



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

IMPLEMENTACIÓN DE UN PROTOCOLO PARA LA OBTENCIÓN DE
CALLOS DE CACAO CCN-51 (*Theobroma cacao* L.) CON INTERÉS
COMERCIAL.



AUTOR

María Gabriela Vásquez Díaz

AÑO

2017



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

IMPLEMENTACIÓN DE UN PROTOCOLO PARA LA OBTENCIÓN DE
CALLOS DE CACAO CCN-51 (*Theobroma cacao* L.) CON INTERÉS
COMERCIAL.

Trabajo de Titulación presentado en conformidad con los requisitos
establecidos para optar por el título de Ingeniera en Biotecnología

Profesor Guía

M.Sc. Fernando Xavier Rivas Romero

Autora

María Gabriela Vásquez Díaz

Año

2017

DECLARACIÓN DEL PROFESOR GUÍA

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

Fernando Xavier Rivas Romero
Master universitario en Biotecnología molecular y celular de plantas
CC.: 171809270-1

DECLARACIÓN DEL PROFESOR CORRECTOR

“Declaro haber revisado este trabajo, dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación”.

Wilson David Tapia López
Master en Gestión y Planificación Ambiental
CC: 1714205281

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 respetaron las disposiciones legales que protegen los derechos de autor vigentes”.

María Gabriela Vásquez Díaz
CC: 171765374-3

AGRADECIMIENTOS

A Dios por todas sus bendiciones. A la Universidad de las Américas por permitirme formar parte de una de las mejores universidades del país. A la empresa Orangetruck Agroindustrias S.A. por darme la oportunidad de realizar mi trabajo de tesis. A mi profesor guía M. Sc. Fernando Rivas por su orientación y toda la ayuda que me brindó durante mi trabajo. Al M. Sc. Pierre Landázuri por abrirme las puertas de su empresa y por su apoyo. A la Ing. Anita Vera por su ayuda, amistad, cariño y por ser mi ángel guardián. A todas las personas que laboran en la empresa Orangetruck Agroindustrias S.A. por recibirme con cariño y brindarme su amistad.

DEDICATORIA

A mi padre Guillermo y a mi madre Angelita que son la luz de mi vida y mi felicidad, gracias por su amor y por su apoyo incondicional. Me han demostrado con su ejemplo que para ser un buen profesional, antes se debe ser una buena persona. A mi hermana María José por estar a mi lado siempre, por ser mi amiga, mi confidente y mi compañera de vida. A Liliana por su cariño, por su amistad y por su ayuda a lo largo de estos años. Mi gratitud y mi amor infinito para ustedes. Los amo con todo el corazón.

RESUMEN

El cacao es un árbol perenne que es cultivado en las zonas tropicales húmedas. Es un cultivo de gran importancia económica para África, Asia y América Latina. El principal problema del cultivo de cacao son sus métodos de propagación convencionales pues resultan muy laboriosos, se necesita gran mano de obra y son bajos en productividad. Por lo tanto, se hace necesario la aplicación de técnicas biotecnológicas para la propagación del cacao como alternativa a los métodos convencionales. Una de ellas es el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales, la cual resulta una alternativa eficiente y de bajo costo para estos propósitos.

El objetivo de esta investigación fue implementar un protocolo para la obtención de callos de cacao CCN-51 (*Theobroma cacao* L.) con interés comercial. Para lograr este objetivo se realizaron cinco tratamientos en la fase de inducción a callo empleando las sales Driver y Kuniyuki (DKW) modificado. Mediante un análisis paramétrico de varianza ANOVA se evaluaron dos variables, el tiempo de apareamiento de callo (semanas) y el porcentaje de transformación de callo. En dicho análisis no se encontraron diferencias significativas en ninguna de las dos variables antes mencionadas, sin embargo, se consideró como el mejor tratamiento en cuanto al tiempo en la aparición de callos, al tratamiento 2 (T2) ya que este tuvo el menor registro en relación a la variable de estudio (3,37 semanas). En cuanto a la variable porcentaje de transformación de callo, se consideró al tratamiento 4 (T4) como el mejor debido a que presentó el mayor registro en relación a la variable citada (99,99%).

Como resultado de este estudio se optó por el medio de cultivo del T4 como el mejor tratamiento para la inducción a callo de cacao CCN-51 ya que con el mismo se obtuvo la mayor cantidad de callos en esta especie lo cual es conveniente a nivel agronómico.

ABSTRACT

Cocoa is a perennial tree; it is cultivated in humid tropical areas. It is a crop of great economic importance for Africa, Asia, and Latin America. The main problem of cocoa cultivation is conventional propagation methods since these are very laborious, need intensive labor and these have low productivity. Therefore, is necessary the application of biotechnological technique for cocoa propagation as an alternative to conventional methods. One of them is *in vitro* culture of plant tissues which is an efficient and low cost alternative for these purposes.

The aim of this research was implement a protocol for obtaining calluses of CCN-51 cocoa (*Theobroma cacao* L.) with commercial interest. To achieve this aim, five treatments were carried out in callus induction phase using modified Driver and Kuniyuki (DKW) salts. By means of a parametric analysis of ANOVA variance, two variables were evaluated, time of callus formation (weeks) and percentage of callus transformation. In these analysis, no significant differences were found in any of two mentioned variables, however treatment 2 (T2) was considered as the best treatment about time of callus formation since it had the lowest register in relation to the study variable (3,37 weeks). As for percentage of callus transformation variable, treatment 4 (T4) was considered as the best treatment because it was presented the highest register regarding cited variable (99,99%).

Because of this study, the culture medium of treatment T4 for callus induction of CCN-51 cocoa was chosen as the best treatment because with this was obtained the greatest amount of callus in this species which is convenient to agronomic level.

ÍNDICE

1. CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Antecedentes	1
1.2. Planteamiento del problema.....	4
1.3. Objetivos	5
1.3.1. Objetivo general.....	5
1.3.2. Objetivos específicos.....	5
1.4. Justificación de la investigación.....	5
2. CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO	7
2.1. Theobroma cacao L.....	7
2.2. Taxonomía	8
2.3. Descripción botánica del cacao	8
2.3.1. Raíces	8
2.3.2. Tronco	9
2.3.3. Hojas	10
2.3.4. Inflorescencias.....	11
2.3.5. Flores.....	12
2.3.6. Fruto	13
2.3.7. Semillas	14
2.4. Historia del cultivo de cacao en Ecuador	15
2.5. Métodos de propagación vegetativa convencional y biotecnológica para cacao	17
2.5.1. Métodos de propagación vegetativa convencional	17
2.5.2. Métodos de propagación vegetativa biotecnológica	22
2.6. Cultivo de callos	22
2.6.1. Generalidades y características del cultivo de callos.....	22
2.6.2. Etapas de desarrollo del callo.....	23
2.7. Embriogénesis somática	23

2.7.1.	Generalidades y características de la embriogénesis somática ...	23
2.7.2.	Origen de la embriogénesis somática.....	24
2.7.3.	Etapas de la embriogénesis somática	25
2.7.4.	Factores que influyen en la embriogénesis somática	27
2.7.5.	Genes relacionados con la embriogénesis somática.....	29
2.7.6.	Embriogénesis somática en cacao	31
3.	CAPÍTULO III. DISEÑO DEL PLAN	
	EXPERIMENTAL	31
3.1.	Tratamientos.....	32
3.2.	Variables	32
3.3.	Diagrama de flujo del proceso	33
4.	CAPÍTULO IV. PROCEDIMIENTOS	34
4.1.	Determinación de la población y muestra	34
4.2.	Materiales y métodos para la obtención de los datos	34
4.2.1.	Desinfección del material vegetal	34
4.2.2.	Introducción y fase de callogénesis.....	35
4.3.	Evaluación estadística de los resultados.....	36
5.	CAPÍTULO V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	37
5.1.	Obtención del material vegetal.....	37
5.2.	Desinfección del material vegetal.....	38
5.3.	Introducción y fase de callogénesis	41
5.3.1.	Tiempo de apareamiento de callo	46
5.3.2.	Porcentaje de transformación de callo.....	48
5.4.	Protocolo para la obtención de callos de cacao CCN-51 ..	50
6.	CONCLUSIONES.....	51
	REFERENCIAS	52

1. CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

1.1. Antecedentes

Theobroma cacao L. es un árbol que pertenece a la familia Malvaceae y es cultivado en las zonas húmedas (Urrea, Atehortúa y Gallego, 2011, p.40). Los granos de cacao son utilizados como materia prima en la industria del chocolate (Maximova, Young, Pishak y Guiltinan, 2008, p.487).

El cultivo del cacao es importante para la economía de varios países tropicales y se conoce que aproximadamente 3,5 millones de toneladas de cacao se producen en el mundo (Chanatásig, 2004, p.1).

La producción de cacao ha sido afectada y por lo tanto, limitada por el daño causado por las enfermedades de este cultivo tales como monilia (*Moniliophthora roreri*), escoba de bruja (*Moniliophthora perniciosa*), mazorca negra (*Phytophthora* spp), mal de machete (*Ceratocystis cacao funesta*), llaga radicular negra (*Rosellinia* sp) (AGROCALIDAD, 2012, p.22).

En el Ecuador existen dos variedades de cacao que son representativas. El denominado “Cacao Arriba” conocido como fino y de aroma y el cacao CCN-51 el cual fue producto de este estudio (Sotomayor, 2011, p.20).

El cacao CCN-51 cuyo significado es “Colección Castro Naranjal” fue realizado por Homero Castro Zurita en 1960. Esta variedad de cacao es resistente a las enfermedades que atacan al cultivo y es altamente productiva (Boza, Motamayor, Amores, Cedeño, Tondo, Livingstone, Schnell y Gutiérrez, 2014, p.220).

Por esta razón el 2005, el cacao CCN-51 fue declarado un bien de alta productividad. Por consiguiente, el Ministerio de Agricultura promovió la producción, comercialización y exportación de este producto (Banco Central del Ecuador, 2013, p.24).

La variedad de cacao CCN-51 cuenta con una plantación de 80000 hectáreas totales en el país (Boza et al., 2014, p.220). Así, este clon de cacao es un cultivo muy popular en la agricultura ecuatoriana (Herrmann, Felbinger, Haase, Rudolph, Biermann y Fischer, 2015, p.4539).

El cacao CCN-51 es uno de los más utilizados en la industria chocolatera mundial pues el consumo de chocolate crece más rápido que la producción del cacao (Sotomayor, 2011, p.6).

Este clon ha emergido en los mercados del grano por su calidad y productividad, permitiendo una producción de 2000 a 3000 kg/ha/año a diferencia del nacional que produce de 300 a 500 kg/ha (Sotomayor, 2011, p.68).

En el Ecuador se cultiva el cacao en las provincias de Guayas, Manabí y Los Ríos. La provincia del Guayas tiene un rendimiento de 0,92 t/ha siendo este el más alto a nivel nacional y el 22,15% del total de superficie cosechada y Los Ríos con 0,53 t/ha y el 18,29% del total del área cosechada (MAGAP, 2014, p.4).

Con respecto a la producción nacional en el 2014, esta aumentó a 27,90% en relación al 2013 debido a las buenas condiciones agroclimáticas en varias provincias del país que son productoras de cacao, al manejo de buenas prácticas agrícolas y al aumento de siembra; alcanzando hasta 224163 toneladas (MAGAP, 2014, p.4).

La producción mundial de cacao en el 2014 se incrementó en un 10,39% en relación al año 2012 debido a la producción que alcanzó Costa de Marfil y Ghana, siendo estos países los principales productores de cacao a nivel mundial con el 39,72% y 21,13% respectivamente seguido de Indonesia con el 9,76%, Nigeria con el 5,51%, Brasil con el 4,82%, Ecuador 4,59% y el 14,47% pertenece a 53 países del resto del mundo (MAGAP, 2014, p.1).

Referente a la exportación a nivel internacional de cacao en el 2014, esta se incrementó en 21,99% en relación al 2013. Costa de Marfil con el 33,85% fue el principal país exportador de cacao en el 2014, seguido de Ghana con el 22,53%, Holanda con el 5,94%, Ecuador con un 5,58%, Camerún con el 5,79%, Nigeria con un 5,65% y otros países con el 20,39% (MAGAP, 2014, p.3).

Mundialmente, Ecuador es uno de los principales países exportadores de cacao ya que ha aumentado sus exportaciones en 11,50% en el 2014 en relación al año 2013. Esto se debe al incremento de la demanda de cacao ecuatoriano principalmente por países como China, México, Estados Unidos y Holanda (MAGAP, 2014, p.4).

Una característica general que se ha encontrado en el cacao a nivel mundial es la existencia de un alto grado de variación del rendimiento en esta planta a causa del empleo preponderante de semillas para la propagación de esta especie ya que estos cultivos en su mayoría son altamente heterocigóticos, lo que provoca que la ganancia genética sea rápidamente pérdida, por lo tanto los sistemas de propagación vegetativa aportarían con un procedimiento para mantener a esta ganancia genética (Maximova, Alemanno, Young, Ferriere, Traore y Guiltinan, 2002, p.252).

Es por ello que a través del método de cultivo de tejidos es posible una propagación asexual de esta planta de manera rápida y uniforme manteniendo los rasgos genéticos (Maximova et al., 2002, p.252). Este método tiene una función muy importante en cuanto a la propagación, conservación y mejoramiento genético de plantas, además de la reconstrucción ecológica y el restablecimiento de hábitats degradados (Rathore, Rathore, Shekhawat, Singh, Liler, Phulwaria y Dagla, 2004, p.197).

Al aplicar técnicas biotecnológicas de cultivo de tejidos como la embriogénesis somática es posible la producción en masa de material vegetal genéticamente

idéntico, uniforme fisiológicamente con características de desarrollo óptimo y libres de patógenos (Rathore et al., 2004, p.196).

1.2. Planteamiento del problema

En el Ecuador la producción de cacao implica uno de los principales rubros del sector agropecuario y a través de los años, se ha convertido en una importante fuente de ingresos para el país (Banco Central del Ecuador, 2002, p.3).

