10ml
6-BA 20 gr	Solución fitohormonal (Sigilo corporativo) 3ml
Glucosa 20 gr	Azúcar 30gr
N/A	Quelato 16.7
N/A	Myo-inositol 100mg
N/A	Vitaminas 1ml
N/A	Solución fitohormonal 2 (Sigilo corporativo) 1ml
pH 5.8	pH 5.5 – 6
Phytigel 2.2 g	Gel 2gr
H2O Desti 1l	H2O Desti 1l

Tabla 20:

Medio Desarrollo

MEDIOS
MEDIO DE DESARROLLO
BD(MCO) Biogreen C.A
X20 50ml
X100 10ml
X1000 1ml
2.4D 8ml
Solución fitohormonal 3 (S.C) 0.44ML
Azúcar 30gr
Quelato 16.7
Myo-inositol 100mg
Vitaminas 1ml
pH 5.5 – 6
Gel 2gr
H2O Destilada 1l

3.3.5 Tratamientos

Se formulan 3 tratamientos (Medios de cultivo) con distintas vitaminas, minerales y aditivos. Cada tratamiento es representado por siglas establecidas. En la tabla 21 se presenta una breve descripción de los tratamientos.

Tabla 21:

Tratamientos de la investigación

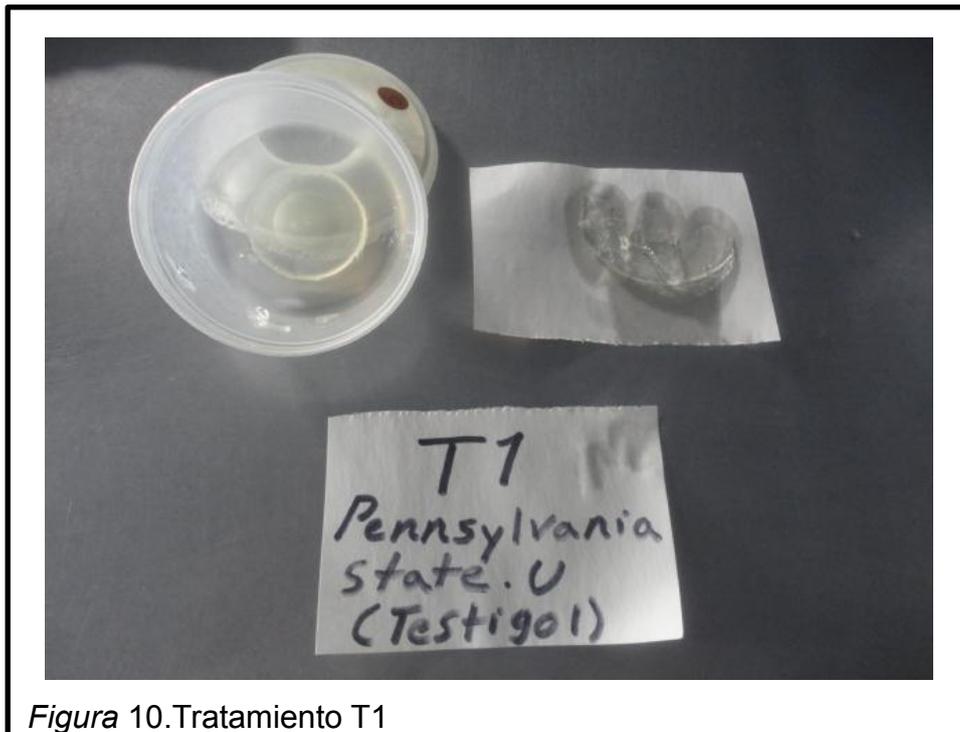
Tratamiento	Descripción	Replicas
T1	Medio de crecimiento T1 (Los sobrevivientes continúan al medio de crecimiento T2). Es un sistema de propagación in vitro.	30
B1 (X3)	Medio Biogreen X3 (Los sobrevivientes continuaran al medio BS y BD). Es un sistema de propagación in vitro,	30
B2 (M2)	Medio Biogreen M2 (Los sobrevivientes continuaran al medio BS y BD). Es un sistema de propagación in vitro.	30

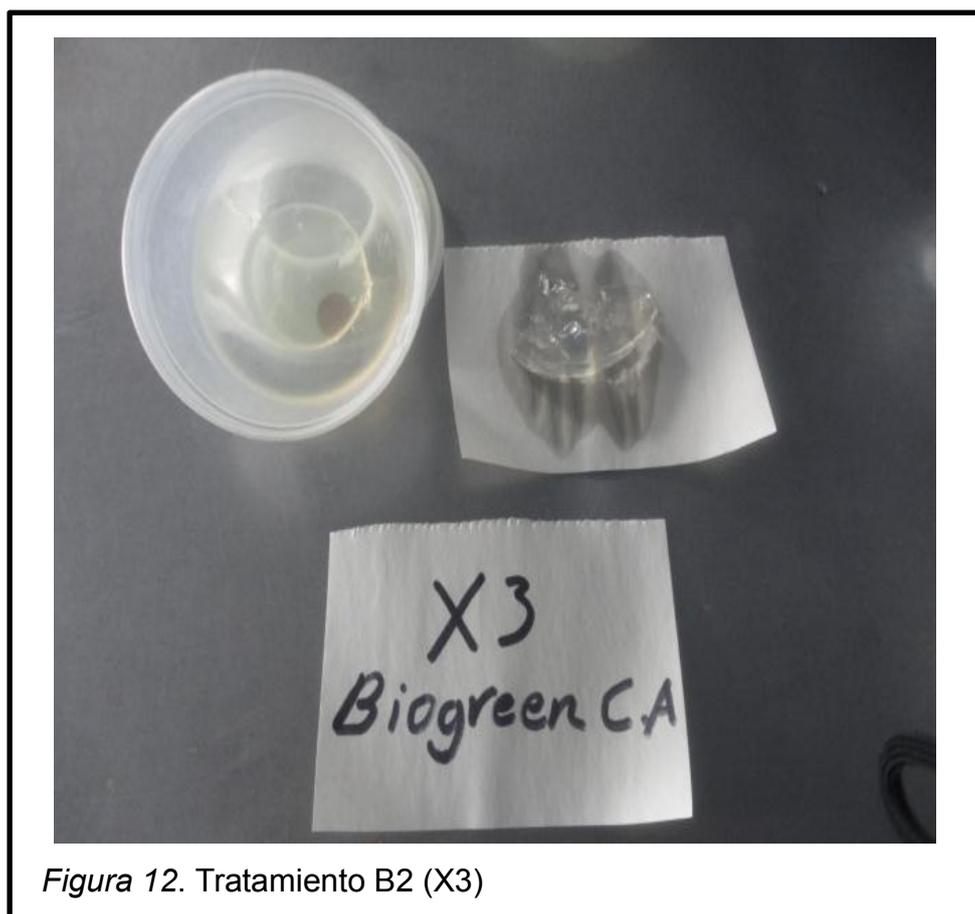
3.3.6 Presentación de medios de cultivo

La presentación, de los medios de cultivo para los 3 tratamientos, sigue un procedimiento de transferencias en 3 partes que son medios de iniciación, medios secundarios y medios de desarrollo.

Medios de crecimiento primario:

En la etapa de iniciación es un gel transparente, el mismo que se diferencia en el contenido de vitaminas, minerales, hormonas y otras sustancias, las cuales se puede ver puntualmente en las especificaciones de los medios de cultivo en la tabla 17 .A continuación se presentan los medios de iniciación con los nombres de tratamiento T1, B1 (M2), B2 (X3).





Medios de crecimiento secundarios:

Para el proceso de multiplicación in vitro se realiza varias transferencias es por eso que el material genético que se encontraba en el medio de crecimiento primario se transferirá a un medio de crecimiento secundario.

Los medios de crecimiento secundario son aquellos donde el callo que se obtuvo por los medios de crecimiento primario entra a una nueva etapa (etapa de corazón y torpedo) de sí mismo para que, de esta manera pueda estabilizarse para entrar a la siguiente etapa de crecimiento. Las diferencias presentadas en los medios se puede observar en las tablas 17,18 y19. Los medios de iniciación de Biogreen C.A (B1, B2) utilizaron el medio secundario de crecimiento BS (X3 Ag); el tratamiento testigo (T1) utilizó el medio secundario T2; ambos medios secundarios BS y T2 cuentan con una consistencia gelatinosa e incolora. En las figuras 13, 14 se presenta los medios secundarios BS (X3 AG), T2.

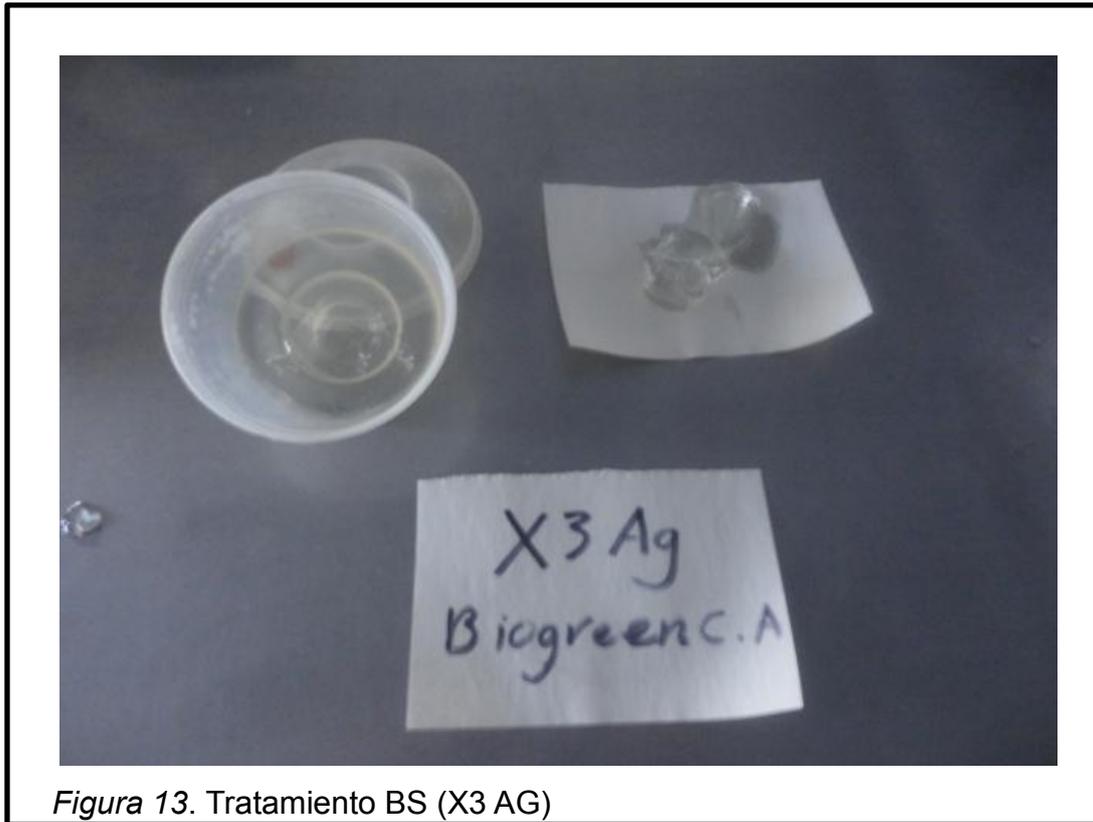


Figura 13. Tratamiento BS (X3 AG)

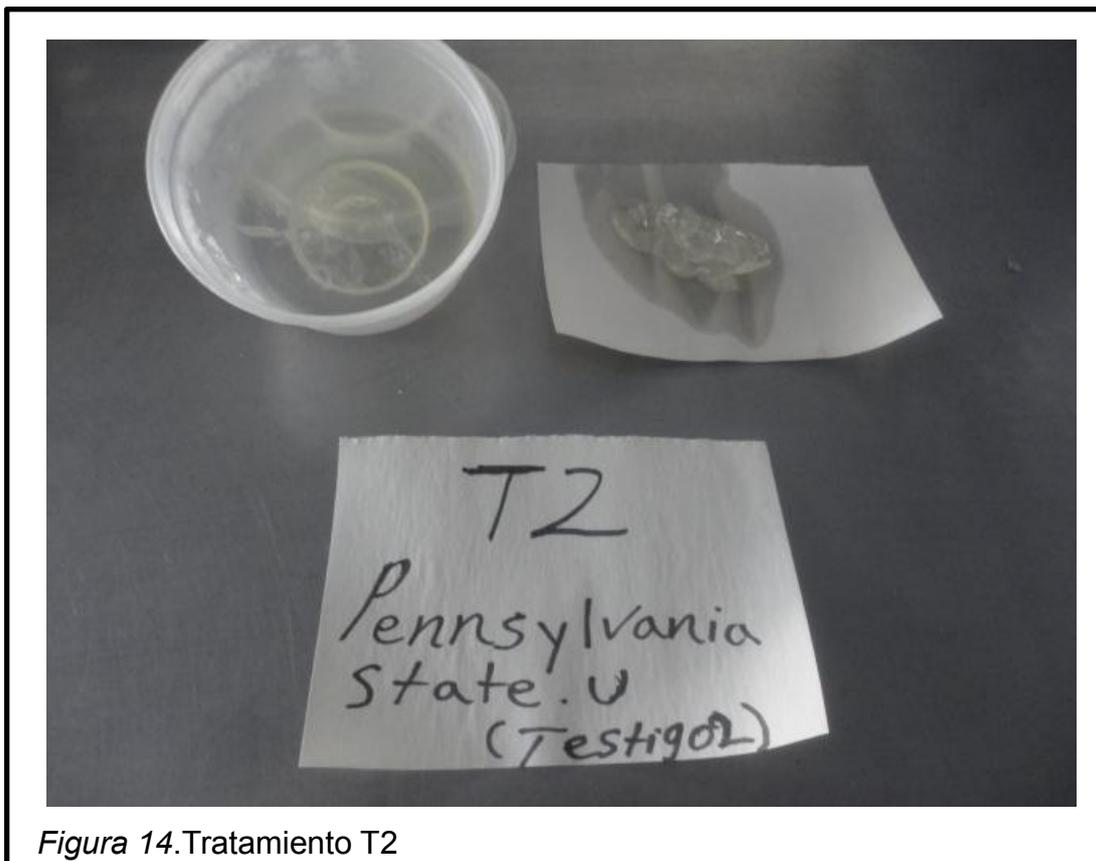


Figura 14. Tratamiento T2

Medios de desarrollo:

El medio de desarrollo es donde los callos ya están en su etapa final (etapa de torpedo) y se preparan para seguir a la siguiente etapa que es la de enraizamiento, en estos medios se podrá apreciar una carga hormonal menor, la misma que se puede observar en la tabla 18. El medio utilizado por Biogreen C.A fue BD (MCO) el medio tiene una consistencia gelatinosa y un color verde claro el cual es conferido por la baja carga hormonal. No existieron medios de desarrollo del testigo por el motivo que en la presente investigación, el testigo no logro pasar de la etapa secundaria y la creación del medio era injustificada para Biogreen C.A.



Figura 15: Tratamiento BD (MCO)

3.4 Programa de manejo

3.4.1 Uso de protocolos in vitro.

El proceso de cultivo que se va utilizar para la presente investigación es un protocolo patentado por Biogreen C.A frente a un protocolo internacional o testigo de la Universidad de Pensilvania Estados Unidos de Norte América.

3.4.2 Protocolo internacional o testigo (Universidad de Pensilvania)

a. Elección:

Por el proceso de elección se refiere, al material genético elite el cual a comprobado ser el mejor en todos sus aspectos. Dentro del proceso de elección hay pasos a seguir:

Recolección

- 1) Una hora antes de la recolección del material genético, se prepara una solución al 1% de hipoclorito de calcio, el agua utilizada en la solución tendrá que ser auto clavada y la solución tendrá que estar en un envase estéril.
- 2) Realizar la recolección del material genético (Flores, ápices), colocarlo en contenedores estériles con agua fría. La recolección se debe realizar con pinzas estériles. En el caso de tomar el material genético de flores fijarse en el estado de madurez es preferible recolectar las más cerradas.

b. Establecimiento

Este proceso consta de otros procesos los cuales son:

Desinfección:

- 1) Al recibir el material genético, botar el agua presente en el medio de recolección y al material vegetal enjuagarlo con agua destilada 3 veces, luego de esto pasarlas a un contenedor con la solución de hipoclorito de calcio.
- 2) Transferir el material vegetal a un nuevo contenedor de hipoclorito de calcio, asegurarse que el material vegetal este completamente cubierto por la solución. Esperar durante 20 minutos moviendo el recipiente cada 5 minutos.

- 3) Remover completamente el hipoclorito de calcio y enjuagar con agua destilada auto clavada, repetir el procedimiento 2 veces. Finalmente remover toda el agua del material vegetal.

Siembra:

- 1) Utilizando pinzas esterilizadas trasferir las flores hacia el plato Petri, no dejar más de 3 horas.
- 2) Con un bisturí estéril extraer las partes florales de las flores cerradas (las partes mas utilizadas son los estamoides y las bases de los pétalos). De los tallos tomar las partes apicales.
- 3) Trasferir las partes florales o ápices a un plato Petri que contenga el medio de crecimiento primario la cantidad de medio en el plato Petri es de 30-32 ml. Asegurarse que parte vegetal tenga contacto completo con el medio. Se recomienda poner 10 partes vegetales en caso de flores por medio y en caso de ápices 1 por medio.
- 4) Cerrar el medio con film plástico de manera doble.
- 5) Dejar reposar en lugar obscuro durante 15 días a una temperatura de 26-28C.

Transferencia:

- 1) Pasado los 15 días trasferir las partes florales al medio de crecimiento primario con pinzas y bisturíes estériles de manera que el medio y las partes vegetales tengan un contacto completo.
- 2) Cerrar el medio con film plástico de manera doble.
- 3) Dejar reposar en lugar obscuro durante 14 días a una temperatura de 26-28C (se podrá apreciar callos al final de este).
- 4) Luego de 14 días realizar monitoreo.

c. Multiplicación:

- 1) Cuando se observa la aparición de un callo, este se transfiere a una superficie estéril.

- 2) Se realiza el corte del callo en partes diferentes y se colocan los nuevos explantos en medios de crecimiento secundario, se colocan 10 plantas por medio, 30-32 ml.
- 3) Cerrar el medio con film plástico de manera doble.
- 4) Dejar reposar en lugar obscuro durante 15 días.
- 5) Pasado los 15 días observar el crecimiento individual de cada callo en distintas etapas o formas, realizar una nueva transferencia a medio de crecimiento secundario sellando el medio con film plástico y colocándolo en la obscuridad. Se realizará chequeo cada 14 días por un período aproximado de 6-8 semanas.
- 6) Cuando ya se note que el callo se encuentra maduro se realiza la transferencia a un medio de desarrollo. Cada 15 días realizar revisiones para proceder a una transferencia.

d. Enraizamiento:

- 1) A los 14 días se notará el crecimiento de una raíz.
- 2) Transferir las plántulas a medios de almacenamiento que tengan medios de enraizamiento con 130-140ml donde permitirá el crecimiento de la raíz para el siguiente paso (Maximova y Gultinan , 2010, pp 10-18)

3.4.3 Protocolo Biogreen C.A

a. Elección:

Se seleccionará material elite, elegidos de plantas madre previamente seleccionadas por el personal técnico de Biogreen C.A, por las características favorables de las mismas.



*Figura 16.*Planta de caca

Recolección:

- 1) Se prepara el material de recolección; esto es pinzas, medios de transporte (material pre esterilizado).
- 2) Realizar la recolección del material genético de las plantas pre seleccionado; una vez recogido el material genético, colocar en agua fría esterilizada que mantenga una temperatura aproximada de 12 a 15C°.



*Figura 17.*Flor de cacao

b. Establecimiento:

Va constar de varios procedimientos

Desinfección:

- 1) Al llegar el material genético (Flores) de campo, se retira el agua que transporte el mismo. Luego se realiza un enjuague con agua destilada tres veces por un periodo de 10 minutos cada vez. Dependiendo el grado de inocuidad del material genético se podrá utilizar sulfato de cobre 5% del volumen total de la solución o fungicidas varios. Mantener el material genético en el agua destilada luego del proceso y de inmediato llevarla a la cámara de flujo laminar (Previamente esterilizada).



- 2) En la cámara de flujo laminar realizar dos lavados moviendo el contenedor donde se encuentre el material genético (flores) con alcohol al 70% por 12 minutos cada lavado. Terminado el lavado con alcohol realizar un último lavado con cloro líquido por un período de 12 minutos. Enjuagar finalmente con agua destilada.



Figura 19. Lavado final de explantos.

Siembra:

- 1) Con pizas estériles coger el material genético (flores) y colocarlo en un plato Petri.
- 2) En el plato Petri realizar el corte de la flor con un bisturí estéril de tal manera que se pueda obtener el ó los estamoides y bases de pétalos.
- 3) Colocar el explanto en un plato Petri estéril. Colocar el material genético (flores) dentro del envase (Material exclusivo Biogreen C.A) que contenga el medio de crecimiento primario (B1 o B2) a utilizar, debe haber una cantidad de medio de 35-50 ml donde se colocarán 10 flores por medio. Hay que mantener el mayor cuidado posible al momento de realizar la siembra ya que es donde se produce el mayor índice de contaminación.
- 4) Cerrar el medio con film plástico de manera doble.
- 5) Colocar el medio con el explanto en el lugar (Cámara de crecimiento adecuada) obscuro a una temperatura de 26-28 C°, por un período de 15 días.



Figura 20. Siembra Explantos

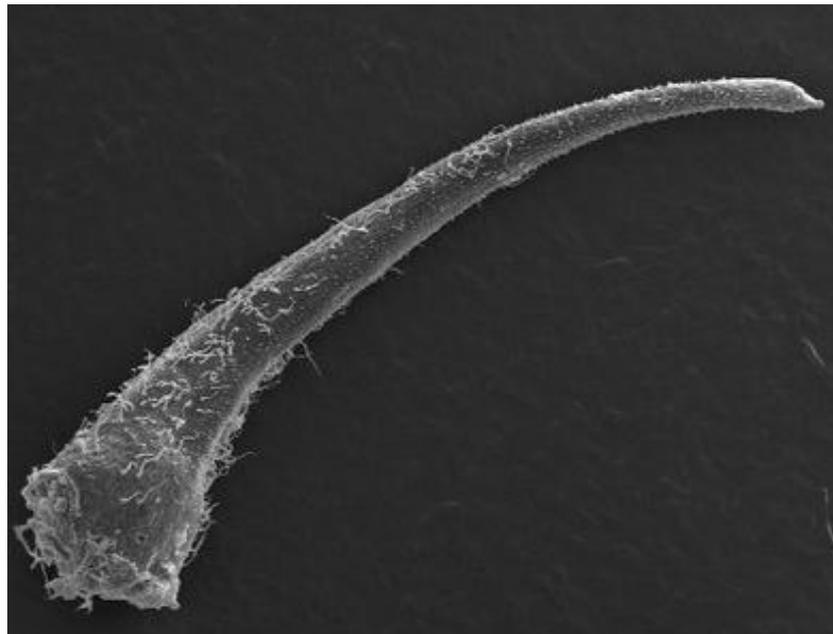


Figura 21. Mira microscópica de stamoide de siembra
Tomado de : Maximova Siela, 2010, Integrated System for Vegetativ Propagation of Cacao.



Figura 22. Explantos sembrados en medios B1, B2 y T1. En cámara oscura.



Figura 23. Cámara de maduración de medios

Trasferencia:

- 1) Se realiza una inspección visual del medio (B1 o B2) de manera externa cada 15 días, y se irá documentando los datos del presente proyecto.
- 2) Cogemos el medio (B1 o B2) de la cámara oscura (Cámara de crecimiento) y llevamos el medio hacia la cámara de flujo laminar.
- 3) En la cámara de flujo de laminar, quitamos el film plástico del medio de cultivo (B1 o B2), abrimos de la manera mas cuidadosa procurando que nada vaya sobre ella.
- 4) Sacar del medio de cultivo (B1 o B2) los explantos, así en una superficie estéril de preferencia vidrio, y con un bisturí estéril eliminar las partes que se encuentren de más y no tengan potencial genético.
- 5) Colocar el material genético en el nuevo medio (B1 o B2) de cultivo con pinzas estériles. Cerrar el medio (B1 o B2) de cultivo.
- 6) Colocar film plástico en el medio de cultivo.
- 7) Colocar en cámara oscura (Cámara de crecimiento) durante un período de 15 días a una temperatura de 26-28 C°. Para este momento ya tendrá que haber aparecido callos en el medio (B1 o B2) de cultivo.
- 8) Realizar un monitoreo continuo cada 15 días.



Figura 24. Revisión semanal de tratamientos



c) Multiplicación:

- 1) Cuando la aparición de callo ocurra, este se transfiere a una superficie estéril.
- 2) Con un bisturí estéril se procederá al corte del callo dejando el material genético que sirva y eliminando aquel que no tiene potencial, el material genético que sirva se colocará en un medio de crecimiento secundario (BS), mediante el uso de pinzas estériles, un máximo de 10 callos por medio con un contenido de 35 a 40 ml.
- 3) Se procede a cerrar el medio (BS) con film plástico para evitar el ingreso de patógenos.
- 4) Dejar los medios (BS) en la cámara de crecimiento oscura por un periodo de 15 días.
- 5) Finalizados los 15 días se puede apreciar el desarrollo individual de cada

callo, se realizará la transferencia a un medio de crecimiento secundario (BS) cada 15 días, con el fin que los callos se encuentren siempre en un medio nutritivo, esto tendrá una duración de 8 semanas. Los medios transferidos tendrán que ser puestos en la oscuridad y monitoreados cada 15 días donde se realiza la transferencia, esto puede ser por un período de tiempo aproximado de 12 meses a partir de la siembra.

- 6) Se notará la aparición de un explanto aproximadamente a las 8 semanas en el medio de crecimiento secundario, a partir de la transferencia al mismo, entonces se llevará a los explantos a un medio de desarrollo (BD), ésta etapa podrá durar aproximadamente de 24 a 28 semanas. Se tendrá que realizar transferencias a un medio nuevo cada 15 días hasta la aparición de raíz.