Sin embargo, existen factores que afectan la actividad del cacao ecuatoriano como es el alto costo de los fertilizantes, ya que esto ha contribuido a la falta de mantenimiento nutricional de los árboles de cacao, lo que ha provocado que las plantaciones sean más propensas a ser afectadas por varias enfermedades (Banco Central del Ecuador, 2002, p.11).

Las plantaciones de cacao son afectadas por varias plagas y enfermedades como monilia (*Moniliophthora roreri*), escoba de bruja (*Moniliophthora perniciosa*), mazorca negra (*Phytophthora* spp), mal de machete (*Ceratocystis cacao funesta*) y llaga radicular negra (*Rosellinia* sp) (AGROCALIDAD, 2012, p.22). Entre estas la más importante es la escoba de bruja la cual ha provocado grandes pérdidas de producto (Banco Central del Ecuador, 2002, p.11).

Por lo tanto, el cacao CCN-51 ha sido desarrollado y cultivado en el Ecuador ya que esta variedad tiene cierto grado de inmunidad a la escoba de bruja, además de poseer una mayor productividad, precocidad en la producción y una gran diferencia en la cantidad de quintales producidos por hectárea con respecto a otras variedades de cacao. Tiene otras ventajas como por ejemplo posee granos más grandes, mayor tolerancia a las enfermedades, además de un mayor nivel de adaptación a condiciones ambientales desfavorables (Banco Central del Ecuador, 2002, p.11).

Existen varios métodos de propagación convencionales para el cultivo de cacao como son el uso de semilla, estaca, injerto y por acodos. Sin embargo, estos métodos son muy laboriosos pues requieren de gran mano de obra y son bajos en productividad. Sin embargo, las semillas de cacao con el paso del tiempo tienden a perder viabilidad, pues los cultivos presentan diferente capacidad de producción debido a la alta variabilidad genética.

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo general

Implementar un protocolo para la obtención de callos de cacao CCN-51 (*Theobroma cacao* L.) con interés comercial.

1.3.2. Objetivos específicos

- Evaluar la capacidad de inducción de callos de cacao CCN-51 (*Theobroma cacao* L.).
- Evaluar la capacidad de regeneración de embriones somáticos a partir de callos de cacao CCN-51 (*Theobroma cacao* L.).

1.4. Justificación de la investigación

El cultivo de cacao representa un importante interés económico, no obstante con los métodos de cultivo convencionales que se han aplicado para cultivar esta planta, no se han obtenido los resultados esperados pues no se ha logrado alcanzar una alta productividad en esta especie.

Por esta razón, se requiere la aplicación de técnicas biotecnológicas de micropropagación como el cultivo de tejidos. Esta es una técnica ampliamente aplicada para una rápida propagación asexual *in vitro*, permitiendo una mayor producción de plantas élite libres de enfermedades. Cuando los métodos tradicionales son incapaces de cumplir con la demanda para propagación del

material vegetal, esta técnica puede producir millones de plantas élite (Ponmurugan y Kumar Suresh, 2012, p.61).

Al contrario de la propagación vegetativa de plantas convencional, la micropropagación es rápida y además esta técnica ha sido adoptada en productos de importancia económica como el banano, manzana y muchas plantas ornamentales. Las técnicas de micropropagación son más manejables por sobre otras técnicas de propagación asexual convencional ya que tienen ventajas como el requerimiento de una pequeña cantidad de tejido para regenerar millones de plantas clones en un año, además que se produce plantas *in vitro* libres de enfermedades en un proceso independiente de las estaciones climáticas, adicionalmente de ser un procedimiento rentable ya que se requiere de un mínimo espacio de crecimiento (Ponmurugan y Kumar Suresh, 2012, p.61).

Uno de los métodos de propagación más aplicados es la embriogénesis somática. El objetivo del uso de esta técnica para el clon de cacao CCN-51, es que siendo esta una importante técnica de clonación y aplicación en biotecnología, va a permitir la obtención de plantas clones, lo cual va a masificar la producción, además de reducir el tiempo de obtención de plantas élite de cacao CCN-51 (Sánchez, Daquinta y Capote, 2009, p.1).

La aplicación de este método es muy práctico en la agricultura y tiene varias ventajas con respecto a la propagación convencional. Una de las ventajas de la aplicación de la embriogénesis somática es la producción a gran escala de plantas mediante la multiplicación de líneas celulares embriogénicas. Además durante la regeneración, la formación de la raíz y del brote es simultánea siendo de esta manera innecesaria la fase de inducción de raíz como ocurre en la propagación convencional. Asimismo, el modo de cultivo proporciona un fácil escalado con poca mano de obra (Deo, Tyagi, Taylor, Harding y Becker, 2010, p.28).

Por lo tanto, con esta investigación, se visualiza a la embriogénesis somática como una herramienta para desarrollar y producir de forma masiva a estos clones, ya que a través de esta técnica se podrá multiplicar material vegetal de alto valor genético, donde se obtendrá como resultado una gran cantidad de plantas productivas de cacao CCN-51 mejorando así la producción de esta variedad en el país (Sánchez, Daquinta y Capote, 2009, p.1).

2. CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO

2.1. *Theobroma cacao* L.

Theobroma cacao L. es un árbol tropical perenne que tiene gran importancia económica para Asia, África y América Latina. La Organización Internacional del Cacao (2015) evaluó aproximadamente 4359 millones de toneladas de producción mundial de cacao durante el período de 2013/2014 de los cuales 448000 toneladas son producidas por Ecuador y Brasil (Vargas, Ciobotă, Salinas, Kampe, Aponte, Rösch, Popp, y Ramos, 2016, p.3).

La mayor parte de cacao procede de Costa de Marfil y otros países africanos (Herrmann et al., 2015, p.4539).

Existen dos variedades de cacao predominantes en Ecuador: el conocido cacao “arriba” o fino y de aroma y el clon de cacao CCN-51. Ecuador es el país productor más importante de cacao fino y de aroma pues tiene una gran demanda, ya que es utilizado para la elaboración de los mejores chocolates. Sin embargo, el cacao CCN-51 también es cultivado en el país debido a que esta variedad es más resistente a las enfermedades que atacan a los cultivos de cacao fino y de aroma; posee mayor resistencia a las diversas condiciones climáticas y además su producción es considerablemente mayor (Vargas et al., 2016, p.4).

2.2. Taxonomía

La taxonomía de *Theobroma cacao* L. está reportada en la Tabla 1.

Tabla 1.

Taxonomía de *Theobroma cacao* L.

Reino	<i>Plantae</i>
Subreino	<i>Viridiplantae</i>
Infrareino	<i>Streptophyta</i>
Superdivisión	<i>Embryophyta</i>
División	<i>Tracheophyta</i>
Subdivisión	<i>Spermatophytina</i>
Clase	<i>Magnoliopsida</i>
Superorden	<i>Rosanae</i>
Orden	<i>Malvales</i>
Familia	<i>Malvaceae</i>
Género	<i>Theobroma</i>
Especie	<i>Theobroma cacao</i> L.

Tomado de (ITIS, 2016, p.1).

2.3. Descripción botánica del cacao

2.3.1. Raíces

Posee una raíz principal que mide entre 1,20 m y 1,50 m dependiendo del suelo. En el cuello de la raíz nacen varias raíces secundarias dando lugar al desarrollo de raíces terciarias. Gran cantidad de estas raíces se encuentran entre 20 a 25 cm de profundidad del suelo en torno al árbol recubriendo el área de su copa de manera bastante irregular (*Figura 1*) (Enríquez, 1985, p.19).



Figura 1. Raíces de cacao.

Tomado de (Batista, 2009, p.1)

2.3.2. Tronco

El tronco tiende a crecer de manera vertical formando el primer verticilo entre 80 a 100 cm de altura revestido por hojas pecioladas. Después del primer año de vida de la planta, el tallo empieza a desarrollar varias yemas axilares que formarán la corona. Se suprime la yema terminal creciendo en su lugar 4 o 6 ramas de crecimiento lateral. El crecimiento de las ramas es indefinido pues crecen a causa de diversos factores, entre estos se encuentran la temperatura y el agua (*Figura 2*) (Enríquez, 1985, p.19).



Figura 2. Tronco de cacao.

2.3.3. Hojas

Las hojas poseen pigmentación variando su tonalidad desde verdes oscuras a verdes más claras. Las hojas del tronco son largas y las hojas de las ramas laterales son más pequeñas (*Figura 3*) (Enríquez, 1985, p.20).



Figura 3. Hojas de cacao.

2.3.4. Inflorescencias

La planta de cacao florece todo el año. El ambiente es un factor que contribuye en gran magnitud para su floración y el aspecto genético frecuentemente puede ser de mayor influencia. Las flores suelen estar en grupos en los troncos y también en las ramas de los árboles, estos se denominan cojines florales (*Figura 4*) (Enríquez, 1985, p.20).



Figura 4. Inflorescencias de cacao.

2.3.5. Flores

Se encuentran sostenidas por pequeños pedicelos. La flor es de tamaño pequeño con un diámetro de 1 a 2 cm. Es hermafrodita, pentámera y tiene un ovario súpero (*Figura 5*) (Enríquez, 1985, p.20).

El androceo posee diez filamentos, cinco de éstos son fértiles y se denominan estambres y el resto de éstos son infértiles los cuales se denominan estaminoides. Dichos filamentos son pigmentados y se encuentran ubicados en torno al pistilo (Enríquez, 1985, p.21).

Los estambres están volteados hacia atrás y son más pequeños que los estaminoides (Enríquez, 1985, p.21).

Según Enríquez (1985, p.21) los pétalos están constituidos por tres partes las cuales son la concha, el ribete y la lígula. La concha se origina de la base entre el sépalo y el estambre. El ribete que tiene un tamaño de 3 a 5 mm y es un filamento que tiene color blanco que podría poseer líneas de pigmentación o

color blanquecino total y la lígula o limbo que tiene color amarillo, se ubica hacia el exterior y se prolonga con el ribete.



Figura 5. Flor de cacao.

Tomado de (Batista, 2009, p.1)

2.3.6. Fruto

El fruto del cacao es una baya que es denominada mazorca. El fruto es la maduración del ovario que ha sido fecundado. Al madurar el fruto, los granos se encuentran recubiertos por una pulpa azucarada y mucilaginosa. El número de semillas que hay en cada fruto va a depender de la fecundación individual de los ovarios (Enríquez, 1985, p.22).

Según Enríquez (1985, p.22) el fruto se sostiene a través de un pedúnculo leñoso, siendo éste el resultado de la maduración del pedúnculo de la flor (*Figura 6*).



Figura 6. Fruto de cacao.

2.3.7. Semillas

Las semillas de la planta de cacao germinan prontamente cuando llegan a su madurez. La forma, el tamaño y la coloración de la semilla son variables (*Figura 7*) (Enríquez, 1985, p.22).



Figura 7. Semillas de cacao.

Tomado de (Batista, 2009, p.1)

2.4. Historia del cultivo de cacao en Ecuador

En Ecuador, el cacao ha sido cultivado desde tiempos precolombinos pero se desconoce gran parte de su historia. En América del Sur, los nativos no cultivaban ni usaban cacao en comparación con Mesoamérica y fueron los españoles quienes llevaron el cultivo de cacao a este lugar del continente. Existe evidencia histórica que indica que las primeras plantaciones comerciales en el Ecuador iniciaron a comienzos de 1600. La producción de cacao ecuatoriano en 1930 tuvo gran disminución debido al envejecimiento de las plantaciones y al ataque de plagas, concretamente por la enfermedad denominada escoba de bruja, moniliasis y mal de machete. A partir del mismo año existe un incremento sustancial de la producción de cacao ecuatoriano debido al reemplazo del tipo de cacao fino y de aroma que tiene menor productividad por cultivares que son más productivos (Boza et al., 2014, p.220).

En la actualidad, el cultivo de cacao CCN-51 “Colección Castro Naranjal (CCN)” es uno de los más difundidos y comunes en el Ecuador. A comienzos de 1960, esta variedad de cacao fue realizada por Homero Castro Zurita graduado en Agronomía del Instituto Interamericano de Cooperación para Agricultura (IICA) en Costa Rica. Castro desarrolló su investigación en su granja a la que llamó “Theobroma” ubicada en el Naranjal al sur de Guayaquil. El cacao CCN-51 es altamente productivo, además es resistente a enfermedades que atacan a este cultivo. Esta variedad produce vainas y habas grandes a los dos años de ser sembrado en campo. Las habas poseen alta cantidad de manteca alcanzando el 54%, siendo este uno de los más altos rendimientos para la industria del cacao (Boza et al., 2014, p.220). Este alto porcentaje de manteca la convierte en una variedad de cacao muy apreciada por las industrias (Bohórquez y Salazar, 2011, p.8).

El cacao CCN-51 supera fácilmente los 50 quintales por hectárea convirtiéndose en un cultivo rentable. Es una variedad precoz porque comienza su producción a los 24 meses de edad, tiene baja estatura y crecimiento erecto. De esta manera, facilita su poda y cosecha además de bajar el costo de dichas actividades. Tiene un índice de mazorca de 8 mazorcas/ lb de cacao seco y un índice de semilla de 1.45 g/semilla seca y fermentada. Posee 45 semillas por mazorca. Este tipo de cacao logra adaptarse a casi todas las zonas tropicales desde el nivel del mar hasta los 1000 m sobre el nivel del mar. Al realizarse un correcto manejo poscosecha, el cacao obtenido puede ser de primera calidad para exportación y su alto porcentaje de manteca hace de este un cacao muy cotizado en el mercado internacional (Bohórquez y Salazar, 2011, p.12).

Con todas estas características, el cacao CCN-51 es reconocido como una alternativa de producción y con el correcto procedimiento para realizar su fermentación (presecado), esta variedad de cacao logrará buenas características de calidad, en cuanto a una baja acidez (Bohórquez y Salazar, 2011, p.13).

2.5. Métodos de propagación vegetativa convencional y biotecnológica para cacao

2.5.1. Métodos de propagación vegetativa convencional

Varios investigadores de cacao han realizado diversos estudios para lograr el desarrollo de métodos eficaces y poco costosos para la propagación vegetativa de esta planta. De esta manera, se beneficiará el desarrollo agrícola y también industrial de este cultivo, contribuyendo así con un gran beneficio económico (Enríquez, 1985, p.101).