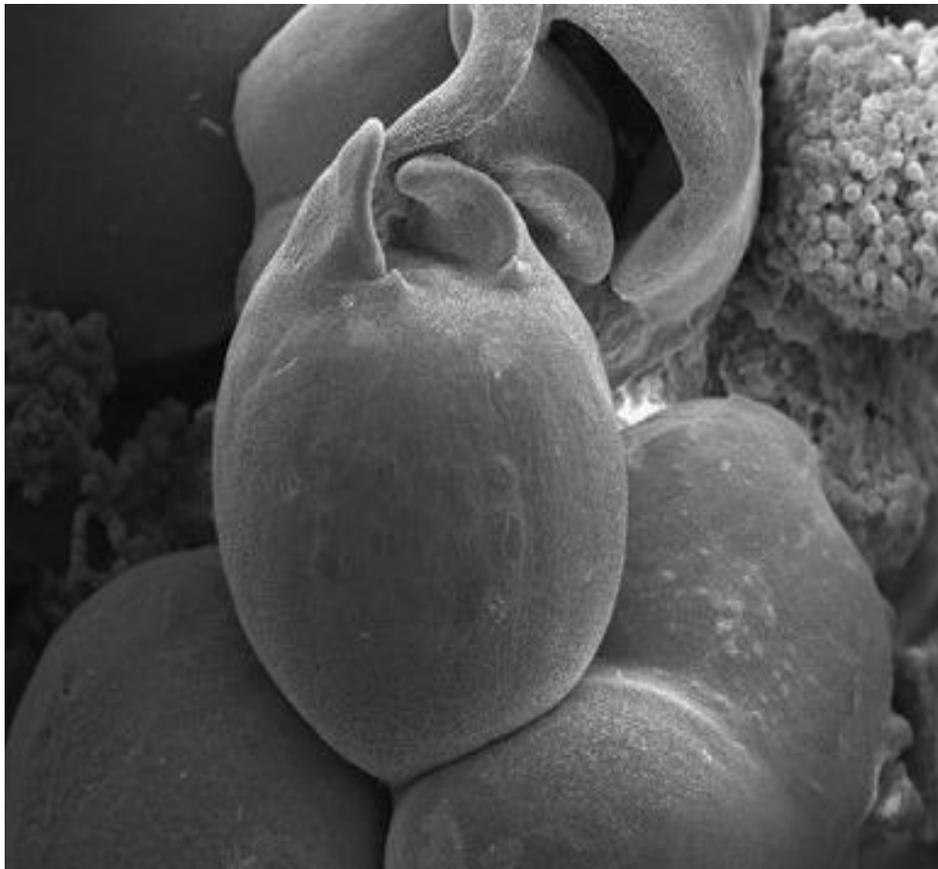


Figura 26 Etapa globular de callo

Tomado Maximova Siela, 2010, Integrated System for Vegetative Propagation of Cacao

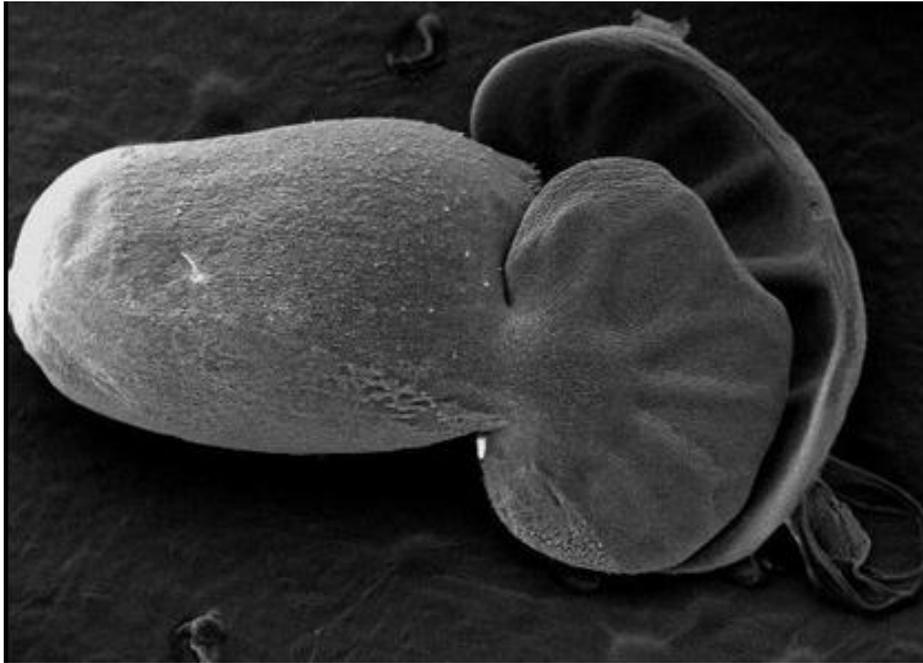


Figura 27. Etapa torpedo de callo

Figura. Maximova Siela, 2010 Integrated System for Vegetative Propagation of Cacao.



Figura 28. Callos maduros en medio



Figura 29. Corte de callos maduros

c. Enraizamiento

- 1) A los 14 días los explantos darán inicio a una pseudo raíz, lo cual le va conferir el nombre de plántula a los explantos.
- 2) Trasferir las plántulas a medios de almacenamiento que tengan medios de enraizamiento con 130-140ml, el cual permitirá el crecimiento de la raíz para el siguiente paso.

3.4.4 Programa de monitoreo

El programa de monitoreo de manera semanal, tuvo una duración de 14 semanas tratando de fijarse en las especificaciones del método utilizado, ya que aquí se encuentra indicadores donde nos puntualizaremos.

Tabla 22:

Registro semanal Inicio y Final

Fecha	Tratamiento	# Medio de tratamiento	Vivos	Contaminados	Muertos	Callo	
16/12/11 Inicio	T1	1	10				
		2	10				
		3	10				
	B1 (X3)	1	10				
		2	10				
		3	10				
	B2 (M2)	1	10				
		2	10				
		3	10				
23/03/12 Finalización	T2	1	TERMINADO				
		2	TERMINADO				
		3	TERMINADO				
	B1 (MCO)	1	TERMINADO				
		2				2	
		3				5	
	B2 (MCO)	1	TERMINADO				
		2	TERMINADO				
		3			1	4	

4 .RESULTADOS

4.1 Resultados de programa de monitoreo semana a semana

En el presente proyecto de titulación se realizo monitores semana a semana con el fin obtener datos objetivos planteados. En la tabla a continuación se presenta el monitoreo completo realizado en las 14 semanas de la duración del proyecto.

Tabla 23:
Registro semanal de investigación.

Fecha	Tratamiento	# Medio de tratamiento	Vivo	Contaminado	Muerto	Callo
16/12/11	T1	1	10			
		2	10			
		3	10			
	B1 (X3)	1	10			
		2	10			
		3	10			
	B2 (M2)	1	10			
		2	10			
		3	10			
23/12/11	T1	1	10			
		2	10			
		3	10			
	B1 (X3)	1	10			
		2	10			
		3	10			
	B2 (M2)	1	10			
		2	10			
		3	10			

(Continua)

Tabla 23:
Continuación

Fecha	Tratamiento	# Medio de tratamiento	Vivo	Contaminado	Muerto	Callo
30/12/11 TRANSFERENCIA	T1	1		10		
		2		10		
		3	10			
	B1 (X3)	1		10		
		2	6			4
		3	4			6
	B2 (M2)	1		10		
		2	4			6
		3				10
06/01/12	T1	1	TERMINADO			
		2	TERMINADO			
		3	2			8
	B1 (X3)	1	TERMINADO			
		2	4			6
		3	2			8
	B2 (M2)	1	TERMINADO			
		2	4			6
		3				10
13/01/12 TRANSFERENCIA	T2	1	TERMINADO			
		2	TERMINADO			
		3	2			8
	B1 (X3 AG)	1	TERMINADO			
		2			4	6
		3	2		4	4
	B2 (X3AG)	1	TERMINADO			
		2			8	2
		3			2	8

(Continua)

Tabla22:
Continuación

Fecha	Tratamiento	# Medio de tratamiento	Vivos	Contaminado	Muerto	Callo
20/01/12	T2	1	TERMINADO			
		2	TERMINADO			
		3			8	2
	B1 (X3AG)	1	TERMINADO			
		2			6	4
		3			4	6
	B2 (X3AG)	1	TERMINADO			
		2			8	2
		3			2	8
27/01/12 TRANSFERENCIA	T2	1	TERMINADO			
		2	TERMINADO			
		3				2
	B1 (X3AG)	1	TERMINADO			
		2				4
		3				6
	B2 (X3AG)	1	TERMINADO			
		2				2
		3				8
03/02/12	T2	1	TERMINADO			
		2	TERMINADO			
		3				2
	B1 (X3AG)	1	TERMINADO			
		2				4
		3				6
	B2 (X3AG)	1	TERMINADO			
		2				2
		3				8

(Continua)

Tabla 22:
Continuación

Fecha	Tratamiento	# Medio de tratamiento	Vivos	Contaminado	Muerto	Callo
10/02/12 TRANSFERENCIA	T2	1	TERMINADO			
		2	TERMINADO			
		3				2
	B1 (X3AG)	1	TERMINADO			
		2				4
		3				6
	B2 (X3AG)	1	TERMINADO			
		2			2	
		3				8
17/02/12	T2	1	TERMINADO			
		2	TERMINADO			
		3				2
	B1 (X3AG)	1	TERMINADO			
		2			1	3
		3			1	5
	B2(X3AG)	1	TERMINADO			
		2	TERMINADO			
		3			3	5
24/02/12 TRANSFERENCIA	T2	1	TERMINADO			
		2	TERMINADO			
		3				2
	B1(X3AG)	1	TERMINADO			
		2				3
		3				5
	B2(X3AG)	1	TERMINADO			
		2	TERMINADO			
		3				5

(Continua)

Tabla 22:
Continuación

Fecha	Tratamiento	# Medio de tratamiento	Vivos	Contaminado	Muerto	Callo
02/03/12	T2	1	TERMINADO			
		2	TERMINADO			
		3				2
	B1 (X3AG)	1	TERMINADO			
		2				3
		3				5
	B2(X3AG)	1	TERMINADO			
		2	TERMINADO			
		3				5
09/03/12T TRASFERENCIA	T2	1	TERMINADO			
		2	TERMINADO			
		3			2	
	B1 (X3AG)	1	TERMINADO			
		2			1	2
		3				5
	B2(X3AG)	1	TERMINADO			
		2	TERMINADO			
		3				5
16/03/12	T2	1	TERMINADO			
		2	TERMINADO			
		3	TERMINADO			
	B1 (X3AG)	1	TERMINADO			
		2				2
		3				5
	B2(X3AG)	1	TERMINADO			
		2	TERMINADO			
		3			1	4

(Continúa)

Tabla22:
Continuación

Fecha	Tratamiento	# Medio de tratamiento	Vivos	Contaminado	Muerto	Callo
23/03/12 TRASFERENCIA FINAL	N/A	1	TERMINADO			
		2	TERMINADO			
		3	TERMINADO			
	B1 (MCO)	1	TERMINADO			
		2				2
		3				5
	B2 (MCO)	1	TERMINADO			
		2	TERMINADO			
		3			1	4

4.2 Formación de callo.

La presente investigación busca encontrar el procedimiento in vitro para multiplicación de cacao CCN-51. El éxito en la multiplicación in vitro se alcanza al momento que se obtiene la formación de callo de los explantos en el medio de crecimiento. Por este motivo, en base a los registros obtenidos se realizará una comprobación de varianzas y pruebas de medias en el caso de ser la hipótesis rechazada.

Inicialmente se colocó en 3 medios de cultivo de iniciación (T1, B1, B2) 10 explantos por medio, los explantos que sobrevivían siguen el proceso in vitro hasta el punto de multiplicación.

Se tomarán en cuenta 2 fechas cruciales en la presente investigación, 27/01/12 que es cuando los explantos son colocados en un medio secundario y 23/03/12 es cuando la investigación culmina y los callos ya multiplicados son colocados en el medio de desarrollo.

4.2.1 Traslado a medio secundario 27/01/12

En base a los datos obtenidos de los medios de cultivo el día 27/01/12, se puede obtener resultados iniciales del procedimiento de multiplicación in vitro, los callos obtenidos en este punto son callos iniciales ya que estos tienen que atravesar algunas etapas, hasta ser callos viables para la transferencia a un medio de desarrollo

Tabla 24:

Resumen supervivencia de callos 27/01/12

Medios	Tratamientos		
	T1	B1	B2
1	0	0	0
2	0	4	2
3	2	6	8

Se realiza una prueba de análisis de varianza (ANOVA) con el fin de comprobar la hipótesis:

H₀: Todos los tratamientos son iguales

H_A: Por lo menos un tratamiento es diferente.

Tabla 25:

ANOVA supervivencia de callos 27/01/12

FV	SC	GL	CM	F0	Valor-p
Tratamientos	14.22	2	7.11	0.76	0.507
Error	56	6	9.33		
Total	70.22	8			

No hubo diferencias significativas en las medias (valor $p > 0.05$), por lo tanto se rechaza la hipótesis alternativa; es decir todos los procesos de multiplicación de tejidos son iguales.

4.2.2 Traslencia a medio de desarrollo

Una vez que ya los callos hayan pasado las distintas etapas de maduración estos se consideran maduros y son trasladados a un medio de desarrollo. En el presente proyecto los únicos procedimientos in vitro que alcanzaron este punto son B1 y B2.

Tabla 26:

Resumen supervivencia callos. Traslencia medio desarrollo

Medios	Tratamientos		
	T1	B1	B2
1	0	0	0
2	0	2	0
3	0	5	4

Tabla 27:

Índice producción de callo al final de la investigación.

Índice producción de callos		
T1	B1	B2
0%	23.33%	13.33%

Se realiza una prueba de análisis de varianza (ANOVA) con el fin de comprobar la hipótesis:

H0: Todos los tratamientos son iguales

HA: Por lo menos un tratamiento es diferente.

Tabla 28:

ANOVA supervivencia de callos. Traslencia medio de desarrollo

FV	SC	GL	CM	F0	Valor-p
Tratamientos	8.22	2	4.11	1.06	0.404
Error	23.22	6	3.89		
Total	31.56	8			

No hubo diferencias significativas en las medias (valor $p > 0.05$), por lo tanto se rechaza la hipótesis alternativa; es decir todos los procesos de multiplicación de tejidos son iguales.

Más adelante se aplicara una prueba CHI cuadrado para comprobar la igualdad. Ya que los índices porcentuales muestran diferencias entre los tratamientos.

4.3 Explantos contaminadas

Un explanto se puede considerar que está contaminado cuando éste es atacado por patógenos, puede ser el caso de bacterias y hongos. Esto puede ser causado por múltiples razones como asepsia al momento de siembra en el medio, el explanto proviene de una madre que ésta infectada de algún patógeno, malas prácticas de desinfección. Biogreen C.A cuenta con un protocolo que garantiza el 95% de todos los medios realizados en Biogreen no cuente con contaminación.



*Figura 30.*Contaminación bacteriana



A continuación se presenta el resumen global de los procedimientos aplicados en los medios, durante toda la presente investigación.

Tabla 29:

Resumen contaminación medios.

Medios	Tratamientos		
	T1	B1	B2
1	10	10	10
2	10	0	0
3	0	0	0

Tabla 30:

Índice de explantos contaminados final de la investigación

Índice Explantos contaminados		
T1	B1	B2
67%	33.33%	33.33%

Se realiza una prueba de análisis de varianza (ANOVA) con el fin de comprobar la hipótesis:

H0: Todos los tratamientos se contaminan.

HA: Por lo menos un tratamiento no se contamina

Tabla 31:

ANOVA contaminación medios.

FV	SC	GL	CM	F0	Valor-p
Tratamientos	22.2	2	11.1	0.33	0.729
Error	200	6	33.3		
Total	222.2	8			

No hubo diferencias significativas en las medias (valor $p > 0.05$) ya que el valor p es menor al intervalo de confianza, por lo tanto se rechaza la hipótesis alternativa; es decir todos los tratamientos son contaminados.

Más adelante se aplicará una prueba CHI cuadrado para comprobar la igualdad.. Ya que los índices porcentuales muestran diferencias entre los tratamientos. Se realiza mas adelante prueba por el hecho que ente momento se están corriendo pruebas paramétricas y la prueba CHI Cuadrado es una prueba no paramétrica y necesita una tabla de distribución de tratamientos.

4.4 Explantos muertos

Un explanto se considera muerto cuando se encuentra seco por falta de hormonas o humedad relativa (esto puede ocurrir en cualquier etapa).

Los resultados se basaran en los resultados globales obtenidos al final de la presente investigación.

Tabla 32:

Resumen de explantos muertos.

Medios	Tratamientos		
	T1	B1	B2
1	0	0	0
2	0	8	10
3	10	5	6

Tabla 33:

Índice de explantos muertos al final de la investigación.

Índice Explantos Muertos		
T1	B1	B2
33%	43.33%	53.33%

Se realiza una prueba de análisis de varianza (ANOVA) con el fin de comprobar la hipótesis:

H₀: En todos los tratamientos mueren explantos

H_A: En por lo menos un tratamiento no mueren los explantos.

Tabla 34:

ANOVA Explantos muertos

FV	SC	GL	CM	F0	Valor-p
Tratamientos	6	2	3	0.12	0.889
Error	150	6	25		
Total	156	8			

No hubo diferencias significativas en las medias (valor $p > 0.05$) ya que el valor p es menor al intervalo de confianza, por lo tanto se rechaza la hipótesis alternativa; es decir en todos los procesos de multiplicación de tejidos mueren los explantos en algún punto del proceso.

Más adelante se aplicará una prueba CHI cuadrado para comprobar la igualdad.. Ya que los índices porcentuales muestran diferencias entre los tratamientos. Se realiza mas adelante prueba por el echo que ente momento se están corriendo pruebas paramétricas y la prueba CHI Cuadrado es una prueba no paramétrica y necesita una tabla de distribución de tratamientos.

4.5 Aparición del primer callo en días.

Ya que el tiempo de obtención de callo en la multiplicación de tejidos es un factor importante se tomo en cuenta para la evaluación de resultados. Ya que si un callo se obtiene de manera mas apresurada se puede considerar hacer cambios en un futuro en ciertas partes del tratamiento in vitro aplicado

Los resultados son tomados en base al número de días necesarios para aparezca el callo en el medio dentro del tratamiento.

Tabla 35:

Número de días para aparición de primer callo.

Medios	Tratamientos		
	T1	B1	B2
1	0	0	0
2	0	15	15
3	21	15	15

Se realiza una prueba de análisis de varianza (ANOVA) con el fin de comprobar la hipótesis:

H0: En todos los tratamientos se producen callos antes de los 30 días

HA: Por los menos un tratamiento produce callo después de los 30 días.

Tabla 36:

ANOVA Número de días para aparición de primer callo.

FV	SC	GL	CM	F0	Valor-p
Tratamientos	2	18	9	0.09	0.914
Error	6	594	99		
Total	8	612			

No hubo diferencias significativas en las medias (valor $p > 0.05$) ya que el valor p es menor al intervalo de confianza, por lo tanto se rechaza la hipótesis alternativa; es decir en todos los tratamientos se producen callos antes de los 30 días.

Lo que se puede apreciar es que los 2 tratamientos B1 y B2 muestran unos 7 días de adelanto a la obtención de callo.

4.6 Prueba de igualdad de hipótesis no paramétrica CHI cuadrado

Dado que el p valor es mayor al nivel de significancia del 5% en las pruebas de igualdad de medias ANOVA en las tablas 63, 66,69 se concluye que no existe suficiente evidencia estadística para rechazar la hipótesis nula de supervivencia de callos, explantos contaminados y explantos muertos, con este resultado no se está afirmando o aceptando la hipótesis nula, sino que no se puede determinar con la muestra actual el rechazo de la hipótesis nula.

Por otro lado, al observar los índices (porcentuales) se puede notar una clara diferencia en los tratamientos por resultado obtenido.

Por este motivo se procederá a realizar un contraste de hipótesis donde no solo considere el parámetro porcentaje de callos sino más bien la distribución de los resultados por tratamiento.

Para esto se aplica la prueba no paramétrica de homogeneidad CHI cuadrado, donde se contrasta lo siguiente

Tabla37:

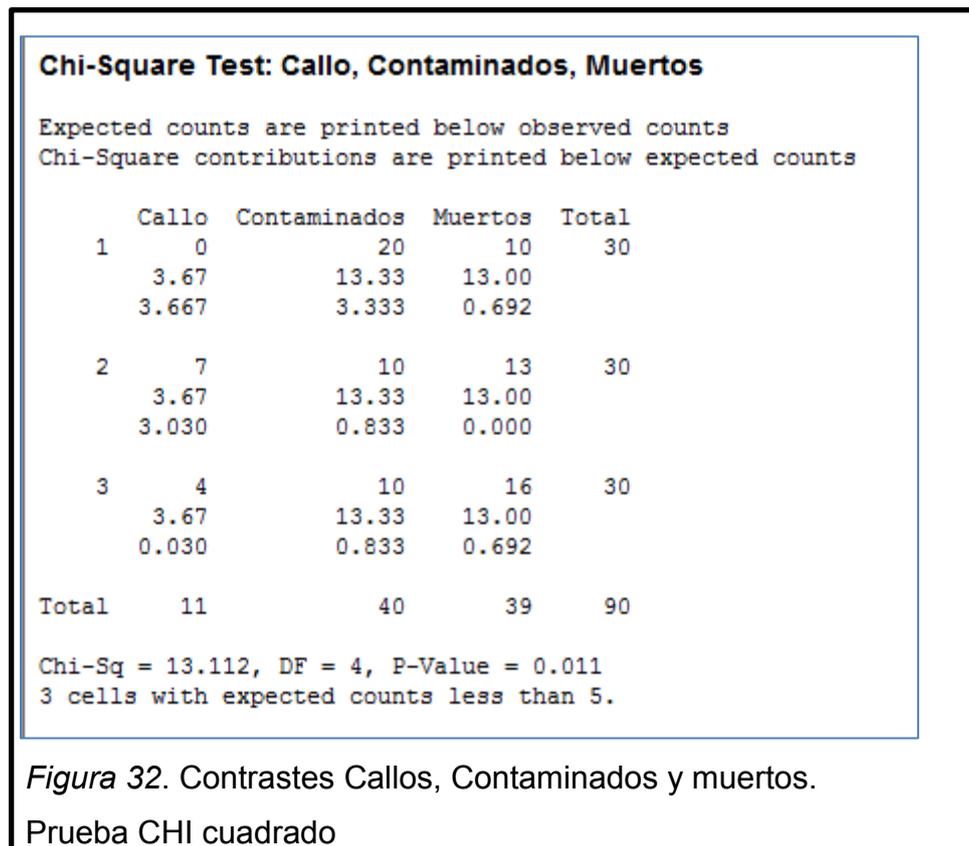
Tabla de distribución de tratamientos

Tratamientos	CATEGORIAS			Total
	Callo	Contaminados	Muertos	
T1	0	20	10	30
B1	7	10	13	30
B2	4	10	16	30

Ho: la distribución de los resultados por tratamiento son iguales

Vs.

Ha: Al menos una de las distribuciones de los tratamientos difiere entre ellas.



Se rechaza la hipótesis nula con un P valor de 0.011 es decir hay suficiente evidencia estadística para rechazar que la distribución de los resultados para cada procedimiento difiere.

Basándose en este resultado que establece la diferencia entre los tratamientos y en los índices por tratamiento en las tablas 62, 65 y 68. Se concluye que el

tratamiento B1 es el mas viable con un índice de producción de callo de 23.33%, índice de contaminación de 33.33% y un índice de muerte de 43.33%.

5. DISEÑO DE PROPUESTA DE PLANTA DE MULTIPLICACIÓN IN VITRO

5.1 Infraestructura

Todo el material que se encuentra dentro de la planta de multiplicación in vitro, se tendrá que manejar de la manera más aséptica posible, en especial en el área donde se encuentran las cámaras de flujo laminar y el cuarto de crecimiento obscuro, ya que es el lugar donde se encuentran las plantas y donde se presenta el mayor riesgo.

No se va a permitir el paso a personal ajeno a Biogreen cia Ltda; sobre todo si no cuentan con la vestimenta adecuada para prevenir la contaminación dentro de la planta de Biogreen C.A.

Todo el material de superficies, como es el caso de superficies de trabajo, serán de material no poroso como acero inoxidable. De esta manera se evitará la contaminación dentro del laboratorio.

5.2 Localización de la planta

La nueva planta de Biogreen C.A debe ser construida donde Biogreen C.A se encuentra ubicada actualmente, con el fin de eliminar el costo de compra de un predio, ya que la hacienda Aispur cuenta con el espacio suficiente para la construcción de una planta de producción meristemática.

5.3 Fundamentos generales

La planta se construirá en un área de 41 X 18 metros cuadrados, las áreas de trabajo de la planta serán distribuidas de tal manera, que el trabajo se realice más eficientemente y sin ningún retroceso en lo posible, con el fin de eliminar la contaminación que se podría encontrar.

Los materiales para la construcción en sí, serán adecuados para una planta de

producción in vitro, los cuales deberán prevenir la contaminación dentro de la planta.

5.4 Techo e iluminación

Los techos de la planta serán planos, lisos e inclinados. En los lugares donde se presenten uniones, estas tendrán que ser curvados y cerrados herméticamente. El material a ser utilizado podrá ser cualquier resina reforzada con el fin de que no se produzca el desarrollo de mohos.

Se necesita una iluminación en especial en la zona de siembra, ya que además de la luz brindada por la cámara de flujo laminar, ésta tendrá que ser complementada con luz artificial, por el motivo que en esta zona no se cuenta con ventanas, para reducir al máximo el peligro de contaminación. En la zona de desarrollo de las plantas para prevenir contaminación tampoco se cuenta con ventanas, únicamente se contará con iluminación artificial (Sylvania daylithe) ya que, de esta manera se podrá controlar el desarrollo de la planta, pues en la cámara de desarrollo hay una parte de la misma que se puede usar como cámara oscura con el fin de economizar costos.

5.5 Paredes

Las paredes que se encuentren en el camino de la línea de producción serán de materiales que no sean porosos, con el fin que éstos no se conviertan en focos de contaminación. Lo que es el cuarto de desarrollo son paredes especiales hechas para la regulación de la temperatura, que así sea óptima para el crecimiento de la planta.

5.6 Pediluvios

Se localizará en la entrada de la planta de multiplicación in vitro y en cada ingreso a lo que fuera el proceso de producción de las plantas. Esto se hará en una solución de sulfato de cobre en un proporción del 5%.

5.7 Suelos

Tendrán que ser suelos que no cuenten con grietas o imperfecciones, para que no se produzcan focos de contaminación, preferiblemente tendrán que ser pintados con una resina antideslizante que sea de fácil limpieza.

5.8 Ventilación

Será controlada mediante un sistema de membranas que emularán a una cámara de flujo laminar esto con el fin de eliminar cualquier contaminante en el aire. También se contará con un sistema de ventiladores especialmente en las cámaras de desarrollo donde expulsen el aire y ingrese aire puro.

5.9 Layout

Es la distribución de la planta de acuerdo con las funciones para que de esta manera se pueda visualizar las actividades de la empresa de manera global.



Figura 33. Layout por actividades.

5.10 Planta en general

La distribución de la planta incluyendo pasillos y áreas dentro de la empresa. La nueva propuesta de planta de Biogreen C.A permite que se llegue a una mayor producción de plantas para vivero.

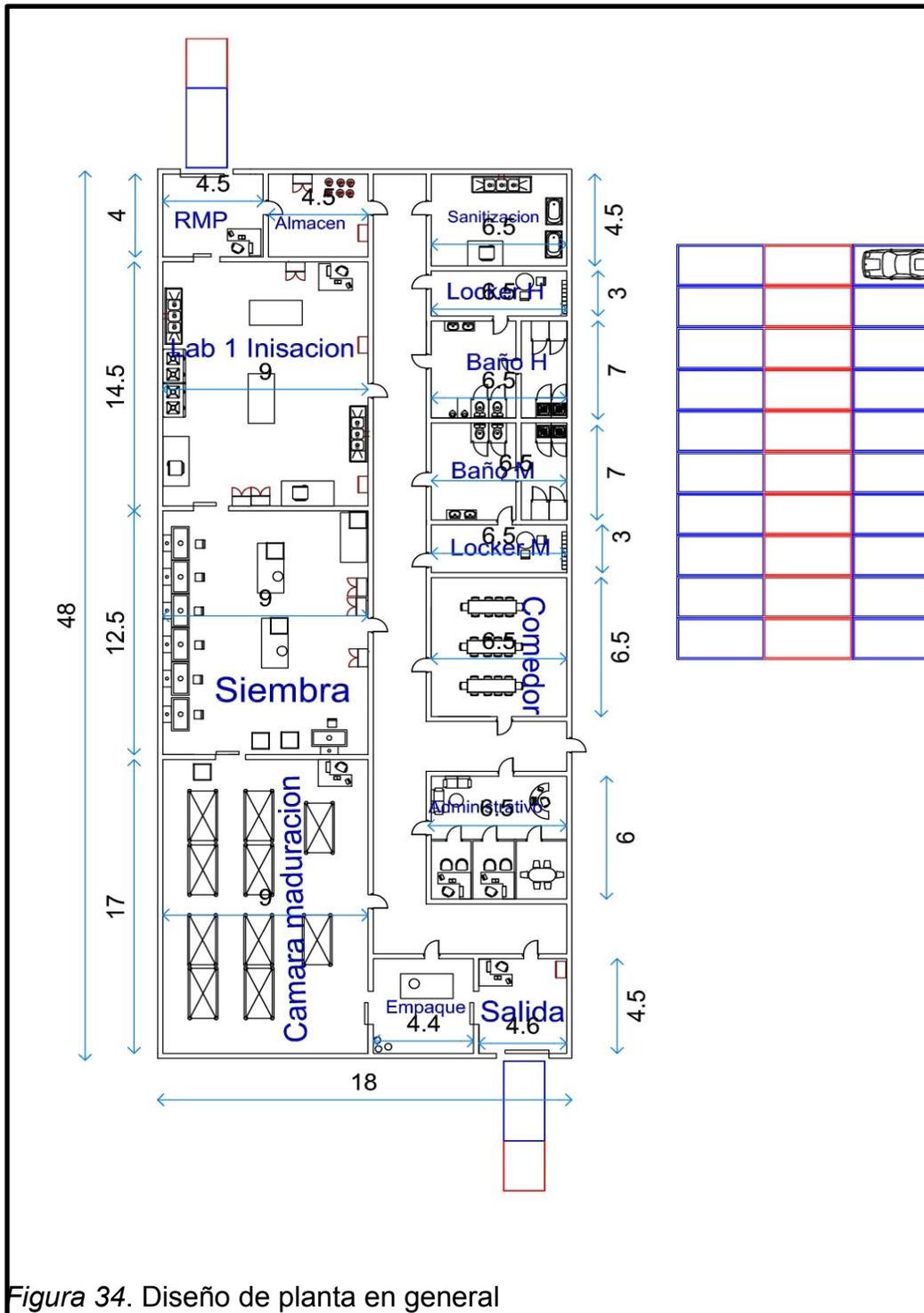


Figura 34. Diseño de planta en general

5.11 Flujo de producto

Es el flujo de producto dentro del layout de planta, para que de esta manera se pueda tener una visualización global de como un producto se mueve dentro de una planta.