2.5.1.1. Propagación vegetativa por semillas

Es un método por reproducción sexual muy utilizado para la siembra de cacao. La aplicación de este método no es de alto costo (*Figura 8*) (Quiroz y Mestanza, 2010, p.2). La capacidad productiva de las plantas que se obtienen a través de este método, difiere de manera considerable (Enríquez, 1985, p.131).

Este método no ha dado los resultados esperados debido a la alta variabilidad genética de las plantaciones de cacao (Quiroz y Mestanza, 2010, p.2).



Figura 8. Método de propagación vegetativa por semillas en cacao.

Tomado de (AGROCALIDAD, 2016, p.6)

2.5.1.2. Propagación vegetativa por estacas

El método de propagación vegetativa por estacas es relativamente costoso y su aplicación necesita de instalaciones especiales (Enríquez, 1985, p.101).

Las plantas que van a seleccionarse deben ser podadas anticipadamente, suministrándoles riego con frecuencia. Se colecta ramillas de un árbol de cacao productivo, las mismas que se obtienen preferentemente en la mañana (*Figura 9*) (Quiroz, 2010, p.7).

Según Enríquez (1985, p.101) para esta técnica se han utilizado diversos métodos entre los cuales está el método de inmersión breve, mediante el cual la estaca es sumergida durante unos segundos en una mezcla de biorreguladores que contiene ácido indolbutírico (IBA) y ácido naftalenacético (ANA), para posteriormente ser plantada. También se aplica el método de polvo

donde se introduce la estaca en esta mezcla de biorreguladores y talco. Luego es plantada cuidadosamente para no retirar el polvo fitohormonal. Se utiliza también el método combinado en el cual en la parte basal de la estaca se realizan dos incisiones verticales, la misma que es sumergida en la solución de biorreguladores antes mencionada y de igual manera se aplica el método de planta madre donde se realizan dos incisiones horizontales en una rama. En las incisiones se coloca una mezcla de los mencionados biorreguladores, las cuáles son envueltas con musgo húmedo o algodón y papel impermeable durante un período de 7 a 10 días aproximadamente. Posteriormente las ramas que han comenzado a formar callo son extraídas y colocadas en arena para que finalicen el enraizamiento.



Figura 9. Método de propagación vegetativa por estacas en cacao.

Tomado de (Quiroz, 2010, p.7-8).

- a) Selección de estacas de cacao en campo.
- b) Siembra de estacas de cacao.

2.5.1.3. Propagación vegetativa por injerto

El método de injertación es práctico. Se recomienda el uso de material seleccionado en las fincas y adaptados a ciertas condiciones. Con este material vegetal se debe efectuar podas para excluir a frutos enfermos y también se debe suministrar riego con frecuencia en los cultivos (Quiroz y Mestanza, 2010, p.3). Este método consiste en agrupar partes de plantas, unirlos y de esta manera, continuarán con su crecimiento como una sola planta. Se denomina injerto, aguja, espiga o púa a la parte superior de la planta nueva. Por medio de esta técnica es posible la transferencia de las características acumuladas de una planta o en un clon procedente de esta a través de selección (*Figura 10*) (Enríquez, 1985, p.116). Con esta técnica se puede conseguir una planta que fructifica en menor tiempo en comparación con la propagación vegetativa por semillas (Quiroz y Mestanza, 2010, p.4).



Figura 10. Método de propagación vegetativa por injerto en cacao.

Tomado de (Quiroz y Mestanza, 2010, p.6).

2.5.1.4. Propagación vegetativa por acodos

La planta de cacao se propaga también por medio de acodos, los cuales generalmente enraízan de manera fácil. Sin embargo, existen casos en los que es complicado el establecimiento de la planta en campo y esto es el principal problema para el empleo de manera amplia de esta técnica de propagación (Enríquez, 1985, p.126).

Este método consiste en el desarrollo de raíces en un tallo que se encuentra unido a la planta materna (*Figura 11*). Posteriormente el tallo enraizado es apartado para transformarse en una planta nueva, es así que al tallo acodado se lo denomina acodo (Enríquez, 1985, p.126).

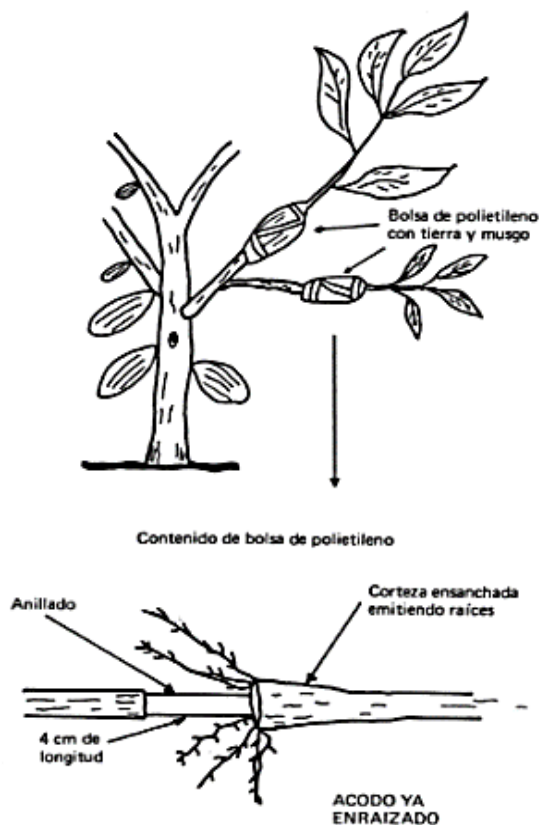


Figura 11. Método de propagación vegetativa por acodos en cacao.

Tomado de (Enríquez, 1985, p.128).

2.5.2. Métodos de propagación vegetativa biotecnológica

2.5.2.1. Cultivo de tejidos in vitro

Esta técnica se basa en el aislamiento de una parte de la planta denominado explante, al cual se le provee de manera artificial las condiciones físicas y químicas adecuadas para que las células logren expresar su potencial inducido. Al aplicar esta técnica se debe manejar procedimientos de asepsia y de esta manera obtener cultivos libres de contaminación microbiana (Roca y Mroginski, 1993, p.20).

2.6. Cultivo de callos

2.6.1. Generalidades y características del cultivo de callos

Un callo es una masa de células meristemáticas y células diferenciadas que crecen con un alto grado de desorganización (Pérez, 2006, p.23).

Cabe mencionar que la mayoría de callos se encuentran conformados por un conjunto de células vegetales. Estas células se dividen de manera activa permitiendo así el desarrollo del callo, lo que se genera en respuesta a heridas que sufra la misma (Pérez, 2006, p.23).

Generalmente en cultivo *in vitro*, los callos se forman en cualquier parte de la planta al inducirlo en órganos o partes de órganos de la misma como por ejemplo en hojas, flores, tallos, etc. (Pérez, 2006, p.23-24).

La inducción a callo *in vitro* requiere de varios componentes minerales, sacarosa, glucosa, entre otros, además de la presencia de reguladores de crecimiento, auxinas y citoquininas. En algunos casos, los tejidos vegetales forman callos solamente con la presencia de una auxina en su medio de cultivo, sin embargo otros tejidos vegetales requieren la presencia de una citoquinina o también la combinación de citoquinina y auxina (Pérez, 2006, p.24).

Cuando el callo se ha desarrollado a partir de su explante primario, éste es cultivado en un medio fresco y para mantener su cultivo, se lo divide en algunos trozos, los cuales son colocados de manera periódica en un medio fresco (Pérez, 2006, p.24).

2.6.2. Etapas de desarrollo del callo

El callo vegetal que se desarrolla a partir de un explante en cultivo in vitro tiene tres etapas de desarrollo (George, Hall y De Klerk, 2008, p.6).

La primera etapa comprende la inducción de la división celular. En la segunda etapa, el período de división celular se encuentra activa, en esta fase las células diferenciadas pierden sus características adquiridas y se convierten en células desdiferenciadas y en la tercera etapa, la división celular cesa cuando en el callo hay un incremento de diferenciación celular (George, Hall y De Klerk, 2008, p.6).

2.7. Embriogénesis somática

2.7.1. Generalidades y características de la embriogénesis somática

La embriogénesis somática es un proceso de iniciación y desarrollo de embriones que son obtenidos de células no sexuales o mediante gametos sin previa fecundación (Pérez, 2006, p.274).

Esta técnica es un proceso a través del cual las células somáticas experimentan diferenciación formando así una estructura que contiene tanto raíces como brotes. Estos embriones van a madurar y a germinar. Para inducir a este proceso, el callo del explante de la planta en investigación, se coloca en un medio que contiene auxina, para posteriormente colocarlos en un medio libre de biorreguladores para el desarrollo del embrión (Smith, 2013, p.84).

Mediante esta técnica, la propagación de material vegetal a partir de cultivos de células, tiene la mayor tasa de producción de plantas pues gran cantidad de embriones somáticos pueden desarrollarse en un solo frasco (Smith, 2013, p.84).

La embriogénesis somática puede desarrollarse para todas las especies de plantas siempre que exista el adecuado explante y medio de cultivo, además de condiciones ambientales apropiadas (George, Hall y De Klerk, 2008, p.342).

Existen dos formas distintas para la inducción de la embriogénesis somática, la embriogénesis somática directa e indirecta (Quiroz, Rojas, Galaz y Loyola, 2006, p.288) ya que los embriones somáticos pueden diferenciarse del explante directamente, es decir, sin atravesar la fase de callo o también indirectamente, después de atravesar la fase de callo (Von Arnold, 2008, p.335). Por esta razón se ha propuesto que en la embriogénesis somática directa, las células pro embriogénicas competentes se encuentran presentes por lo que la expresión del programa embriogenético exclusivamente depende de las condiciones favorables para su desarrollo, por el contrario para la embriogénesis somática indirecta es necesaria la desdiferenciación celular dando como resultado una masa de células indiferenciadas conocidas como callos y posteriormente alcanzar el estado embrionario (Quiroz, Rojas, Galaz y Loyola, 2006, p.289).

2.7.2. Origen de la embriogénesis somática

Steward *et al.* (1958) y Reiner (1958) observaron por primera vez la formación de embriones somáticos en suspensiones celulares de *Daucus carota* (Von Arnold, Sabala, Bozhkov, Dyachok y Filonova, 2001, p.235). Esto fue el inicio para lograr la inducción de la embriogénesis somática en varias especies monocotiledóneas y dicotiledóneas de diverso origen filogenético (Bardón, 2003). Desde entonces el potencial de la embriogénesis somática se ha establecido en varias especies de plantas (Von Arnold, Sabala, Bozhkov, Dyachok y Filonova, 2001, p.235).

Posiblemente la embriogénesis somática puede desarrollarse en todas las especies vegetales al usar el adecuado explante, el medio de cultivo y las condiciones ambientales apropiadas (Von Arnold, Sabala, Bozhkov, Dyachok y Filonova, 2001, p.235).

2.7.3. Etapas de la embriogénesis somática

La inducción de la embriogénesis somática consiste en el inicio de un programa de expresión de un gen embriogénico. Existen dos mecanismos que tienen importancia para la formación de células embriogénicas *in vitro*, la división celular asimétrica y el control de elongación celular. Se conoce que el primero es desarrollado por reguladores de crecimiento que alteran la polaridad de la célula al interferir con el gradiente de pH. Por otro lado, el segundo mecanismo está relacionado con los polisacáridos de la pared celular (George, Hall y De Klerk, 2008, p.343). La regeneración de plantas a través de este método comprende cinco fases.

En la primera fase que implica el inicio de cultivos embriogénicos, según la función y posición de una célula somática, esta se encuentra en una vía programada de diferenciación fisiológica, morfológica y bioquímica. Para que en esta vía se cumpla la desdiferenciación (*Figura 12*), la célula debe encontrarse receptiva a nuevas señales de desarrollo adquiriendo así la competencia embriogénica (Bhojwani y Dantu, 2013, p.81).

Un requerimiento para que la auxina u otro regulador de crecimiento, inicie el proceso de la embriogénesis somática está en gran parte definido por la etapa de desarrollo del tejido del explante. Generalmente, un callo embriogénico se desarrolla en un medio de cultivo que está constituido por una auxina y la más frecuentemente aplicada es el 2,4-ácido diclorofenoxiacético (2,4-D) (George, Hall y De Klerk, 2008, p.343).

En la segunda fase que implica la proliferación de los cultivos embriogénicos, una vez que se han constituido las células embriogénicas, estas continúan

desarrollándose hasta generar masas proembriogénicas (PEMs) para esto es necesaria la presencia de auxina. Se debe considerar la ausencia de auxina después de unos pocos días en el medio de cultivo, por esta razón los cultivos deberán ser transferidos cada semana a un medio fresco para que continúen desarrollándose y así proceder a la siguiente fase (George, Hall y De Klerk, 2008, p.344).

La tercera fase involucra la premaduración de los embriones somáticos, donde la función que cumple la masa proembriogénica es esencial, pues es probable que la incapacidad de varias líneas celulares embriogénicas para la formación de embriones somáticos esté relacionada con la interrupción en el proceso de transición de masa pro embriogénica a embrión. Se conoce que las auxinas sintéticas, como por ejemplo el 2,4-D, son eficientes para desarrollar el establecimiento y la proliferación de cultivos embriogénicos, pero comúnmente no se pueden metabolizar por las células como ocurre con las auxinas naturales. Por esta razón es esencial transferir los medios de cultivo embriogénicos a un medio sin presencia de auxina. De esta manera, al agotarse la auxina, el bloqueo sobre la expresión de los genes esenciales para la transición al estadio de corazón es eliminada (George, Hall y De Klerk, 2008, p.344).

La cuarta fase abarca la maduración de los embriones somáticos junto con cambios morfológicos y químicos. En varias especies es esencial la aplicación de ácido abscísico (ABA) para estimular la fase de maduración, pero en otros casos se aplica para la inhibición de la germinación precoz. Como resultado del tratamiento se obtiene un aumento en el número de embriones maduros formados (George, Hall y De Klerk, 2008, p.344).