Siempre tendrá que ser suave y rápido con el mínimo gasto de tiempo de los trabajadores. De manera que no existan retrocesos de ninguna especie.

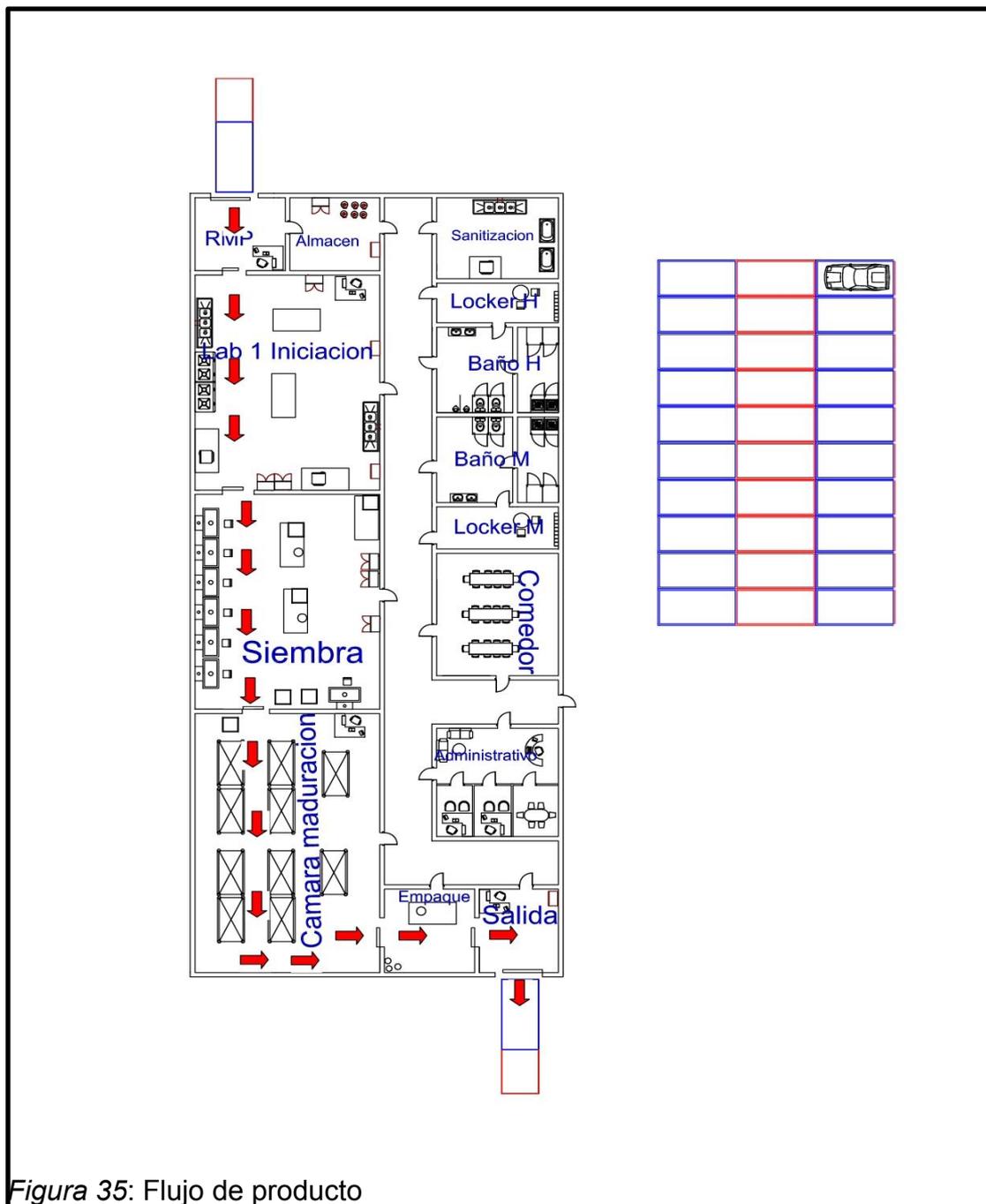


Figura 35: Flujo de producto

5.12 Flujo de personal

Es la manera como se mueve el personal dentro del layout de la planta. Tiene que seguir una secuencia adecuada con la mínima cantidad de retrocesos de esta manera prevendrá la contaminación en los medios.

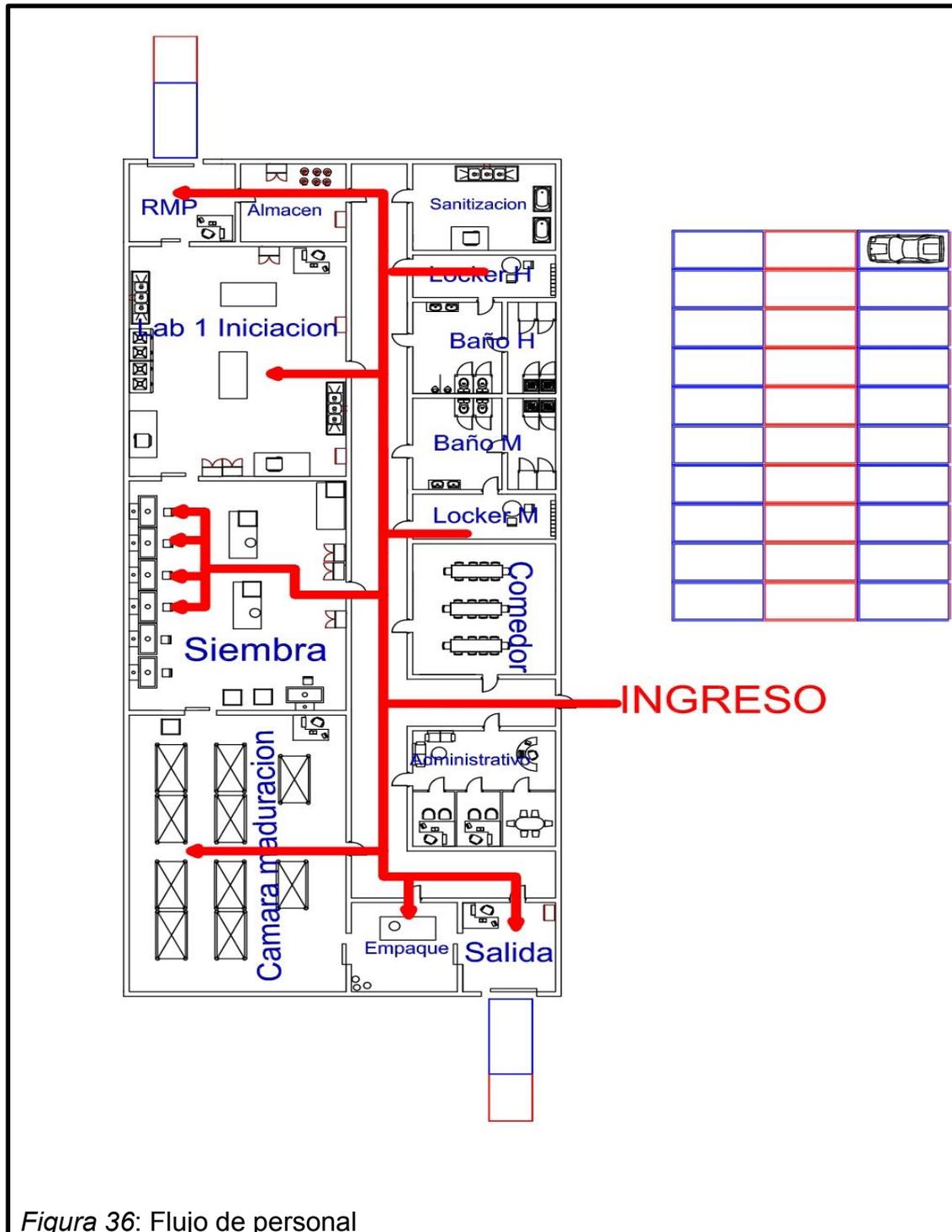


Figura 36: Flujo de personal

6. PLAN FINANCIERO

6.1 Introducción

El presente plan financiero está conformado por dos opciones útiles para Biogreen C.A ya que la misma es una empresa consolidada. El primer plan financiero se lo realizó sin tomar en cuenta la construcción de la nueva planta de producción in vitro, sino que únicamente se tomó en cuenta lo que sería la adición del costo de la línea de cacao a su operación actual. La segunda se la hizo tomando en cuenta la construcción de la nueva planta in vitro y la adición de costos de la línea actual.

La línea de cacao adicionada es resultado de la investigación de la presente tesis la cual nos indica que el mejor medio de cultivo para cacao in vitro es el medio B1 (X3) de la empresa Biogreen C.A.

6.2 Plan financiero para adición de nueva línea para cacao in vitro CCN-51

El medio que mostro mejores resultados en la presente investigación fue el B1(X3) y los medios que le seguían, es por ese motivo que se realizará un costeo y un análisis financiero del mismo. Hay que tomar en cuenta que en el plan financiero de la adición de una nueva línea in vitro, en este caso de cacao CCN-5, no se toma en cuenta inversiones ya que, inversión en obras físicas no se ve reflejado por el hecho que ya existe Biogreen C.A. Inversión de maquinarias y equipos no se ve reflejada por el hecho que se vaya a correr una nueva línea pues, no existe diferencia en la maquinaria utilizada en la misma.

6.2.1 Costo de fabricación.

Para la presente investigación se va suponer que se va realiza un 1litro de B1 (X3), 1 litro de BS (X3 AG) y 1 litro de BD (MCO); por sigilo corporativo se dará los costos directos de cada fórmula madre (20X, 100X, 1000X, Quelato, BA) en lugar de desglosar los costos de cada fórmula madre ya que esto sería divulgar

el contenido de cada una. Por cada litro de medio de B1 (X3), BS (X3 AG) y BD (MCO) se obtendrá 22 medios donde se puede colocar individuos, esto quiere decir que se colocará 45ml por recipiente de medio.

Hay que tomar en cuenta dentro del costo de fabricación que, el personal no va a dedicar su tiempo en la totalidad para la producción de cacao CCN-51 ya que la producción de otras especies vegetales también tiene gran importancia para Biogreen C.A.

6.2.1.1 Requerimientos de materias primas

Para los costos de fabricación se tomarán en cuenta las materias primas directas, es decir, las soluciones que se incorporan al medio y no las soluciones madres por sigilo corporativo de Biogreen C.A. Estas soluciones madres están compuestas por elementos que tienen costos distintos.

Solución 20X

El costo que se tomó en cuenta para la elaboración de la solución 20X es el de 1l, la cual se desglosa en el uso individual de cada medio.

Tabla 38:

Costo de solución 20X

Costo Total solución	Medio	Uso ml	Costo unitario
5.98	B1 (X3)	50	0.29
	BS (X3 AG)	50	0.29
	BD (MCO)	50	0.29

Solución 100X

El costo que se tomó en cuenta para la elaboración de la solución 100X es de 1l, la cual se desglosa en el uso individual de cada medio.

Tabla 39:

Costo de solución 100X

Costo Total solución	Medio	Uso ml	Costo unitario
1.6	B1 (X3)	10	0.02
	BS (X3 AG)	10	0.02
	BD (MCO)	10	0.02

Solución 1000X

El costo que se tomó en cuenta para la elaboración de la solución 1000X es de 1l, la cual se desglosa en el uso individual de cada medio.

Tabla 40:

Costo de solución 1000X

Costo Total solución	Medio	Uso ml	Costo unitario
2.01	B1 (X3)	1	0.002
	BS (X3 AG)	1	0.002
	BD (MCO)	1	0.002

Solución Quelato

El costo que se tomó en cuenta para la elaboración de la solución Quelato es de 1l, la cual se desglosa en el uso individual de cada medio.

Tabla 41:

Costo de solución Quelato

Costo Total solución	Medio	Uso ml	Costo unitario
2.24	B1 (X3)	16.7	0.04
	BS (X3 AG)	16.7	0.04
	BD (MCO)	16.7	0.04

Solución fitohormonal 1 (Sigilo corporativo)

El costo que se tomó en cuenta para la elaboración de la Solución fitohormonal (Sigilo corporativo) es de 1l, la cual se desglosa en el uso individual de cada medio.

Tabla 42:

Costo Solución fitohormonal 1 (Sigilo corporativo)

Costo Total solución	Medio	Uso ml	Costo unitario
1.27	B1 (X3)	3	0.004
	BS (X3 AG)	3	0.004
	BD (MCO)	N/A	N/A

Azúcar

Cada medio cuenta con una cantidad específica de azúcar. Tomando en cuenta el valor del saco de 50kg actualmente.

Tabla 43:

Costo Azúcar

Costo 50 kg	Medio	Uso gr	Costo unitario
36	B1 (X3)	30	0.02
	BS (X3 AG)	30	0.02
	BD (MCO)	30	0.02

AGAR

Cada medio cuenta con una cantidad específica de agar, la cuenta se obtiene de la firma SIGMA.

Tabla 44:

Costo AGAR

Costo 5 kg	Medio	Uso gr	Costo unitario
1025	B1 (X3)	2	0.410
	BS (X3 AG)	2	0.410
	BD (MCO)	2	0.410

Solución fitohormonal 2 (Sigilo corporativo)

Cada medio cuenta con una cantidad específica de la solución AG3, la cual se desglosa de manera individual en cada medio, por costos se realiza pequeñas cantidades de este medio.

Tabla 45:

Costo Solución fitohormonal 2 (Sigilo corporativo)

Costo 10 ml	Medio	Uso gr	Costo unitario
344	B1 (X3)	N/A	
	BS (X3 AG)	1ml	34.4
	BD (MCO)	N/A	

Solución Vitaminas

El costo que se tomó en cuenta para la elaboración de la solución Vitaminas es de 1l, la cual se desglosa en el uso individual de cada medio.

Tabla 46:

Costo de solución vitaminas

Costo Total solución	Medio	Uso ml	Costo unitario
1.39	B1 (X3)	1	0.001
	BS (X3 AG)	1	0.001
	BD (MCO)	1	0.001

Myo-Inositol

Cada medio cuenta con una cantidad específica Myo-Inositol, el cual se obtiene de Sigma.

Tabla 47:

Costo Myo-Inositol

Costo 1kg	Medio	Uso mg	Costo unitario
442	B1 (X3)	0.1	0.044
	BS (X3 AG)	0.1	0.044
	BD (MCO)	0.1	0.044

H2O Destilada

El agua es la base para la formación de medios de cultivo.

Tabla 48:

Costo Agua Destilada

Costo 10 lt	Medio	Uso lt	Costo unitario
12	B1 (X3)	1	1.2
	BS (X3 AG)	1	1.2
	BD (MCO)	1	1.2

6.2.1.2 Requerimientos material físico medio

Por material físico se entiende el material donde se coloca al medio, para el cual Biogreen C.A cuenta con un amplio stock de los mismos. El medio físico no tiene variación más que en la etapa de enraizamiento, debido a esto en la presente tesis no se contemplará el tema.

El costo aproximado del material físico para colocar el medio es de \$0.03 centavos, no se puede brindar información muy a fondo del tema ya que es uno de los secretos empresariales de Biogreen C.A.

6.2.1.3 Requerimientos servicios auxiliares

Electricidad

Se considerará el 10% del rubro total el cual será para la nueva línea de cacao CCN51. Se utilizará un fluido eléctrico trifásico para el funcionamiento de los motores de los equipos seleccionados los cuales se muestran en la tabla 34.

Tabla 49:

Requerimientos eléctricos.

OPERACIÓN	NOMBRE	Cantidad	Consumo KWH	Consumo anual * KW	Valor KWH*	Valor total Consumo / h	Valor consumo anual
Siembra, transferencia, Desarrollo	Cámara de flujo laminar	7	28	81760	0.05	1.4	4088
Laboratorio	Autoclave, Refrigerador	2 1	2.28	5991	0.05	0.114	420
Crecimiento y desarrollo	Incubadora y cuarto de crecimiento	1(en el caso de Biogreen C.A los 2 forman 1	32.2	65800	0.05	1.61	4701.2
Base Industrial						0.2	584
TOTAL				153551	COSTO \$	3.324	9793.2

Seguridad Industrial

En el siguiente cuadro se va a detallar los equipos de seguridad industrial dentro en un año. Hay que notar que los mandiles, mascarillas y cofias del personal operativo son de tela y al comienzo del año se realiza una sola compra. Las mascarillas y cofias para visitantes se realizarán de material desechable y las compras se las hará mes a mes ya que Biogreen C.A no recibe visitantes a no ser estrictamente necesario. El costo aproximado que absorberá la producción de cacao CCN 51 es del 10%. Del costo total de los mismos

Tabla 50

Costos equipos seguridad industrial

RUBRO	PERIODOS												TOTAL LAE S
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
Mandiles	300	-	-	-	-	150	-	-	-	-	-	-	450
Guantes Quirúrgicos	150	150	150	150	150	150	150	150	150	150	150	150	1,800
Cofias	270	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	380
Mascarillas	300	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	520
Extintores	410	-	20	-	20	-	20	-	20	-	-	-	490
TOTAL	1,430	180	200	180	200	330	200	180	200	180	180	180	3,640

Mano de obra directa

Para la presente investigación se tomará en cuenta el 10% de los esfuerzos del personal de la planta de producción in vitro debido a que Biogreen, tiene ya su mercado garantizado en otros de sus productos estrellas, los mismos que presentan contrato de cumplimiento. En el proceso de multiplicación in vitro, intervendrá el siguiente personal:

- Un jefe de laboratorio

Cuyo perfil ocupacional será un profesional en el área de la biotecnología que tenga conocimientos del manejo de laboratorios así como de las normas de limpieza básicas del mismo. Debe tener la capacidad de ser líder de un grupo de personal y de coordinar actividades; además de tener plena capacidad del manejo de reactivos.

- 5 Obreros (Laboratorio vegetal)

Serán trabajadores no calificados a los que se les brindará capacitación sobre el manejo y actividades relacionadas a una cámara de flujo laminar para realizar multiplicación in vitro de distintos materiales vegetales; lo cual con la experiencia y manipulación irán mejorando sus actividades.

Tabla 51:

Requerimientos de mano de obra

PUESTO	N°	MESES	SALARIO MENSUAL	TOTAL
JEFE DE LABORATORIO	1	12	650	7800
OBREROS	5	12	377	17400
TOTAL ANUAL				23400

*Incluye cargas sociales

6.2.1.4 Resumen de costos de fabricación.

A continuación se podrá apreciar el costo de fabricación por medio B1 (X3), BS (X3 AG) Y BD (MCO). Los costos de fabricación se tomarán en cuenta para un litro de las soluciones mencionadas, las mismas que utilizaron un 10% de la capacidad ya instalada de la planta.

Costo de planta actual

Se consideran los servicios operativos de la planta actual donde vamos a encontrar suministros, seguridad industrial y sueldos con cargas sociales. de estos costos se le va cargar un 10% a la nueva línea de cacao CCN-51 el mismo que será repartido en las distintas por el presente proyecto de titulación únicamente esta establecido hasta el punto de multiplicación estos costos serán cargados en las etapas presentes.

Tabla 52:

Costo de planta actual

COSTOS FIJOS DE PLANTA			
SEGURIDAD Y SERVICIOS BASICOS (S y SS)			Total Usd año
Electricidad KWH			9793.2
Mantenimiento 10% de Equipos			3417
Limpieza			1200
Agua potable			91.25
Total Costo S y SS			14501.45
SEGURIDAD IND. Y SEGURO			
Seguridad Ind.			3640
Total Costo seguridad			3640
SUELDOS con cargas sociales	Cantidad	Costo/ Unidad	
Jefe de laboratorio	1	500	6000
Operativos	5	290	17400
Total Costo sueldos			23400
			TOTAL COSTO FIJO PLANTA AÑO
			41541.5
			PLANTA COSTO PARA CACAO (10%)
			4154.15
			COSTOS DE PLANTA POR MEDIO (1/3)
			1384.72

X3

Tabla 53:

Costos solución X3

MATERIAS PRIMAS				
Materias directas e indirectas	unidad	Cantidad	Costo para 1l (=22m)	Costo para 12l en un año (= 264m)
Solucion 20 X	ml	50	0.29	3.48
Solucion 100 X	ml	10	0.02	0.24
Solucion 1000 x	ml	1	0.002	0.024
Solucion KELATO	ml	16.7	0.04	0.48
Solucion BA	ml	3	0.004	0.048
Azucar	gr	30	0.02	0.24
Solucion AG3	ml		N/A	0
Agar	gr	2	0.41	4.92
Solucion Vitaminas	ml	1	0.001	0.012
Myo- Inositol	mg	0.1	0.04	0.528
H2O Destilado	lt	1	1.20	14.4
Total Costo 1			2.031	24.4
			COSTO DE FABRICACION ANUAL	1409.09
			Costos 1 callos (10 callos por medio)	0.53
			Costo planta (20 plantas por callo)	0.03

X3 AG

Tabla 54:

Costos solución X3AG

MATERIAS PRIMAS				
Materias directas e indirectas	unidad	Cantidad	Costo para 1l (=22m)	Costo para 12l en un año (= 264m)
Solucion 20 X	ml	50	0.29	3.48
Solucion 100 X	ml	10	0.02	0.24
Solucion 1000 x	ml	1	0.002	0.02
Solucion KELATO	ml	16.7	0.04	0.48
Solucion BA	ml	3	0.004	0.05
Azucar	gr	30	0.02	0.24
Solucion AG3	ml	1	34.40	412.80
Agar	gr	2	0.41	4.92
Solucion Vitaminas	ml	1	0.001	0.01
Myo- Inositol	mg	0.1	0.04	0.53
H2O Destilado	lt	1	1.20	14.40
Total Costo 1			36.431	437.2
			COSTO DE FABRICACION ANUAL	1821.89
			Costos 1 callos (10 callos por medio)	0.69
			Costo planta (20 plantas por callo)	0.03

MCO

Tabla 55:

Costos solución MCO

MATERIAS PRIMAS				
Materias directas e indirectas	unidad	Cantidad	Costo para 1l (=22m)	Costo para 12l en un año (= 264m)
Solución 20 X	ml	50	0.29	3.48
Solución 100 X	ml	10	0.02	0.24
Solución 1000 x	ml	1	0.002	0.02
Solución KELATO	ml	16.7	0.04	0.48
Solución fitohormonal 1 (Sigilo corporativo)	ml	N/A		0
Azúcar	gr	30	0.02	0.24
Solución fitohormonal 2 (Sigilo corporativo)	ml	N/A		0
Agar	gr	2	0.41	4.92
Solución Vitaminas	ml	1	0.001	0.01
Myo- Inositol	mg	0.1	0.04	0.53
H2O Destilado	lt	1	1.2	14.4
Total Costo 1			2.027	24.3
			COSTO DE FABRICACION ANUAL	1409.02
			Costos 1 callos (10 callos por medio)	0.53
			Costo planta (20 plantas por callo)	0.03

5.2.1.5 Costos Fijos y Variables

Basándose en los costos de fabricación obtenidos en las tablas anteriores, se obtendrá un costo fijo y variable de la producción de plantas in vitro hasta el punto de multiplicación. Hay que tomar en cuenta que este cálculo está proyectado para un litro mensual. Se debe tener presente que el costo operacional final se divide para 30, tomando en cuenta que se obtiene un mayor número de individuos a partir de la multiplicación donde se repartirán los costos de maneras más equivalentes.

Tabla 56:

Costos fijos y variables de procedimiento B1.

B1 (X3)	Costos Variables	1209.1
	Costo Fijos	200
	Total	1409.1
BS(X3 AG)	Costos Variables	1621.9
	Costo Fijos	200
	Total	1821.9
BD(MCO)	Costos Variables	1209.1
	Costo Fijos	200
	Total	1409.1

Tabla 57:

Total de costos fijos y variables línea CCN51 hasta multiplicación

Total Costos Variables y Fijo	
Costos Variables	4040
Costo Fijos	600
Total Anual	4640
Costo operacional anual	154.67

6.2.2 Capital de trabajo

Se comprenderá como la inversión a corto plazo por parte de Biogreen C.A. ya que los cálculos están establecidos para 1 litro, se hará los cálculos para el mismo valor y con el precio establecido por Biogreen C.A como está reflejado en el capítulo 2.

Tabla 58:

Capital de trabajo para línea cacao CCN51

PRODUCTOS	AÑO 1											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Ingresos (22 un)	23.1	23.1	23.1	23.1	23.1	23.1	23.1	23.1	23.1	23.1	23.1	23.1
(-) Costos operacionales	12.89	12.89	12.89	12.89	12.89	12.89	12.89	12.89	12.89	12.89	12.89	12.89
3 medios												
Utilidad/ Pérdida	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Utilidad/Pérdida Acumulada	10	20	31	41	51	61	71	82	92	102	112	123

6.2.3 Necesidad De Capital

Es el capital que Biogreen C.A requiere para el funcionamiento normal para correr una línea de Cacao CCN-51. Hay que tomar en cuenta que únicamente se va a tener activos corrientes y que es la implementación de una nueva línea en una planta de producción in vitro ya existente donde tienen su mercado bien establecido para otras especies vegetales y cuentan con los activos fijos ya establecidos e inclusive devuelta la inversión inicial.

Tabla 59:

Necesidad de capital para línea cacao CCN51

Necesidades de Capital	USD
Activos Fijos	0.00
Activos Corrientes	154.66
Costos de Constitución	0.00
Total	154.66

6.2.4 Financiamiento

Debido a que Biogreen C.A es una empresa consolidada, esta ya cuenta con un flujo de caja el mismo que por sigilo corporativo no se puede divulgar. No cuenta con la necesidad de financiamiento, por el hecho de ser una empresa ya inmiscuida en el mercado.

Tabla 61:

Pérdida y ganancia de línea de cacao CCN51 en año 10.