Por último la quinta fase implica la regeneración de las plantas donde su supervivencia y crecimiento dependen de las condiciones proporcionadas en las fases tempranas. En general los embriones somáticos se convierten en plantas pequeñas en un medio de cultivo en el cual no hay presencia de

reguladores de crecimiento. Posteriormente cuando las plantas tengan un tamaño apropiado pueden ser trasladadas *ex vitro* (George, Hall y De Klerk, 2008, p.345).

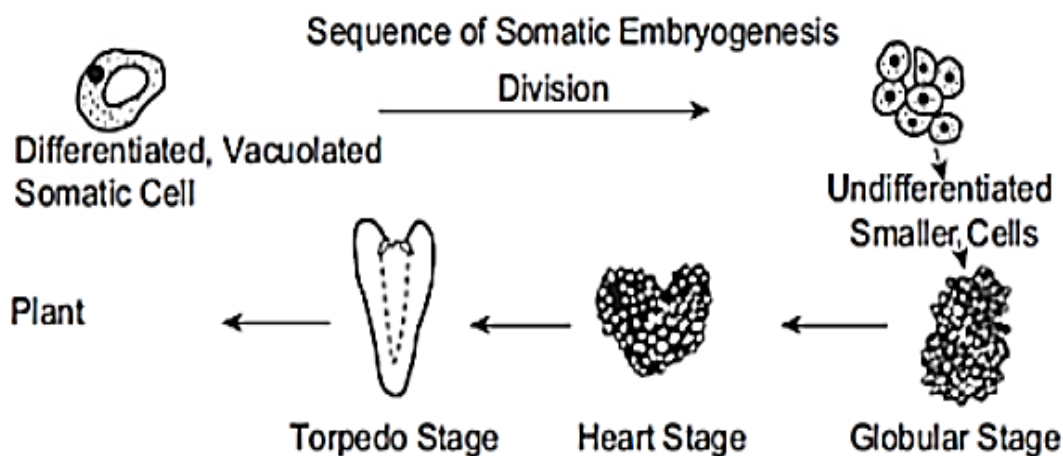


Figura 12. Fases de la embriogénesis somática.

Tomado de (Smith, 2013, p.85).

2.7.4. Factores que influyen en la embriogénesis somática

Existen varios factores que influyen en el desarrollo de la embriogénesis somática, entre los cuales está la elección del explante ya que el éxito en el logro de la embriogénesis somática en gran variedad de plantas se debe a la selección del explante. La selección del explante para obtener embriones somáticos se ha limitado a tejidos inmaduros o poco diferenciados, como por ejemplo partes florales jóvenes, hojas jóvenes, hipocótilos y embriones cigóticos inmaduros. Al aplicar los embriones cigóticos inmaduros como explantes se han obtenido exitosos resultados en la inducción de la embriogénesis somática en monocotiledóneas y dicotiledóneas debido a que los embriones cigóticos ya tienen células con competencia embriogénica, pero cuando se utiliza un explante diferenciado, en este caso las células deben ser

inducidas para convertirse en células embriogénicas (Bhojwani y Dantu, 2013, p.76).

En cuanto a medios de cultivo se ha aplicado con éxito al medio basal Murashige y Skoog (M&S) para el desarrollo de la embriogénesis somática en varias especies. Además en pocos casos también se ha utilizado al medio basal White añadiendo los suplementos adecuados. Asimismo la fuente de carbono más empleada es la sacarosa, pero también se ha aplicado a la glucosa y galactosa en diferentes especies y la fuente de nitrógeno también puede alterar el desarrollo de embriones somáticos, por ejemplo la caseína hidrolizada y los aminoácidos pueden incrementar la formación de los mismos (Bhojwani y Dantu, 2013, p.78).

Los reguladores de crecimiento vegetal también alteran el desarrollo de la embriogénesis somática. Generalmente se ha empleado a la auxina sintética 2,4-D, la cual también es aplicada como herbicida. Al colocarse en repetidos subcultivos, el callo embriogénico continua su multiplicación sin la aparición de embriones diferenciados. Existen otras auxinas que también fomentan la embriogénesis somática como el ácido indolacético (AIA), ácido 1-naftalenacético (ANA), ácido 3,6 dicloro-2-metoxibenzoico (dicamba), ácido indol propiónico (IPA) y el picloram y en cuanto a las citoquininas, se conoce que promueven la inducción de embriones somáticos. Entre ellas se encuentra la Zeatina y 6-benzilamino-purina (BAP) (Bhojwani y Dantu, 2013, p.78).

Otros de los factores importantes que influyen en la embriogénesis somática son la luz y la oscuridad pues tienen un efecto definitivo en el proceso de embriogénesis de las especies (Bhojwani y Dantu, 2013, p.80). La luz es una de las señales ambientales más importantes ya que está involucrada tanto en el crecimiento como en el desarrollo de las plantas. Además la intensidad y la duración de la luz proporcionada a los cultivos *in vitro* pueden intervenir en su respuesta morfogénica y su eficiencia. Generalmente se necesita fotoperiodo u oscuridad para inducir la embriogénesis somática. Además la influencia de la luz sobre la morfogénesis de la planta *in vitro* puede relacionarse con un efecto

estimulador e inhibitorio sobre diversas sustancias endógenas que incluyen a los reguladores de crecimiento (Gaj, 2004, p.29).

2.7.5. Genes relacionados con la embriogénesis somática

El mecanismo durante el cual las células somáticas alcanzan competencia embriogénica involucra la reprogramación de los patrones de expresión génica. Tanto la morfología como la fisiología y el metabolismo de las células varían significativamente debido a la desdiferenciación, la activación de la división celular y el cambio en el destino celular. Estos cambios se deben a la inactivación de los genes que funcionan en las células diferenciadas y la activación de aquellos que son necesarios para los procesos mencionados. Por lo tanto la reprogramación de la expresión de genes global es regido por genes reguladores y factores de transcripción de codificación (Fehér, Pasternak y Dudits, 2003, p.204).

Hay varios genes relacionados con la embriogénesis somática entre los cuales está el gen homeobox denominado *WUSCHEL* (*WUS*) el cual codifica un factor de transcripción que regula al conjunto de células madre en el meristemo del brote y está regulado por los genes *CLAVATA* (*CLV*). La expresión del gen *WUS* se localiza en el estadio embrionario corazón y el meristemo del brote de la planta a través de la regulación del conjunto de células madre puede continuar produciendo órganos durante toda la vida de la planta. El incremento en el número de células madre conlleva al aumento de la proteína *CLV* secretada para disminuir la expresión *WUS* y el número de células madre conservándolas constantes (Solís, Andrade, Sáenz, Oropeza y Castaño, 2012, p.600).

Entre los genes involucrados también está el gen *BABY BOOM* (*BBM*) el cual fue aislado de cultivos de embriones de microesporas de *Brassica napus*. Se observó su expresión durante la embriogénesis cigótica y el polen derivado de la embriogénesis somática. Se conoce que la expresión ectópica de *BBM* y *Arabidopsis BBM* en plantas transgénicas puede inducir la formación de

estructuras tipo embrión somático en los bordes de las hojas y también de los cotiledones, además de fenotipos pleiotrópicos implicando crecimiento neoplásico, hoja anormal y morfología de la flor. Por esta razón, posiblemente durante la embriogénesis el gen *BBM* sea un promotor de la proliferación celular y de la morfogénesis (Solís, Andrade, Sáenz, Oropeza y Castaño, 2012, p.600).

Otro de los genes que intervienen en la embriogénesis somática es el gen “*Somatic Embryogenesis Receptor like Kinase*” (*SERK*). Este gen se ha manifestado en una etapa temprana del proceso y se han relacionado con los procesos clave en el crecimiento de las plantas. El primer gen *SERK* fue identificado en células competentes de *Daucus carota* cultivada *in vitro*. Este gen codifica un tipo de quinasa de receptor transmembrana rica en leucina. La expresión de este gen se produce hasta la etapa globular pero no se encontró su expresión en otros tejidos vegetales (Solís, Andrade, Sáenz, Oropeza y Castaño, 2012, p.600).

Del mismo modo los genes homeobox *KNOX* son un grupo de factores de transcripción que cumplen con funciones fundamentales durante las fases de crecimiento y desarrollo de las plantas. La expresión de los genes *KNOX* tienen una función muy importante durante el desarrollo de la embriogénesis somática. Los genes *KNOX* se dividen en dos clases. Los genes de la clase I tiene una función clave en el desarrollo de la planta ya que regulan la especificación celular mientras que no se ha determinado una función específica para los genes de la clase II. Además se conoce solo unos pocos genes *KNOX* en gimnospermas y su función es desconocida (Belmonte, Tahir, Schroeder y Stasolla, 2007, p.2853). Una clase del gen homeobox *KNOX* denominado *HBK3* mejora el desarrollo de los embriones somáticos (Solís, Andrade, Sáenz, Oropeza y Castaño, 2012, p.608). *HBK3* puede estar implicado en la transdiferenciación de masas pro embriogénicas en embriones somáticos y en la formación de brotes en el meristemo apical embrionario (Belmonte, Tahir, Schroeder y Stasolla, 2007, p.2853).

2.7.6. Embriogénesis somática en cacao

La técnica de embriogénesis somática es la principal vía en la regeneración de plantas a partir del cultivo de tejidos de especies leñosas como el árbol de cacao. En los primeros estudios con respecto a la embriogénesis somática de cacao se utilizaron tejidos de embriones cigóticos inmaduros. Sin embargo, estos procedimientos fueron de poca utilidad para la propagación clonal de esta planta. Asimismo, se realizó la inducción de embriogénesis somática utilizando las hojas de cacao como explantes pero no se obtuvo la regeneración de la planta (Tan y Furtek, 2002, p.407).

Para la inducción a embriogénesis somática en cacao, los explantes más utilizados son los pétalos y los estaminoides. Los explantes florales de cacao se colectan al comienzo de la temporada de lluvia (Tan y Furtek, 2002, p.407).

En la fase de inducción a callo se tuvo dos tipos de callo, obteniéndose así un callo blanco compacto y otro friable amarillo. También al reemplazar sacarosa por glucosa o fructosa como fuente de carbono, la embriogénesis mejoró en esta especie ya que ambas proporcionan una fuente carbono que es sencillo de metabolizar. De igual manera para el medio de cultivo para embriogénesis somática en cacao se ha empleado comúnmente las sales M&S, sin embargo al aplicarse las sales DKW para la propagación *in vitro* de nogal que al igual que el cacao, es una planta leñosa, se obtuvieron mejores resultados ya que las sales DKW contienen una concentración mayor de magnesio, calcio y azufre en comparación con las sales M&S, por lo tanto estos elementos son posiblemente esenciales para la embriogénesis somática en cacao y la diferenciación de embriones en esta especie (Tan y Furtek, 2002, p.409).

3. CAPÍTULO III. DISEÑO DEL PLAN EXPERIMENTAL

En el diseño experimental de esta investigación se aplicó el diseño completamente al azar (DCA).

3.1. Tratamientos

Para la fase de inducción a callo, se planteó la unidad experimental conformada por un frasco de vidrio que contenía tres explantes florales de cacao CCN-51 en 25 mL de medio de cultivo.

Se aplicó 4 tratamientos: Tratamiento 1 (T1), Tratamiento 2 (T2), Tratamiento 3 (T3) y Tratamiento 4 (T4), en los cuales se utilizó las sales DKW modificado y un tratamiento testigo denominado Tratamiento 0 (T0), compuesto de sales M&S. Se consideró tres repeticiones por cada tratamiento.

Las fórmulas de los medios de cultivo de cada tratamiento que se aplicó, no pueden ser reveladas debido a aspectos de propiedad intelectual y confidencialidad de la empresa Orangetruck Agroindustrias S.A.

La diferencia que existió en cada uno de éstos fueron las diferentes concentraciones de los biorreguladores que se aplicaron en cada tratamiento.

3.2. Variables

Para la inducción a callo se evaluaron dos variables:

- Tiempo de aparecimiento de callo (semanas).
- Porcentaje de transformación de callo.

3.3. Diagrama de flujo del proceso

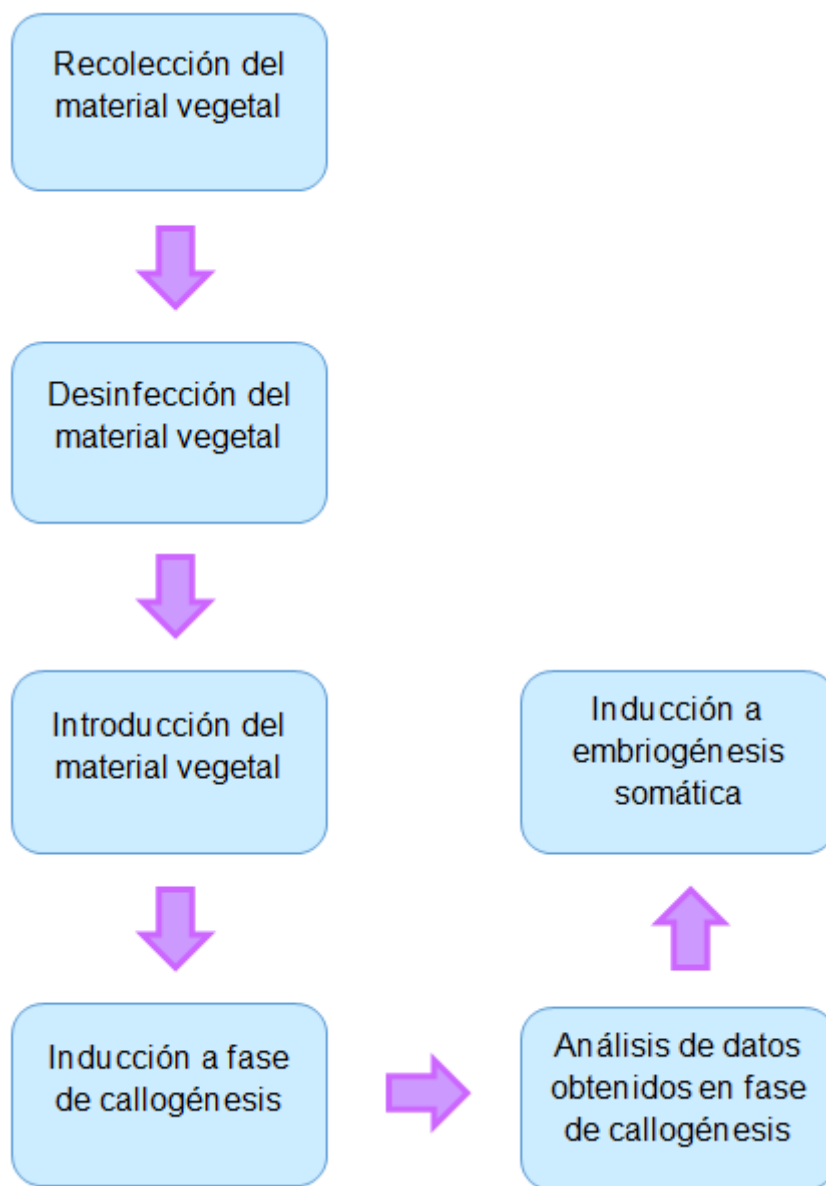


Figura 13. Diagrama de flujo del proceso.