TIEMPO (AÑOS) / DESCRIPCIÓN	Año 1	Año 2	Año 3	Año 4	Año 5	Año 6	Año 7	Año 8	Año 9	Año 10
Ingresos	277	277	277	277	277	277	277	277	277	277
Total Ingresos	277	277	277	277	277	277	277	277	277	277
Costos Operacionales	155	155	155	155	155	155	155	155	155	155
Costos Financieros										
Intereses por créditos	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Depreciaciones y Amortizaciones	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0					
= Total Egresos	155	155	155	155	155	155	155	155	155	155
UTILIDAD BRUTA ANTES DE IMPUESTO	122	122	122	122	122	122	122	122	122	122
Participación de Trabajadores	12.00	12.00	12.00	12.00	12.00	12.00	12.00	12.00	12.00	12.00
Impuesto a la Renta	31.00	31.00	31.00	31.00	31.00	31.00	31.00	31.00	31.00	31.00
UTILIDAD NETA	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79

6.2.6 Flujo de caja

En el flujo de caja se calcula los ingresos y gastos que se realizan en el proyecto de la empresa durante un determinado periodo de tiempo. Esto nos da la libertad de tomar decisiones acertadas sobre el futuro en el presente.

Tabla 62:

Flujo de caja de línea de cacao en 1 año.

DESCRIPCIÓN	TIEMPO(MES)	Periodo Pre-operacional	AÑO 1												TOTAL
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
Ingresos			23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	277
Total Ingresos		0	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	277
INVERSION		13													
Activos Fijos		0													0
A. Corrientes		13													
Costos de Constitución		0													0
Costos Operacionales			13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	156
Costos Financieros															
Intereses por créditos															0
Depreciaciones y Amortizaciones			0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0
		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
= Total Egresos		13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	156
FLUJO OPERACIONAL		-13	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	121
Participación de Trabajadores		10%	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	12
Impuesto a la Renta		25%	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	30
FLUJO DESPUÉS DE IMPUESTOS		-13	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	79
Cuota Préstamo															0
Depreciaciones y Amortizaciones			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
FLUJO NETO DE EFECTIVO			7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	79

Tabla 63:

Flujo de caja de línea de cacao en 10 años

Descripción	TIEMPO (AÑOS)													
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
Ingresos			277	277	277	277	277	277	277	277	277	277	277	277
Total Ingresos			277	277	277	277	277	277	277	277	277	277	277	277
INVERSION		155												
Activos Fijos		0												
Activos Corrientes		155												
Costos de Constitución		0												
Costos Operacionales			155	155	155	155	155	155	155	155	155	155	155	155
Costos Financieros														
Intereses por créditos			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Depreciaciones y Amortizaciones			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
			0	0	0	0	0							
= Total Egresos			155	155	155	155	155	155	155	155	155	155	155	155
FLUJO OPERACIONAL		-155	122	122	122	122	122	122	122	122	122	122	122	122
Participación de Trabajadores			12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
Impuesto a la Renta			30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30
FLUJO DESPUÉS DE IMPUESTOS			0	80	80	80	80	80	80	80	80	80	80	80
Cuota Préstamo			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Depreciaciones y Amortizaciones			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ingreso préstamo		0												
FLUJO NETO DE EFECTIVO		-155	73	80	80	80	80	80	80	80	80	80	80	80
FLUJO NETO DE EFECTIVO		-155	-82	-2	78	158	238	318	398	478	558	638		

6.2.7 Indicadores Financieros

TIR quiere decir tasa interna de retorno: es la tasa que iguala el valor presente neto a cero, también se puede comprender como la tasa de rentabilidad producto de la reinversión de un flujo neto de efectivo. La evaluación que se debe tomar en cuenta se basa en la tasa de descuento. Si la tasa interna de retorno es mayor que la tasa de descuento, se puede aceptar el proyecto ya que estima que el rendimiento del proyecto en cuestión es mayor al mínimo requerido.

En la presente investigación obtenemos un TIR del 49% el cual es mayor a la tasa de descuento que es 20% por lo que el rendimiento del proyecto es alto.

VAN quiere decir valor actual neto, es un indicador que nos permite ver si se va a maximizar la inversión. La manera mas acertada, si dicho indicador es positivo, significa que el valor del proyecto tendrá un incremento al monto del valor presente, si el valor es negativo es que el proyecto tendrá una perdida equivalente al VAN y si el valor fuese 0 es que no habrá ningún cambio. En la presente investigación se puede apreciar un VAN positivo.

Cabe aclarar que el TIR y VAN obtenidos están en base únicamente en la adaptación de una nueva línea con miras hacia el futuro y que por este motivo ya se considera que se ha obtenido más individuos en base a la multiplicación.

Tabla 64:

Indicadores Financieros TIR y VAN línea cacao CCN51

TIR	49%
VAN (Tasa de desc. %)	\$ 174.56

PERIODO DE RECUPERACION

Tasa descuento	20%
----------------	-----

6.3 Plan financiero de construcción de nueva planta de multiplicación in vitro para Biogreen C.A

A continuación se presenta el plan financiero de lo que sería la construcción de una nueva planta de producción in vitro en conjunto de la nueva línea de producción de cacao CCN-51 in vitro. En este plan financiero se podrá encontrar la diferencia que se realizará en la inversión en Obras físicas, pero no en maquinaria ya que se utilizaría la misma existente en la planta anterior.

6.3.1 Inversiones

Por inversión se comprende todos los desembolsos que Biogreen C.A incurrirá

6.3.2 Inversión en obras físicas.

Por inversión en obras físicas se va comprender la inversión que Biogreen C.A realizaría en terreno, planos y programas de construcción.

Tabla 65:

Inversión obras físicas, nueva planta Biogreen C.A

Descripción	Costos (en USD)
Terreno	0.00
Construcción	50,000.00
Total	50,000.00

6.3.3 Inversión en maquinarias y equipos

No se realizará inversión en maquinarias y equipos ya que Biogreen C.A cuenta con equipos de punta en los cuales se han aplicado investigaciones propias para poder obtener mejores resultados en la planta. Los equipos de la vieja planta formaran parte de la nueva.

6.3.4 Activos fijos

Son todas las propiedades, maquinarias, equipos y bienes, que serán utilizados en un plazo considerable mayor a un año, que son utilizados en las operaciones normales de la empresa , las cuales generan utilidades ya que provocan ingresos. Los gastos por los activos fijos son conocidos como la depreciación; y por lo regular la excepción son los terrenos ya que estos no se devalúan en el tiempo (Horngre T, 2004, pp334).

Tabla 66:

Activos fijos de nueva planta Biogreen C.A

Descripción	Costos (en USD)
Inversión en Obras Físicas	50,000.00
Inversión Maquinaria y Equipo	0.00
Total	50,000.00

6.3.5 Costos de fabricación.

Los costos de fabricación son los mismo que en el numeral 7.2.1 ya que se va correr la misma línea de cacao CCN-51, hay que tomar en cuenta que para que la operación se vuelva rentable, se tendrá en cuenta las otras líneas de plantas de Biogreen C.A, las mismas que, por sigilo corporativo, no se podrán poner sus costos de fabricación únicamente se mencionaran de manera global mas adelante en la presente investigación.

6.3.6 Capital de trabajo.

Es el capital de trabajo que Biogreen C.A va requerir para que se pueda trabajar. Biogreen C.A cuenta con un basto inventario de especies vegetales,

por este motivo la construcción de una nueva planta in vitro no sería justificada únicamente por la producción de una nueva línea vegetal, se tomaran en cuenta 1500 U de varias especies por sigilo corporativo.

Tabla 67:

Capital de trabajo de nueva planta Biogreen C.A

PRODUCTOS	AÑO 1											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Ingresos por cacaoCCN-51 (22 un)	23.1	23.1	23.1	23.1	23.1	23.1	23.1	23.1	23.1	23.1	23.1	23.1
Ingresos por otras plantas Biogreen (1500 u)	4500	4500	4500	4500	4500	4500	4500	4500	4500	4500	4500	4500
(-) Costos operacionales cacao CCN-51	12.89	12.89	12.89	12.89	12.89	12.89	12.89	12.89	12.89	12.89	12.89	12.89
(-) Costos operacionales otras plantas	1636.36	1636.36	1636.36	1636.36	1636.36	1636.36	1636.36	1636.36	1636.36	1636.36	1636.36	1636.36
Utilidad/ Pérdida	2874	2874	2874	2874	2874	2874	2874	2874	2874	2874	2874	2874
Utilidad/Pérdida Acumulada	2874	5748	8622	11495	14369	17243	20117	22991	25865	28739	31612	34486

6.3.7 Depreciación.

Ya que únicamente se realizará la inversión en una construcción y los equipos serán utilizados de la anterior planta, la única depreciación que se encuentra es la de la construcción.

Tabal 68:

Depreciación, nueva planta Biogreen C.A

Descripción	USD	Tiempo de Vida (en años)	Depreciación (%)	Depreciación Anual (Años 1-3) (en US\$)	Depreciación Anual (Años 4-5) (en US\$)	Depreciación Mensual Año 1
Costruccion de lugar fisico nueva planta in vitro	50000	20	10%	5,000	5,000	416.67
TOTAL				5,000	5,000	416.67

6.3.8 Necesidad de capital.

Es el capital que Biogreen C.A requiere para el funcionamiento e implementación de la nueva planta de multiplicación in vitro.

Tabla 69:

Necesidad de capital, nueva planta Biogreen C.A

Necesidades de Capital	USD
Activos Fijos	50,000.00
Activos Corrientes producción de otras especies vegetales (8)	1636.36
Activos Corrientes Cacao CCN-51	12.89
Costos de Constitución	0.00
Total	51649.25

6.3.9 Financiamiento.

Por el motivo que Biogreen C.A es una empresa consolidada ésta no necesita de financiamiento sino que la misma puede invertir en la creación de la nueva planta de producción in vitro.

6.3.10 Pérdida y ganancia.

En la cuenta de pérdida y ganancia, vamos a mostrar los beneficios que podría obtener por la implantación de una nueva planta de producción in vitro

Tabla 73:

Flujo de caja de nueva planta Biogreen C.A en 10 años

Descripción	TIEMPO (AÑOS)										
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Ingresos		54277	54277	54277	54277	54277	54277	54277	54277	54277	54277
Total Ingresos		54,277	54,277	54,277	54,277	54,277	54,277	54,277	54,277	54,277	54,277
INVERSION	69,791										
Activos Fijos	50,000										
Activos Corrientes	19,791										
Costos de Constitución	0										
Costos Operacionales		19,791	19,791	19,791	19,791	19,791	19,791	19,791	19,791	19,791	19,791
Costos Financieros											
Intereses por créditos		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Depreciaciones y Amortizaciones		5,000	5,000	5,000	5,000	5,000	5,000	5,000	5,000	5,000	5,000
= Total Egresos		24,791	24,791	24,791	24,791	24,791	24,791	24,791	24,791	24,791	24,791
FLUJO OPERACIONAL	-69,791	29,486	29,486	29,486	29,486	29,486	29,486	29,486	29,486	29,486	29,486
Participación de Trabajadores		2,949	2,949	2,949	2,949	2,949	2,949	2,949	2,949	2,949	2,949
Impuesto a la Renta		7,372	7,372	7,372	7,372	7,372	7,372	7,372	7,372	7,372	7,372
FLUJO DESPUÉS DE IMPUESTOS		22,365	19,165	19,165	19,165	19,165	19,165	19,165	19,165	19,165	19,165
Cuota Préstamo		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Depreciaciones y Amortizaciones		5,000	5,000	5,000	5,000	5,000	5,000	5,000	5,000	5,000	5,000
Ingreso préstamo	0										
FLUJO NETO DE EFECTIVO	-69,791	22,365	24,165	24,165	24,165	24,165	24,165	24,165	24,165	24,165	24,165
FLUJO NETO DE EFECTIVO	-69,791	-47,426	-23,261	904	25,069	49,234	73,399	97,564	121,729	145,894	170,059

6.2.12 Indicadores financieros.

En el numeral 7.2.6 explica a fondo el TIR y el VAN. Lo que refleja el siguiente análisis financiero es que con un TIR de 32%, el cual es superior a la tasa de descuento que es 20%, el proyecto si es factible, siendo respaldado por un VAN que es positivo, lo cual garantiza tener buenos ingresos.

Tabla 74:

Indicadores financieros TIR y VAN de nueva planta Biogreen C.A

TIR	32%
VAN (Tasa de desc. %)	\$ 30,020.09

PERIODO DE RECUPERACION

Tasa descuento	20%
----------------	-----

7 .CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

7.1 Conclusiones

- El balance hormonal de un medio in vitro va depender de la etapa donde se encuentre el explanto y la planta productora por el echo que cada planta cuenta con sus formulaciones propias.
- En la tabla 18 se puede apreciar las diferencias marcadas del balance hormonal entre los medios crecimiento primario. El medio T1 cuenta con la utilización de mayor cantidad de soluciones madre como DKW macro A , DKW macro B, DKW micro, DKW vitaminas, TDZ, glutamina; mientras que los medios de B1 y B2 utilizan cantidades menores de soluciones madre como X20, X100, X1000 Vitaminas, Quelato, solución fitohormonal (sigilo corporativo) , esto indica que el balance hormonal en el medio de crecimiento primario es mayor en el medio T1 que en los medios B1 y B2 no obstante por los resultados obtenidos en el preste proyecto de titulación se puede apreciar que se considera que los medios B1 y B2 cuentan con un balance hormonal optimo por el echo de haber obtenido la aparición del primer callo en 15 días mientras que el medio T1 en 25. Esto demuestra que no es la cantidad de soluciones madre que se coloque en un medio lo que la hara optimas sino el balance hormonal en la que se encuentra la misma.
- En la tabla 19 se puede apreciar las diferencias marcadas del balance hormonal entre medios de crecimiento secundario. El medio T2 cuenta con la utilización de una menor cantidad de soluciones madres e incluso omite la utilización de otras; mientras que en el medio BS se utiliza una mayor cantidad de soluciones madre que los medios de crecimiento primario e incluso se incorpora mas soluciones madre como solución fitohormaonal 2 (Sigilo corporativo). Esto indica que el balance hormonal es mayor en el medio BS que en el medio T2 por este motivo el medio BS se considerara

con un balance hormonal optimo por el echo de tener una cantidad menor de explantos muertos el resultado se refleja en la tabla 22.