4. CAPÍTULO IV. PROCEDIMIENTOS

4.1. Determinación de la población y muestra

La investigación se realizó en el laboratorio de la empresa Orangetruck Agroindustrias S.A. en la parroquia Yaruquí, sector San Carlos. El material vegetal se obtuvo en la finca Puente Payo, kilómetro 33 vía Durán-El Triunfo ubicada en la provincia del Guayas, Ecuador.

Se cortó con tijeras el pedúnculo de la flor de un árbol de cacao CCN-51. La flor cae directamente sin tocarla en una botella de agua purificada. Se colocaron 3 explantes florales por frasco por tratamiento. Cada repetición por tratamiento consta de 30 frascos lo que da un total de 90, lo que resultará en la obtención de un total de 270 explantes florales por tratamiento.

4.2. Materiales y métodos para la obtención de los datos

4.2.1. Desinfección del material vegetal

Todo el procedimiento de desinfección de los explantes florales de cacao CCN-51 se realizó en cámara de flujo laminar. Primeramente se procedió a desinfectar con alcohol al 70% toda la cámara de flujo. Los explantes florales fueron sumergidos en inmersión de agua estéril más tres gotas de Tween 20 durante diez minutos en agitación. Luego, se procedió a realizar cuatro lavados con agua estéril. Posteriormente, se colocan los explantes en una solución de hipoclorito de sodio al 1% durante cinco minutos. Finalmente, se efectúan cuatro lavados con agua estéril. En los lavados con agua estéril se colocó 0,1 g/L de ácido ascórbico (AA) (*Figura 14*).



Figura 14. Establecimiento *in vitro* de explantes florales de cacao CCN-51.

- a) Árbol de cacao CCN-51.
- b) Explantes florales de cacao CCN-51.
- c) Obtención del material vegetal.
- d) Selección de los explantes florales.
- e) Desinfección de los explantes florales.
- f) Introducción *in vitro* de los explantes florales.
- g) Corte transversal del explante floral.
- h) Explantes en medio de inducción a callo.

4.2.2. Introducción y fase de callogénesis

Para la introducción *in vitro* de los explantes florales de cacao CCN-51, dentro de la cámara de flujo laminar desinfectada, con la ayuda de un bisturí y una pinza de punta fina estériles, se realizó un corte transversal en la base de la flor, retirando los sépalos y el ovario del explante floral (*Figura 15*). El resto del explante con una pinza fue colocado en frascos de vidrio que contenían al medio de cultivo para inducción a callo.

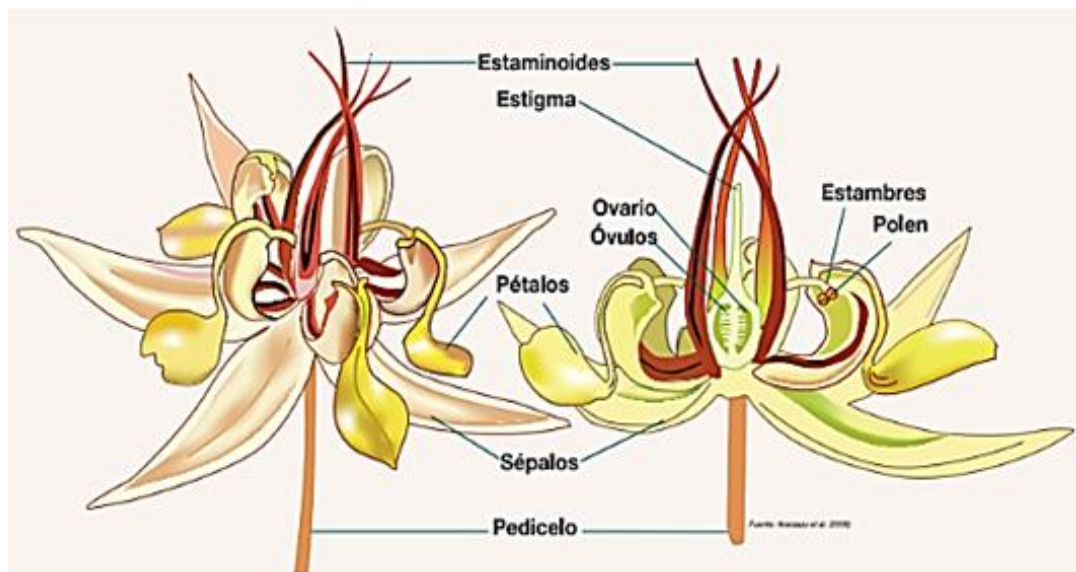


Figura 15. Partes de la flor de cacao.

Tomado de (CATIE, 2016, p.1).

Los frascos de cultivo fueron sometidos a condiciones de oscuridad a una temperatura de $27 \pm 3^{\circ}\text{C}$ con un pH de 5,7. Para inducir a los cultivos a la oscuridad, éstos se colocaron en una caja de cartón y fueron cubiertos con fundas de color negro evitando así el posible ingreso de luz durante cuatro semanas.

4.3. Evaluación estadística de los resultados

Para el análisis estadístico de datos se aplicó un análisis paramétrico de varianza (ANOVA) con el uso del paquete computacional SPSS, para encontrar diferencias significativas entre los cinco tratamientos. Tanto la variable tiempo de apareamiento de callo como la variable porcentaje de transformación de callo fueron evaluadas a partir de las primeras cuatro semanas de la introducción *in vitro* de los explantes florales de cacao CCN-51.

5. CAPÍTULO V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Obtención del material vegetal

Para este trabajo de investigación se emplearon las flores de cacao CCN-51 que fueron recolectadas y almacenadas correctamente para llevarlas al laboratorio. Es importante mencionar que la planta donante debe estar sana y bien caracterizada.

Debido a las constantes lluvias que se presentaron en la provincia del Guayas, las plantaciones de cacao CCN-51 en general han sufrido daño en sus tejidos, por lo tanto, las flores de esta planta se vieron afectadas por una hiperhidratación. Por lo tanto, la colecta del material vegetal se realizó mientras el día no se encontraba lluvioso.

Se conoce que la hiperhidricidad o también denominada vitrificación es la principal aberración morfológica que se ha podido observar en brotes en cultivo *in vitro*, puesto que daña a los mismos durante la micropropagación. El abundante contenido de agua de los brotes hiperhídricos se encuentra ubicado en los espacios intercelulares o como una capa de agua que envuelve a las células, lo que puede provocar un estrés adicional denominado hipoxia. El explante hiperhídrico presenta síntomas de necrosis en sus tejidos causando su muerte (Gaspar, Franck, Bisbis, Kevers, Jouve, Hausman y Dommès, 2002, p.275). Asimismo, la hiperhidricidad tiende a deteriorar la función de los estomas causando problemas en el establecimiento de las plantas *in vitro* (Cassells y Curry, 2000, p.148) pues siendo este un proceso irreversible, pierde la capacidad regenerativa del tejido vegetal (Franck, Gaspar, Kevers, Penel, Dommès, y Hausman, 2001, p.1145).

Frecuentemente este fenómeno durante la propagación vegetativa *in vitro*, produce malformaciones en plantas herbáceas y leñosas como el cacao. Los brotes afectados con hiperhidricidad indican estrés en la planta y presentan

ciertas características, por ejemplo apariencia vidriosa, turgencia y superficie acuosa. Al comparar un tejido normal con un tejido hiperhídrico, este último es translúcido, quebradizo y con frecuencia los brotes son menos verdes que el tejido normal (Gaspar, Kevers, Bisbis, Franck, Crevecoeur, Greppin y Dommes, 2000, p.174).

Además los brotes con hiperhidricidad se ven afectados por la pérdida progresiva de la totipotencia organogénica presentando también una deficiencia en la diferenciación celular. No se tiene conocimiento preciso acerca de la causa de esta pérdida en la capacidad de regeneración (Gaspar et al., 2000, p.175).

5.2. Desinfección del material vegetal

Para este experimento se seleccionaron botones florales cerrados para el proceso de desinfección, pues al utilizarlos abiertos se perdió gran parte de los explantes de interés, es decir pétalos y estaminoides.

En el proceso de desinfección los sépalos de los explantes florales comenzaron a oscurecerse adquiriendo un leve tono café y el agua se tornó del mismo color. Luego en el momento en el cual se añadió el hipoclorito de sodio, los explantes florales se oscurecieron aún más junto con el agua tomando un tono color café intenso.

Durante la desinfección los explantes florales se vieron afectados por un proceso de oxidación de los mismos (*Figura 16*). El problema de oxidación durante el proceso de desinfección de los explantes florales se puede lograr disminuyendo el tiempo de desinfección, además del reemplazo del agente desinfectante (*Figura 16*), ya que en otras especies como *Syzygium cuminii*, este agente aumentó el problema de oscurecimiento de sus explantes (Azofeifa, 2009, p.157).

Otra de las causas para la oxidación de los explantes en la desinfección es la concentración y tiempo de aplicación del hipoclorito de sodio ya que fomenta el proceso de oscurecimiento de los tejidos que van a emplearse *in vitro* y también aumenta la exudación de fenoles (Azofeifa, 2009, p.157).

Para reducir niveles de oxidación se aplicaron estrategias en cuanto al manejo de las sustancias fenólicas de los explantes antes de comenzar con el proceso de desinfección, se aplicó un pretratamiento basado en la realización de enjuagues con agua destilada estéril, realizándose el mismo procedimiento después de finalizado el proceso de desinfección, ya que es esencial tanto eliminar el agente desinfectante como los fenoles oxidados que se obtienen durante este proceso (Azofeifa, 2009, p.157).

Por estas razones al aplicar la desinfección de los explantes, se realizó el pretratamiento con agua estéril mencionado anteriormente. También se redujo el tiempo de desinfección, se utilizó un detergente más suave y se disminuyó la cantidad de cloro para este proceso. Sin embargo, no se obtenían resultados favorables ya que el explante floral se oxidaba rápidamente lo que provocaba que no se logre continuar con la fase de inducción a callo. Por este motivo se procedió con la aplicación del antioxidante más utilizado para el cultivo de tejidos vegetales *in vitro* como es el AA ya que inhibe la oxidación de los explantes que son vulnerables a este fenómeno como ocurre en el caso del cacao (Azofeifa, 2009, p.163). Su mecanismo de acción consiste en la descomposición o prevención de la formación de los intermediarios de oxígeno reactivo (ROS). Asimismo, los antioxidantes contienen agentes reductores que remueven el oxígeno de las moléculas, además de evitar el oscurecimiento de los tejidos vegetales (Azofeifa, 2009, p.163).

De esta manera para la fase de desinfección de los explantes florales de cacao CCN-51 se añadió el AA, tomando en cuenta que es un reactivo que se degrada en el proceso de autoclavado, por lo que este debe ser añadido directamente o debe ser aplicado a través de un filtro estéril (Azofeifa, 2009,

p.163). Para este caso fue agregado al agua que va a utilizarse para la desinfección de los explantes.

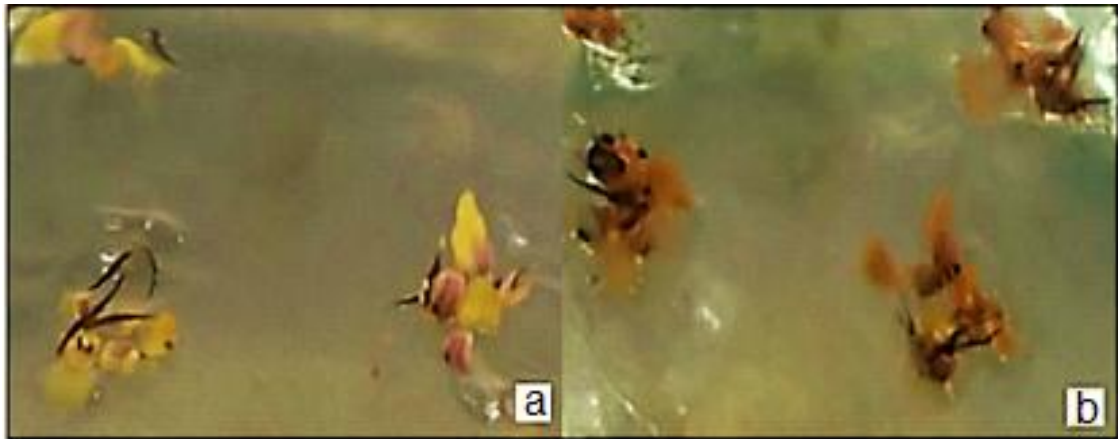


Figura 16. Explantes florales de cacao CCN-51.

- a) Explantes florales sin oxidación.
- b) Explantes florales con oxidación.

La aplicación de un único método no fue eficiente para solucionar todos los inconvenientes que se presentaron durante esta investigación, debido a la complejidad de esta planta leñosa, razón por la cual se necesitó de un conjunto de soluciones que implique más variantes y contribuyan a mitigar el efecto de los problemas generados por oxidación e hiperhidricidad.

Fue esencial agregar el AA, así como también la aplicación del pretratamiento con agua estéril mencionado anteriormente, disminuyendo el tiempo de desinfección, la aplicación de un detergente como el tween 20 y disminuyendo la cantidad de cloro del 3% al 1% evitando de esta manera el incremento del proceso de oxidación de estos explantes florales y finalmente poder continuar con la fase de inducción a callo.