- En la tabla 20 se encuentra el balance hormonal del medio BD de Biogreen C.A, por motivo de que los explantos colocados en el medio T2 no lograron sobrevivir para entrar a la etapa de desarrollo, no se encuentra presente ningún medio de desarrollo testigo. El medio BD muestra ser un medio optimo por el echo de haber llegado la obtención de un callo final listo para ser desarrollado hacia planta. Esto muestra que su balance hormonal es optimo para el desarrollo de un explanto hacia callo final.
- El medio X3 (B1) muestra menor cantidad de fitohormona 1 y Azúcar en comparación del medio M2 (B2), esto produce una gran diferencia ya que es un medio de crecimiento y un exceso o una deficiencia puede provocar la muerte del explanto.
- Se valido un sistema de reproducción clonal con alta reproducibilidad y que mantuvo estable las características genéticas. En la presente investigación, por los índices de supervivencia de callos, se concluye que el procedimiento B1 es mejor para establecer como un sistema de reproducción clonal y que puede mantener las características genéticas ya que el procedimiento B1 cuenta con la elucidación hormonal óptima en los medios para mantener las características de explantos nuevos, debido a que es una investigación que llega hasta la multiplicación in vitro y no mas allá, se puede observar las características en los explantos nuevos.
- El análisis del procedimiento T1 (Testigo). Por medio estadístico muestra que varía en resultados entre los procedimientos B1 y B2 (procedimientos Biogreen C.A y Agustín Cobos) el momento de aplicar la prueba CHI cuadrado el cual respalda a los índices porcentuales no obstante es el que muestra el mayor índice de muerte y contaminación. Los callos trasferidos al medio secundario no lograron llegar a una etapa madura de callo, por lo

cual no fueron transferidos al medio de desarrollo. La muerte de callos nos da a pensar que el medio testigo obtenido de medios bibliográficos guarda sigilo ya que por experiencia de Biogreen C.A hay faltantes de insumos en los medios dentro de los procedimientos,

- En el análisis del procedimiento B1 (Biogreen C.A y Agustín Cobos) por medio estadístico muestra existe variación entre el procedimiento T1 y B2 mediante el uso de la prueba CHI cuadrado, esto respalda a los índices de supervivencia de callos, explantos muertos y explantos contaminados. Los cuales muestran que el procedimiento B1 (Biogreen C.A y Agustín Cobos) es el procedimiento más viable para la aplicación a condiciones reales de la empresa Biogreen C.A.
- En el análisis al procedimiento B2 (Biogreen C.A y Agustín Cobos), por medio estadístico muestra que existe variación entre los tratamientos el momento que se aplica la prueba CHI cuadrado , no obstante este tratamiento no se lo tomara en cuenta para una aplicación real ya que muestra índices de contaminación y muerte mayores a al procedimiento B1
- Tomando en cuenta la obtención de callo por numero días se puede observar que todos los procedimientos obtiene callos bajo los 30 días. Y en la prueba de medias se observa esto, no obstante se puede observar que los procedimientos de Biogreen C.A obtienen callos de manera mas rápida en promedio 7 días antes.
- Producto de esta investigación se establece que la caracterización del explanto ideal dependerá de la planta madre, en la cual se puede medir sus características productivas y fenotípicas que a la larga las mismas serán conferidas a los explantos que se utilicen en los procedimientos in vitro.
- En la presente proyecto de titulación se determino que los costos para elaborar una línea nueva de cacao CCN51 para Biogreen C.A, es rentable ya que los indicadores financieros los indican con un TIR de 49% que es

mayor a la tasa de retorno establecida del 20% y VAN de \$174.56 el cual es positivo ; los beneficios se obtendrían en un periodo de dos años. Esto únicamente realizando la venta de 22 plantas y contrastando costos de plantas anteriores.

- La construcción de una nueva planta de multiplicación in vitro para Biogreen C.A se puede considerar rentable únicamente si se compensa el valor de la inversión por lo menos con la venta de 1500 U vegetales variadas de Biogreen C.A al mes, esto también considerando la venta 22 U de cacao CCN51 al mes. Los beneficios netos de la instalación de la nueva planta de Biogreen C.A se podrá ver a partir del 3 año de la inversión. Hay que mencionar que es inversión neta en la construcción ya que Biogreen C.A cuenta con el terreno, y la maquinaria cuenta con modificaciones hechas en ellas propias de Biogreen C.A.
- Se obtuvo una línea genética superior de cacao CCN 51 ya que en el procedimiento realizado por Biogreen C.A tiene el menor numero de cortes a los callos por lo cual hay menos dediferenciacion y por ende menos variación somática.

7.2 Recomendaciones

- El momento de realizar la formulación de las soluciones es de vital importancia obtener los valores exactos para no producir una deficiencia o una intoxicación en los explantos.
- El transporte de los explantos de la planta madre de cacao CCN51 hacia la planta de producción in vitro tiene que realizarse lo mas rápido posible para que las células que se encuentran en los explantos no pierdan humedad y terminen muriendo.

- Los explantos transportados hacia la planta de producción in vitro tienen que estar en agua refrigerada y estéril hasta llegar a la planta, de esta manera reducen las oportunidades de muerte de los explantos.
- Se debe tener el conocimiento de una adecuada metodología de desinfección de los explantos en especial cuando estos son tomados de medios silvestres o plantaciones reales, ya que estos pueden contener patógenos y podrían perjudicar por completo a la investigación.
- Toda siembra y transferencia in vitro se tendrá que realizar con una previa desinfección de la cámara de flujo laminar de manera completa con alcohol, así como la desinfección completa de los utensilios (bisturí pinzas) dentro de la cámara de flujo laminar los cuales tendrán que ser flameados por el mechero busin dentro de la cámara laminar
- Todos los objetos que entren a la cámara de flujo laminar tendrán que estar estériles, esto incluye los medios realizados para la siembra.
- Hay que procurar en el momento de siembra o transferencia no pasar las manos sobre el medio, sino utilizar únicamente los utensilios dentro de la cámara.
- Utilizar un máximo de 10 explantos por medio caso contrario se podría producir la muerte de los explantos dentro del medio porque no habrá la cantidad necesaria de nutrientes y hormonas para cada uno.
- Se debe procurar mantenerse dentro de los márgenes de tiempo entre siembra y transferencia caso contrario podría producirse una deficiencia entre las etapas para llegar a la multiplicación.
- Se tiene que mantener un monitoreo constante de los explantos ya que es la única manera de mantener todo bajo control.

REFERENCIAS

1. AGRARES, Aminoácidos agars 7, AGARES, 2005, pag 3
2. AGRIMEN, Sulfato de Magnesio, <http://www.agrimen.com/productos/item/fertilizantes/sulfato-de-magnesio.html>, 2012, investigado 03/16/2012
3. AGROSAGI, Productos, <http://www.agrosagi.com/productos/sulfatocu.htm>, 2009, investigado 03/17/12
4. ALECO, Sulfato de Magnesio, <http://www.alecoconsult.com/index.php?id=sulfato-de-magnesio>, 2009, investigado 03/18/12
5. ÁLVAREZ, Martha; Multiplicación de plantas, Grafica pintar S.A 2011, Pag 8
6. ANECACAO, Precios mínimos referencias F.O.B para exportación de cacao y semielaborados correspondientes a la semana del 1 al 7 de marzo del 2012, <http://www.anecacao.com/images/stories/precios%20minimos%20referenciales%20del%201%20al%207.pdf> , 2012, Investigado 3/06/12
7. ANTALIEN, Nitrato de Zinc, <http://www.antalien.net/productos/tecnicas/Ficha-Tecniva-N-de-zinc-Prohass.pdf>, 2010, investigado 03/17/12
8. ASHLOOWALIA B.S , PRAKASH J , SAVANGIKAR V.A, Low cost options for tissue culture technology in developing countries, IAEA,2002 , Pag 7,8,9.
9. BARONA, Víctor, Caracterización de clones, <http://www.slideshare.net/vigobarona/caracterizacion-de-clones>, 2009, pag 11, investigado 02/28/2012.
10. BATISTA, Lépido, El cultivo de cacao, CEDAF, 2009, pag 13
11. DAKINPERU, Nitrato de calcio, http://dakinperu.com/pdf_quimicos/nitrato%20calcio.pdf, 2012, investigado 03/14/2012
12. EQUAQUIMICA, Cultivo de cacao Información técnica, http://www.ecuaquimica.com.ec/cultivo_cacao.html, 2008, pag 1, 02/28/2012
13. ESPINOSA, José, MITE, Francisco, CEDEÑO Sergio, BARRIGA Sandra,

- ANDINO Javier, Manejo por sitio específico del cacao basado en sistemas de información geográfica, Informaciones Agronómicas, No 60, 2006, Pag 6.
14. F.A.C, Autoclaves, http://www.fac-gk.com.ar/index.php?page=shop.browse&category_id=33&option=com_virtuemart&Itemid=1, 2008, investigado 04/01/12
 15. FERTISQUISA, Sulfato de potasio, http://www.isquisa.com/site/files/productos/Sulfato_de_Potasio.pdf, 2007, investigado 03/16/12
 16. FORISTER G.W, BURGER D.W ,Laminar Flow Hood Construction, pag 1, University o California Davis Deparment o envirmental horticulture
 17. HORNGREN Charlest, Contabilidad : un enfoque aplicado a Mexico, Person Education, 2004, pag 344
 18. IICA, Numero de laboratorios por provincias, <http://www.iica-ecuador.org/abtecuador/flash/xml.swf>, 2011, 11/06/2011
 19. INEC, Visualizador de estadísticas agropecuarias del Ecuador ESPAC, <http://157.100.43.205/lcds-samples/testdrive-remoteobject/main.html#app=44e4&9270-selectedIndex=1>, 2010, 11/01/2011.
 20. IPINI, Conozca la deficiencia de hierro, [http://www.ipni.net/ppiweb/iamex.nsf/\\$webindex/98CCDBEF1E4D614806256ABF005887E5/\\$file/Conozca+la+deficiencia+de+hierro.pdf](http://www.ipni.net/ppiweb/iamex.nsf/$webindex/98CCDBEF1E4D614806256ABF005887E5/$file/Conozca+la+deficiencia+de+hierro.pdf), 2009, investigado 03/28/12
 21. IPNI, Conozca las deficiencias del molibdeno, [http://www.ipni.net/ppiweb/iamex.nsf/\\$webindex/886F49B9A3B9D19C06256AC5005BBBC4/\\$file/deficiencia+molibdeno.pdf](http://www.ipni.net/ppiweb/iamex.nsf/$webindex/886F49B9A3B9D19C06256AC5005BBBC4/$file/deficiencia+molibdeno.pdf), 2008, investigado 03/18/12
 22. LABORATORIO Quimico 3.0, Mechero Bunsen , <http://tplaboratorioquimico.blogspot.com/2008/08/mechero-bunsen.html>, 2010, investigado 04/01/12
 23. LOYALA VARGAS, Victor; VÁSQUEZ FLOTA, Felipe; Plantcell culture protocols, Human PressInc, 2006, Pag 9, 10,11.
 24. MAXIMOVA SIELA, GUILTINAN, Mark, Integrated System for vegetative propagation of cacao, PennState press,2010,pag 5,10-18

25. MINERA San Rita, Acido Bórico MSR, <http://www.santaritasrl.com/esp/pdf/boric-acid-esp.pdf>, 2006, investigado 03/18/12
26. MIROGINSKI L, Cultivo de tejidos en la agricultura, 1995, Pag 32
27. MISAWA, Misanaru, PLANT TISSUE CULTURE: AN ALTERNATIVE FOR PRODUCTION OF USEFUL METABOLITE, FAO, 1994, Chapter 4 pp 1.
28. NAPOLEA E, ARMANDA M, OLIVERA M, ESTRESSES HIPOXÍTICO E ANOXÍTICO EM PLANTAS DE MAMONEIRA, Mamona, 2007, pag 2.
29. OXYCHILE, cloruro de calico, http://www.oxychile.cl/opensite_20075.aspx?glb_url_nodo=opensite%5Fdet%5F20080124161749%2Easpx, 2012, investigado 03/16/12
30. PHYTA Technology Laboratories INC, Tissue Culture Media Composition, Phyta Technology Laboratories, 2003, pag 2
31. PIERIK R.L.M, In Vito Culture of higher plants, Kluwer, 1997, Pag 29
32. POLLEX, Products Fertilizers, <http://www.pollex.nl/fertilizers/3.html>, 2012, investigado 03/16/2012.
33. RAM, Fodfito Fos-K, <http://www.ransa.com/agro/Fos-K.pdf>, 2010, investigado 02/16/12.
34. SEGRETIN, Eugenia, Los cultivos celulares y sus aplicaciones II (cultivos de celulas vegetales), 2006, Pag 2,
35. SHEL LAB, LI15 SHEL LAB Diurnal Plant Growth Chamber, <http://www.shellab.com/store/lab-products/li15-plant-growth-chamber>, 2012, investigado 04/05/2012
36. STERN G. Jeffrey, The Histoty of CCN-51 in Ecuador, <http://jeffreystern.com/ecuadorian-cacao-varieties/the-history-of-ccn-51/>, 2011, pag 1, investigado 2/26/2012.
37. STYER, Christine Jean, Regulating Inositol Biosynthesis in plants: Myoinositol phosphate synthase and myo-inositol monophosphatase, Virginia Polytechnic Institute and State University, 2000, pag 1
38. TAJI, Acram; KUMOR, Prakash, LALSHMANAN, Prakash; In Vitro Plant Breeding, The Haworth, 2002, Pag 3.
39. UNIVERSITY of Wisconsin Madison, pH Meter,

<http://www.uwplatt.edu/chemep/chem/chemscape/labdocs/catofp/measura/concentr/phmeter/meter.htm>, 1996, investigado 04/30/12

40. WALCO S.A, Todo sobre los quelantes, Walco,2000, Bogotá Colombia pág. 4,5,6