5.3. Introducción y fase de callogénesis

En los primeros ensayos en cámara se procedió a realizar un corte transversal en los explantes florales y se observó al abrirlo que el explante presentaba oscurecimiento y un tono color café intenso.

El largo viaje que se realizó desde el cantón Durán a Yaruquí con las flores de cacao CCN-51 provocó estrés oxidativo a los explantes florales.

El estrés oxidativo promueve la formación de ROS. Éste se forma durante las reacciones redox y durante la reducción incompleta de oxígeno o de oxidación del agua (Gaspar et al., 2002, p.279). ROS es un intermediario metabólico en la fotosíntesis y en la respiración. Posee toxicidad natural citoplasmática y es controlado a través de antioxidantes (Cassells y Curry, 2000, p.151).

Algunos de los factores que causan estrés oxidativo son la luz UV, lesiones, las condiciones de luz intensa, el estrés por frío y calor. Además este fenómeno ocurre durante la senescencia (Gaspar et al., 2002, p.271).

Las plantas como el cacao CCN-51 contienen concentraciones altas de sustancias fenólicas que se oxidan cuando las células están heridas o senescentes. El tejido vegetal no crece y se torna de color negro o marrón (George, Hall y De Klerk, 2008, p.410).

En plantas leñosas como el cacao CCN-51 el establecimiento *in vitro* está limitado por la presencia de oscurecimientos letales tanto en los explantes como en el medio de cultivo. Como ya se conoce este fenómeno es uno de los problemas más serios ya que afectan desde el inicio y durante el establecimiento *in vitro*, además que está relacionado con el estrés oxidativo que sufren las células del explante *in vitro*. Esto ocurre debido a un desbalance por la presencia excesiva de ROS. El estrés oxidativo está relacionado con el desencadenamiento de desórdenes fisiológicos y morfológicos que afectan a los explantes como la recalcitrancia (George, Hall y De Klerk, 2008, p.356).

La recalcitrancia es la incapacidad de los tejidos, órganos y células vegetales para responder al empleo del cultivo de tejidos. Éste es un factor que limita el desarrollo biotecnológico de algunas plantas que tienen importancia económica como el cacao pues este fenómeno se convierte en un obstáculo para la aplicación de técnicas de cultivo *in vitro* (Benson, 2000, p.141). La recalcitrancia del cacao también afectó en gran medida su introducción *in vitro* ya que esta planta leñosa no tolera la desecación ni temperaturas bajas y debe mantener un buen suplemento de oxígeno (Azofeifa, 2009, p.160).

Tanto el estrés oxidativo como la recalcitrancia y la hiperhidricidad son fenómenos multifactoriales complejos que se basan en el genotipo, interacciones del medio e interacciones ambientales (Cassells y Curry, 2000, p.153).

Por lo tanto para los ensayos posteriores de esta investigación, además de aplicar todos los procedimientos mencionados para evitar el incremento del proceso de oxidación de estos explantes florales en el proceso de desinfección, también se añadió el AA al medio de inducción a callo mejorando visiblemente la apariencia del explante floral. Finalmente, se logró el establecimiento *in vitro* de los explantes florales de cacao CCN-51 en los cuatro tratamientos junto con el testigo.

En cuanto al desarrollo de los explantes en el medio de inducción a callo se observó en la primera y segunda semana el aumento en el volumen de los mismos (*Figura 17*). En la tercera semana los explantes se agrandaron en mayor proporción comenzando la formación de callos (*Figura 18*) y finalmente en la cuarta semana se logró observar la formación de callos de cacao CCN-51 (*Figura 19*). En esta semana los callos presentan color café oscuro y son de consistencia suave.

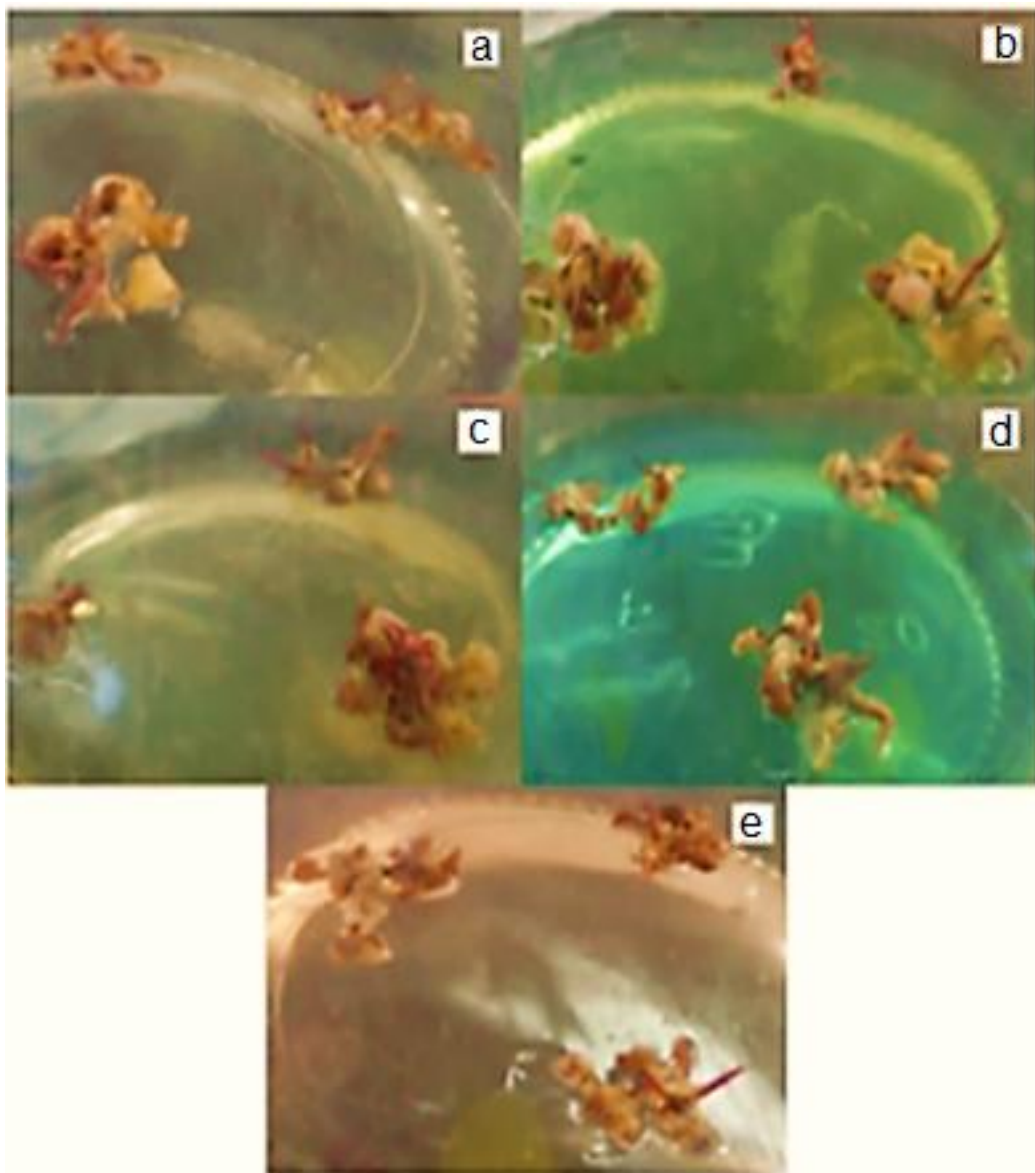


Figura 17. Primera y segunda semana de los explantes florales de cacao CCN-51 en el medio de inducción a callo.

- a) En T0
- b) En T1
- c) En T2
- d) En T3
- e) En T4

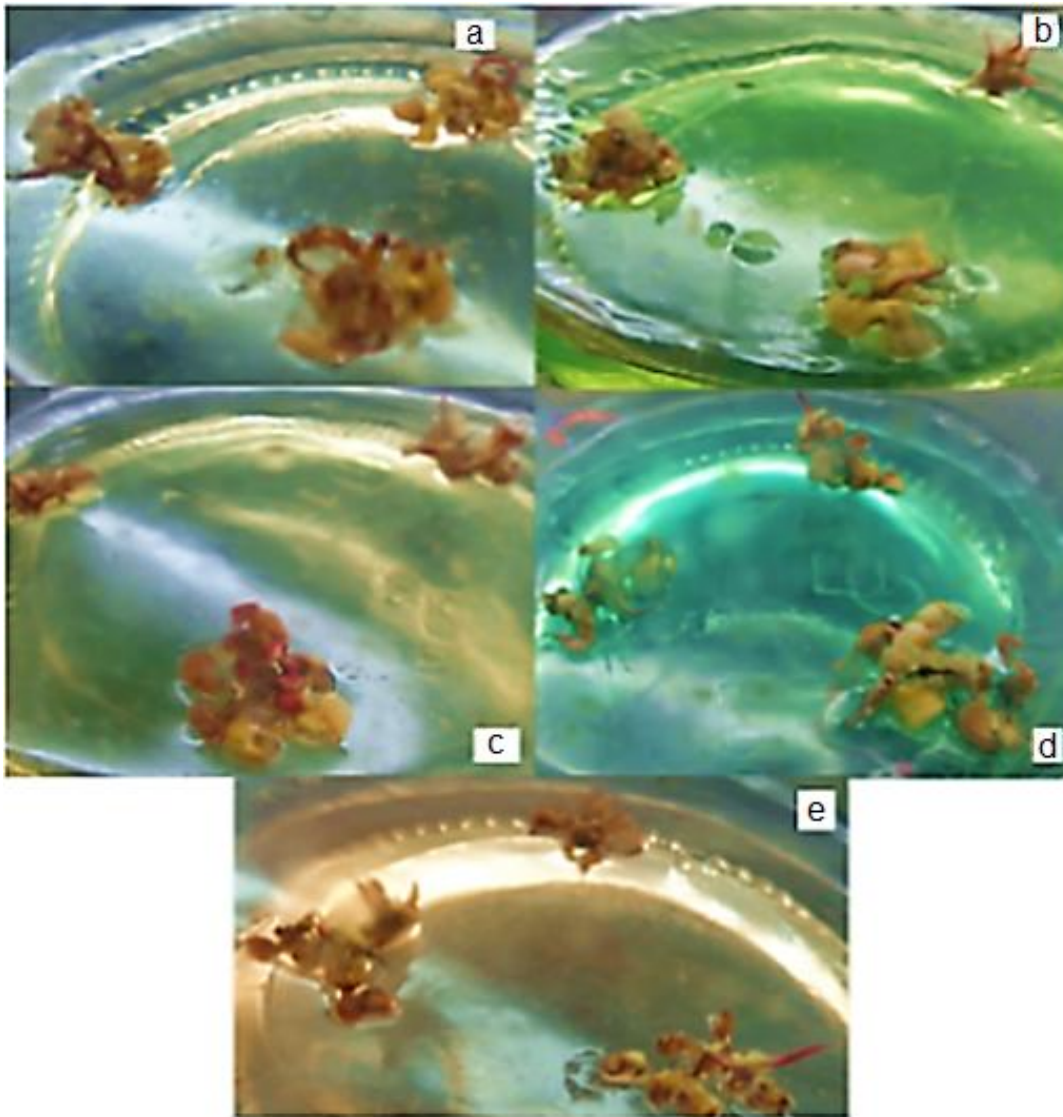


Figura 18. Tercera semana de los callos de cacao CCN-51 en el medio de inducción a callo.

- a) En T0
- b) En T1
- c) En T2
- d) En T3
- e) En T4

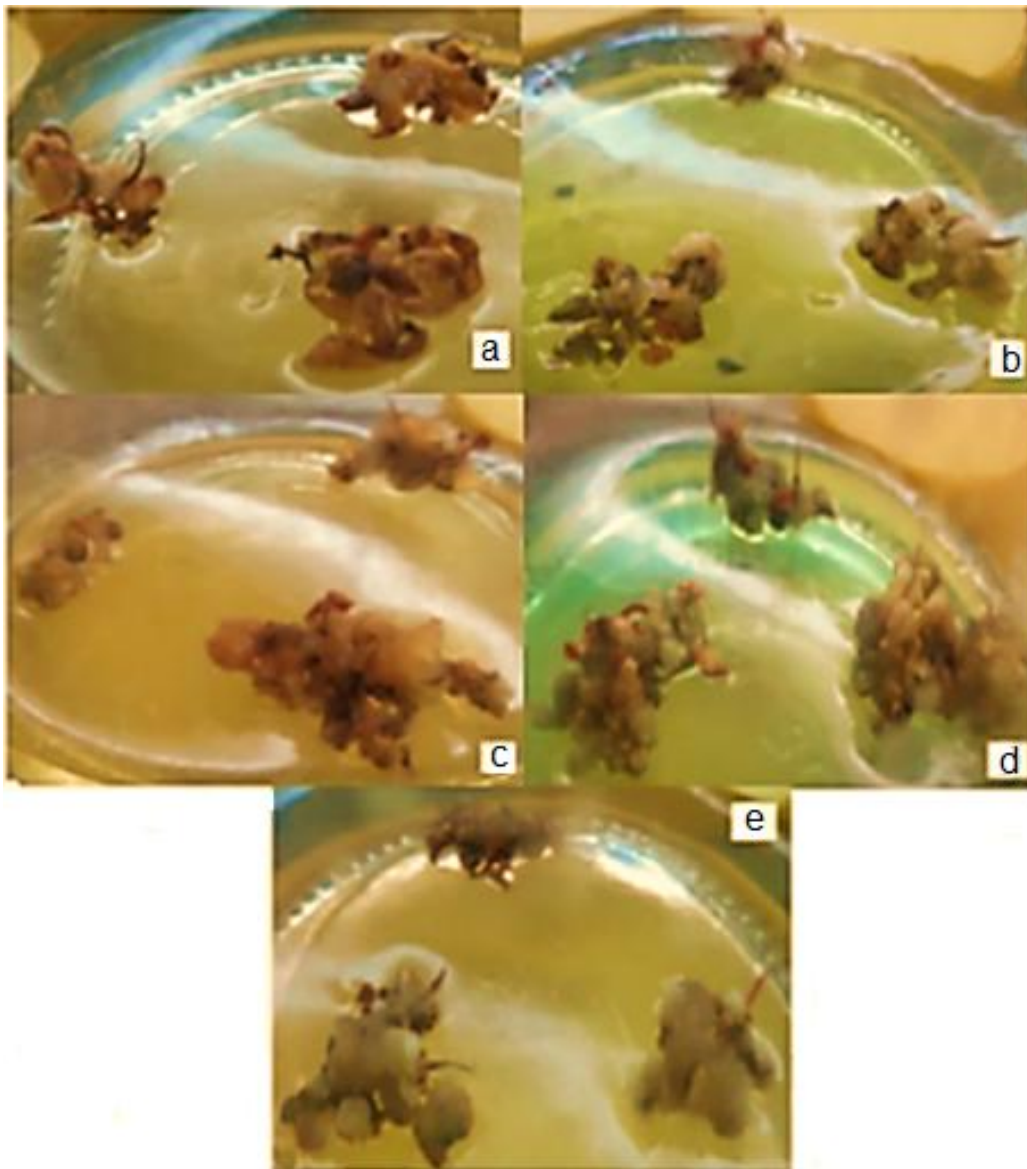


Figura 19. Cuarta semana de los callos de cacao CCN-51 en el medio de inducción a callo.

- a) En T0
- b) En T1
- c) En T2
- d) En T3
- e) En T4

La oxidación, la recalcitrancia y la hiperhidricidad son fenómenos que se presentaron a lo largo de esta investigación en los tejidos vegetales de las

flores de cacao generando daños e incluso la muerte celular de los explantes florales; convirtiéndose en un gran impedimento para lograr evaluar la capacidad de regeneración de embriones somáticos.

5.3.1. Tiempo de apareamiento de callo

El tiempo de apareamiento de callo se determinó a partir de la cuarta semana. El T2 fue el que menor tiempo tardó en la aparición de callos en la fase de inducción, pues se logró obtenerlos a las 3,37 semanas de la introducción en el medio de cultivo para inducción a callo, seguido del T4 a las 3,50 semanas y el T1 a las 3,55 semanas (*Figura 20*).

El T3 fue el que mayor tiempo demoró en presentar callos, obteniéndolos a las 3,61 semanas.

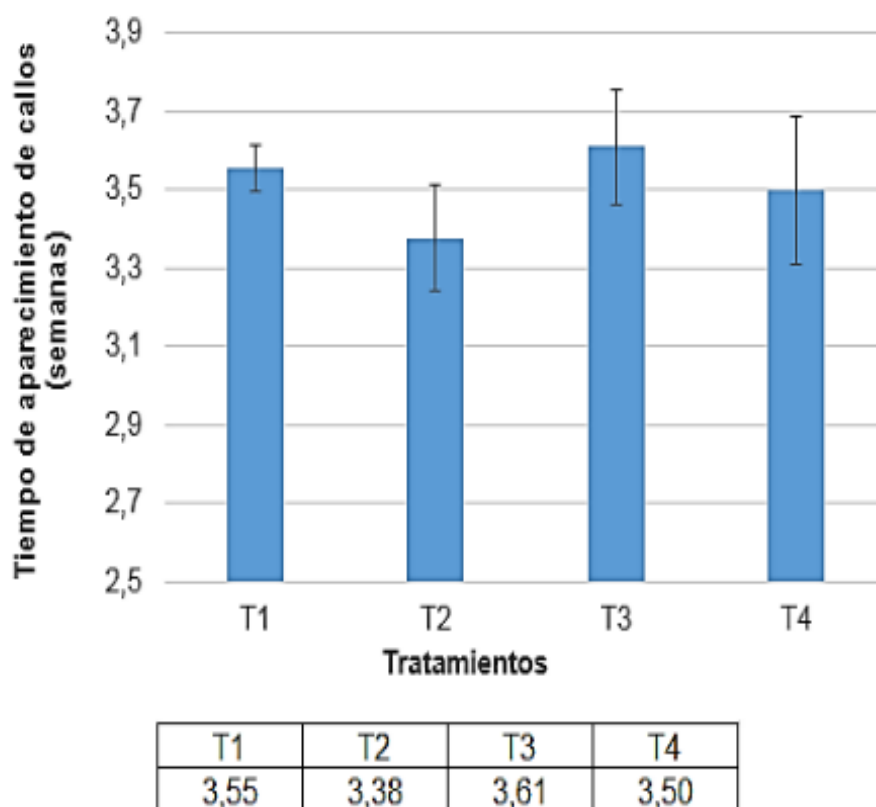


Figura 20. Tiempo de apareamiento de callos (semanas) en la fase de inducción de los explantes florales de cacao CCN-51.

El valor P obtenido a partir del ANOVA es mayor que el nivel de significancia nominal de la prueba 0,05, por lo tanto no existe diferencia significativa entre los diversos tratamientos que se aplicaron para la variable de tiempo de apareamiento de callo en la fase de inducción.

Puede considerarse al T2 como el mejor de todos los tratamientos ya que se demoró menos tiempo en desarrollar callos en el medio de cultivo. Por lo tanto, es el más viable debido a su corto tiempo de desarrollo.

Chanatásig, (2004, p.32) evaluó el tiempo de apareamiento de callo en 3 clones de cacao SCA6, UF273 y PA169 del CATIE a los 14 días de cultivo. La respuesta varió dependiendo de los clones. El clon SCA6 presentó un mayor desarrollo de callo en el medio de inducción, mientras que los clones UF273 y PA169 presentaron menor desarrollo; a pesar del incremento en el volumen del explante.

Mata, (2013, p.34) investigó la inducción a callo en los explantes florales de la variedad de cacao CATIE-R4 del CATIE. En los primeros días el comportamiento de los explantes fue muy parecido entre sí. En la segunda semana se observaron formaciones de agregados celulares sobre los explantes y luego de dos meses se formó por completo callos de color café oscuro y otros en menor número de color blanco. Cabe mencionar que los callos de color café oscuro se desarrollaron en mayor proporción al embrión.

Urrea, Atehortúa y Gallego, (2011, p.41) evaluaron la fase de inducción a callo de dos clones élite de *Theobroma cacao* L. denominados BIOB y ICS95 que fueron compartidos por la Compañía Nacional de Chocolates (CNCH), departamento de Santander. Los explantes florales en los dos clones de cacao aumentaron dos veces su tamaño original para luego generar un callo de color blanco con consistencia dura y granular. Asimismo en las dos variedades de cacao la generación del callo fue de 90% al transcurrir un mes de su cultivo.

5.3.2. Porcentaje de transformación de callo

El porcentaje de transformación de callo se determinó a partir de la cuarta semana. El T4 presentó el mayor porcentaje de transformación de callo en la fase de inducción con el 99,99% (*Figura 21*), lo cual está relacionado con la cantidad de auxina 2,4-D que se empleó en el medio de cultivo ya que este tratamiento tenía la mayor concentración de dicha fitohormona. Según Mishiba, Okamoto y Masahiro, (2000, p.146) el 2,4-D no afecta el crecimiento celular en el tejido vegetal mientras éste no se encuentre en altas concentraciones en el medio de cultivo. A una concentración superior esta auxina inhibe la proliferación de callos lo cual influye tanto en la cantidad como en la calidad de los mismos (Malik, Rashid, Yasmin y Minhas, 2004, p.157).

Los tratamientos que presentaron los menores porcentajes de transformación de callo fueron el T3 con 98,14%, seguido del T1 con 92,59% y finalmente el T2 con el 90,73% (*Figura 21*).

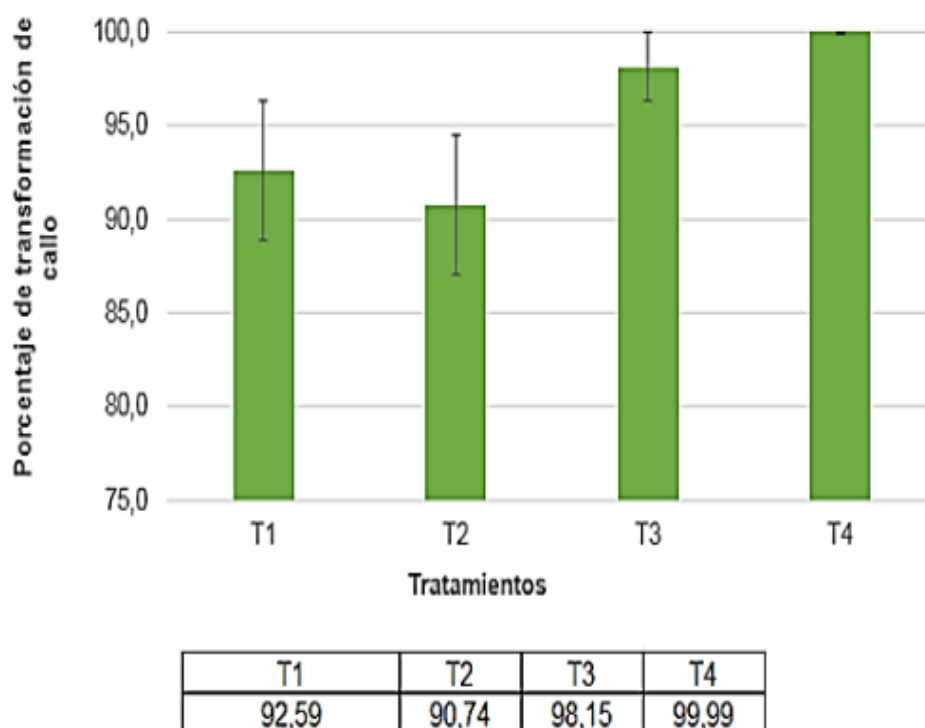


Figura 21. Porcentaje de transformación de callos en la fase de inducción de los explantes florales de caca CCN-51.

De acuerdo al valor P obtenido del ANOVA, el cuál es mayor que el nivel de significancia de 0,05 se aprecia que no hay una diferencia significativa en el porcentaje de transformación de callo en esta fase de inicio ya que el callo tarda más tiempo en desarrollarse completamente y en la cual todos los explantes florales se encontraban desarrollando el callo de manera simultánea. Por esta razón, se planteó una escala para determinar si existe la transformación del explante a callo, en la cual un aumento en el volumen del explante fue considerado como parte del proceso de formación de callo en el medio de cultivo.

A pesar de que no existen diferencias significativas para las dos variables de estudio, en relación a la selección del medio de cultivo para la inducción a callo de cacao CCN-51, se optaría por el medio de cultivo del T4, ya que con el mismo se obtuvo el mayor porcentaje de callos por transformación en la fase de inducción con respecto al resto de los tratamientos aplicados en este experimento.

Sin embargo, el T4 no fue el que menor tiempo se demoró en la aparición de callos en la fase de inducción (3,50 semanas). No obstante, se optaría por aplicar el medio de cultivo de este tratamiento ya que a pesar de no presentar el menor tiempo en la aparición de callos, se obtuvo mayor cantidad de los mismos en esta especie vegetal lo cual es beneficioso a nivel agronómico.

5.4. Protocolo para la obtención de callos de cacao CCN-51

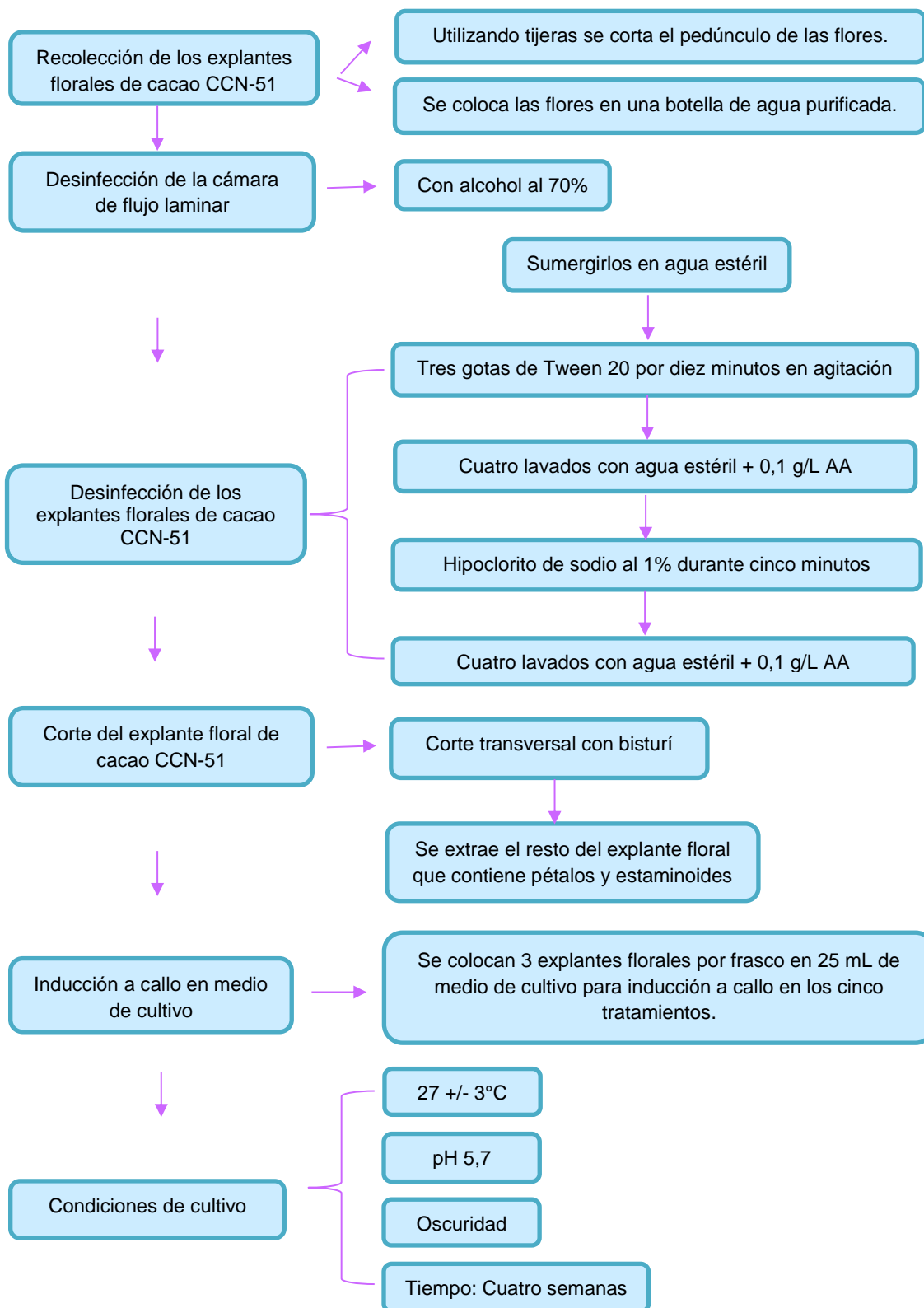


Figura 22. Protocolo para la obtención de callos de cacao CCN-51.

6. CONCLUSIONES

En las variables tiempo de apareamiento y porcentaje de transformación de callo en la fase de inducción no existen diferencias significativas en los distintos tratamientos, sin embargo se considera al T2 y al TB4 como los mejores para cada variable respectivamente, respectivamente.

Se selecciona al T4 como el más viable a pesar de que no es el que menor tiempo se demora en la aparición de callos en la fase de inducción, sin embargo se obtiene mayor cantidad de callos de cacao CCN-51 siendo esto conveniente a nivel agronómico.

La recalcitrancia, el estrés oxidativo y la hiperhidricidad afectan en gran medida a los explantes florales y callos de cacao CCN-51 pues provocan daño y muerte celular de los mismos convirtiéndose en un obstáculo que impidió evaluar la capacidad de regeneración de embriones somáticos.

REFERENCIAS

- AGROCALIDAD. (2012). Guía de buenas prácticas agrícolas para cacao resolución técnica no.183. Recuperado el 25 de septiembre de 2015 de <http://www.agrocalidad.gob.ec/wp-content/uploads/2015/07/Guia-BPA-cacao1.pdf>
- AGROCALIDAD. (2016). Manual de aplicabilidad de buenas prácticas agrícolas para cacao. Recuperado el 19 de octubre de 2016 de <http://www.agrocalidad.gob.ec/wp-content/uploads/pdf/inocuidad/manuales-aplicabilidad/manual-aplicabilidad-cacao-nuevo.pdf>
- Azofeifa, A. (2009). Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados *in vitro*. Recuperado el 3 de febrero de 2016 de http://www.mag.go.cr/rev_mesos/v20n01_153.pdf
- Banco Central del Ecuador. (2002). La ventaja comparativa del cacao ecuatoriano. Recuperado el 9 de octubre del 2016 de <https://contenido.bce.fin.ec/documentos/PublicacionesNotas/Catalogo/Apuntes/ae20.pdf>
- Banco Central del Ecuador. (2013). Situación coyuntural del sector agropecuario. Recuperado el 24 de febrero de 2016 de <https://contenido.bce.fin.ec/documentos/PublicacionesNotas/Catalogo/Encuestas/Coyuntura/Integradas/etc201302.pdf>
- Bardón, R. (2003). Aspectos relacionados con el ambiente físico y la caracterización molecular de la embriogénesis somática. Recuperado el 10 de marzo de 2016 de <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/264/635>
- Batista, L. (2009). Morfología de la planta de cacao. Recuperado el 9 de octubre de 2016 de <http://www.fundesyam.info/biblioteca.php?id=3096>
- Belmonte, M., Tahir, M., Schroeder, D. y Stasolla, C. (2007). Overexpression of HBK3, a class I KNOX homeobox gene, improves the development

- of Norway spruce (*Picea abies*) somatic embryos. Recuperado el 28 de abril de 2016 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17617659>
- Benson, E. (2000). *In vitro* plant recalcitrance: an introduction. Recuperado el 11 de abril de 2016 de <https://link.springer.com/article/10.1007/s11627-000-0029-z>
- Bhojwani, S. y Dantu, P. (2013). Plant tissue culture: an introductory text. Recuperado el 18 de abril de 2016 de <http://www.springer.com/us/book/9788132210252>
- Bohórquez, B., y Salazar, C. (2011). *Efectos de dos bioestimulantes enraizantes en el cultivo de cacao (Theobroma cacao L.) con el clon CCN-51 en el cantón la Troncal provincia del Cañar*. (Tesis de grado). Universidad de Guayaquil.
- Boza, E., Motamayor, J., Amores, F., Cedeño, S., Tondo, C., Livingstone, D., Schnell, R., y Gutierrez, O. (2014). Genetic Characterization of the Cacao Cultivar CCN 51: Its Impact and Significance on Global Cacao Improvement and Production. Recuperado el 29 de octubre de 2016 de <http://journal.ashspublications.org/content/139/2/219.full.pdf+html>
- Cassells, A. y Curry, R. (2000). Oxidative stress and physiological, epigenetic and genetic variability in plant tissue culture: implications for micropropagators and genetic engineers. Recuperado el 13 de agosto de 2016 de https://www.researchgate.net/publication/224092596_Oxidative_stress_and_physiological_epigenetic_and_genetic_variability_in_plant_tissue_culture_Implications_for_micropropagators_and_genetic_engineers
- CATIE. (2016). La flor de cacao. Recuperado el 16 de octubre de 2016 de <http://orton.catie.ac.cr/repdoc/A4949e/A4949e.pdf>
- Chanatásig, C. (2004). *Inducción de la embriogénesis somática en clones superiores de cacao (Theobroma cacao L.), con resistencia a enfermedades fungosas*. (Tesis de Maestría). Recuperado el 14 de marzo de 2016 de

- http://repositorio.bibliotecaorton.catie.ac.cr/bitstream/handle/11554/5238/Induccion_de_la_embriogenesis_somatica.pdf?sequence=1
- Deo, P., Tyagi, A., Taylor, M., Harding, R., y Becker, D. (2010). Factors affecting somatic embryogenesis and transformation in modern plant breeding. Recuperado el 23 de septiembre de 2016 de <http://www.publish.csiro.au/sp/pdf/SP10002>
- Enríquez, G. (1985). Curso sobre el cultivo de cacao. Recuperado el 4 de enero de 2016 de <https://books.google.com.ec/books?hl=es&lr=&id=eZgOAQAIAAJ&oi=fnd&pg=PA5&dq=color+de+las+flores+de+cacao+&ots=lpuQ13Uj5F&sig=0xLdcl5SsxQ91-LcTinsjYmhYLU#v=onepage&q=color%20de%20las%20flores%20de%20cacao&f=false>
- Fehér, A., Pasternak, T. y Dudits, D. (2003). Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. Recuperado el 13 de marzo de 2016 de <https://link.springer.com/article/10.1023/A%3A1024033216561>
- Franck, T., Gaspar, T., Kevers, C., Penel, C., Dommès, J. y Hausman, J. (2001). Are hyperhydric shoots of *Prunus avium* L. energy deficient?. Recuperado el 22 de febrero de 2016 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11337071>
- Gaj, M. (2004). Factors influencing somatic embryogenesis induction and plant regeneration with particular reference to *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Recuperado el 12 de marzo de 2016 de https://www.researchgate.net/publication/225871640_Factors_Influencing_Somatic_Embryogenesis_Induction_and_Plant_Regeneration_with_Particular_Reference_to_Arabidopsis_thaliana_L_Heynh
- Gaspar, T., Franck, T., Bisbis, B., Kevers, C., Jouve, L., Hausman, J. y Dommès, J. (2002). Concepts in plant stress physiology. Application to plant tissue cultures. Recuperado el 22 de mayo de 2016 de <https://link.springer.com/10.1023/A:1020835304842>
- Gaspar, T., Kevers, C., Bisbis, B., Franck, T., Crevecoeur, M., Greppin, H. y Dommès, J. (2000). Loss of plant organogenic totipotency in the

- course of *in vitro* neoplastic progression. Recuperado el 19 de julio de 2016 de <https://link.springer.com/article/10.1007/s11627-000-0033-3>
- George, E., Hall, M. y De Klerk, G. (2008). *Plant propagation by tissue culture*. (3.^a ed.). Países Bajos: Springer. Recuperado el 28 de agosto de 2016 de <http://www.springer.com/us/book/9781402050046>
- Herrmann, L., Felbinger, C., Haase, I., Rudolph, B., Biermann, B., y Fischer, M. (2015). Food Fingerprinting: Characterization of the Ecuadorean Type CCN-51 of *Theobroma cacao* L. Using Microsatellite Markers. Recuperado el 19 de septiembre de 2016 de <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.jafc.5b01462>
- ITIS. (2016). *Theobroma cacao* L. Recuperado el 24 de noviembre de 2015 de http://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=505487
- MAGAP. (2014). Boletín situacional cacao del MAGAP. Recuperado el 8 de enero de 2016 de <http://sinagap.agricultura.gob.ec/phocadownloadpap/cultivo/2014/db-oletin-situacional-de-cacao-2014-actualizado.pdf>
- Malik, S., Rashid, H., Yasmin, T. y Minhas, N. (2004). Effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on callus induction from mature wheat (*Triticum aestivum* L.) seeds. Recuperado el 14 de mayo de 2016 de https://www.fsublishers.org/published_papers/12096_.pdf
- Mata, A. (2013). Evaluación de dos protocolos para la inducción de embriogénesis somática en clones de cacao (*Theobroma cacao* L.) seleccionados por el Programa de Mejoramiento Genético de Cacao del CATIE. (Tesis de maestría). Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE).
- Maximova, S., Alemanno, L., Young, A., Ferriere, N., Traore, A., y Gultinan, M. (2002). Efficiency, genotypic variability, and cellular origin of primary and secondary somatic embryogenesis of *Theobroma cacao* L. Recuperado el 23 de enero de 2016 de <https://link.springer.com/article/10.1079/IVP2001257>

- Maximova, S., Young, A., Pishak, S., y Gultinan, M. (2008). Field performance of *Theobroma cacao* L. plants propagated via somatic embryogenesis. Recuperado el 21 de diciembre de 2015 de <http://www.bioone.org/doi/abs/10.1007/s11627-008-9130-5>
- Mishiba, K., Okamoto, T. y Masahiro, M. (2000). Increasing ploidy level in cell suspension cultures of *Doritaenopsis* by exogenous application of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. Recuperado el 8 de abril de 2016 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11319026>
- Pérez, J. (2006). *Cultivo in vitro de plantas y sus aplicaciones en agricultura*. La laguna: Arte comunicación visual S. L.
- Ponmurugan, P. y Kumar Suresh, K. (2012). *Applications of plant tissue culture*. Nueva Delhi: New age international.
- Quiroz, F., Rojas, R., Galaz, R. y Loyola, V. (2006). Embryo production through somatic embryogenesis can be used to study cell differentiation in plants. Recuperado el 10 de julio de 2016 de <https://link.springer.com/article/10.1007/s11240-006-9139-6>
- Quiroz, J. (2010). Multiplicación clonal de cacao por el método de enraizamiento (ramilla). Recuperado el 29 de mayo de 2016 de <http://repositorio.iniap.gob.ec/bitstream/41000/2058/1/iniaplsbt149.pdf>
- Quiroz, J. y Mestanza, S. (2010). Injertación de cacao. Recuperado el 4 de junio de 2016 de <http://repositorio.iniap.gob.ec/bitstream/41000/2050/1/iniaplsbt148.pdf>
- Rathore, J., Rathore, V., Shekhawat, N., Singh, R., Liler, G., Phulwaria, M. y Dagla, H. (2004). Micropropagation of Woody Plants. Recuperado el 2 de septiembre de 2016 de https://link.springer.com/chapter/10.1007%2F1-4020-3213-7_13
- Roca, W. y Mroginski, L. (1993). *Cultivo de tejidos en la agricultura*. Cali: XYZ. Recuperado el 4 de marzo de 2016 de https://books.google.com.ec/books?id=EXijYNw55DUC&pg=PA953&hl=es&source=gbs_toc_r&cad=3#v=onepage&q&f=false

- Sánchez, J., Daquinta M. y Capote, I. (2009). Multiplicación in vitro de brotes de tres variedades de callos empleando sistema de inmersión temporal. Recuperado el 26 de marzo de 2016 de <https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/4130518.pdf>
- Smith, R. (2013). *Plant tissue culture* (3.^a ed.). United States of America: Elsevier. Recuperado el 20 de enero de 2016 de <https://www.elsevier.com/books/plant-tissue-culture/smith/978-0-12-415920-4>
- Solís, L., Andrade, A., Sáenz, L., Oropeza, C. y Castaño, E. (2012). Somatic embryogenesis in recalcitrant plants. Recuperado el 27 de noviembre de 2015 de <http://www.intechopen.com/books/embryogenesis/somatic-embryogenesis-in-recalcitrant-plants>
- Sotomayor, D. (2011). *Estimación de los retornos de las inversiones realizadas por INIAP en investigaciones y transferencia de tecnologías en cacao, Ecuador*. (Tesis de Ingeniería). Recuperado el 7 de julio de 2016 de <http://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/4959/1/T-ESPE-IASA%20I-004580.pdf>
- Tan, C. y Furtek, D. (2002). Development of an in vitro regeneration system for *Theobroma cacao* from mature tissues. Recuperado el 18 de agosto de 2016 de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168945202004284>
- Urrea, A., Atehortúa, L. y Gallego, A. (2011). Regeneración vía embriogénesis somática de una variedad colombiana élite de *Theobroma cacao* L. Recuperado el 6 de julio de 2016 de <http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/27916/28655>
- Vargas, P., Ciobotă, V., Salinas, W., Kampe, B., Aponte, P., Rösch, P., Popp, J. y Ramos, L. (2016). Distinction of Ecuadorian varieties of fermented cocoa beans using Raman spectroscopy. Recuperado el 21 de junio de 2016 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27283632>

Von Arnold, S. (2008). *Plant propagation by tissue culture*. (3.^a ed.). Países Bajos: Springer. Recuperado el 1 de julio de 2016 de <http://www.springer.com/us/book/9781402050046>

Von Arnold, S., Sabala, I., Bozhkov, P., Dyachok, J. y Filonova, L. (2001). Developmental pathways of somatic embryogenesis. Recuperado el 12 de mayo de 2016 de <https://link.springer.com/article/10.1023/A:1015673200621>

