

UNIVERSIDAD AMAZÓNICA DE PANDO

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y NATURALES

CARRERA INGENIERÍA AGROFORESTAL



TESIS DE GRADO

Evaluación de dos tipos de Auxinas en la formación de callos embriogénicos de botones florales de Cacao silvestre (*Theobroma cacao L.*) en la fase de establecimiento en el Laboratorio De Biotecnología de la Universidad Amazónica De Pando

Postulante:

Univ. Wilder Guzmán Quispe

Asesor:

Ing. Gabriela Ruth Ancasi Espejo

Ing. Griceldo Carpio Tancara

COBIJA – PANDO – BOLIVIA

2025

HOJA DE APROBACIÓN

La presente tesis fue revisada y aprobada por:

CARGO	NOMBRES Y APELLIDOS	FIRMAS
Decano	Ing. Marcos Vichenzo Abasto Antezana	_____
Tribunal 1	Ing. Andrócles Puerta Velásquez	_____
Tribunal 2	Ing. Daniel Arturo Rojas Cespedes	_____
Tribunal 3	Ing. Armando Alcázar Vivado	_____
Asesor	Ing. Ruth Gabriela Ancasi Espejo	_____
Asesor	Ing. Griceldo Carpio Tancara	_____

Cobija, octubre de 2025

DEDICATORIA

A mi querida madre, cuyo amor, fortaleza y apoyo incondicional han sido la luz que me guía. Todo lo que soy y lo que espero lograr te lo debo a ti. Esta tesis es un reflejo de los valores que me inculcaste y de tu fe inquebrantable en mis sueños.

Wilder Guzman Quispe

AGRADECIMIENTO

En primer lugar, quiero agradecer a Dios, quien con su infinita sabiduría y bendiciones me ha guiado en cada paso de este camino. Sin su luz y fortaleza, este logro no habría sido posible.

A mi madre, por su amor incondicional y su inagotable apoyo, que han sido mi mayor impulso para alcanzar esta meta. A mi padre, por su esfuerzo y dedicación, y por enseñarme con su ejemplo el valor del trabajo constante.

A mis hermanos, por su cariño y su compañía que siempre me han dado fuerzas en los momentos más difíciles. A mis asesores, agradezco su guía y su paciencia, que fueron fundamentales para la realización de este trabajo.

A mis docentes, quienes con su enseñanza y orientación contribuyeron enormemente a mi formación., a mis compañeros de curso, por compartir este recorrido y ser una fuente de camaradería. Y a la Universidad Amazónica de Pando por brindarme las herramientas y el espacio para desarrollar este trabajo.

RESUMEN

El cacao silvestre (*Theobroma cacao*) tiene su origen en la región amazónica de América del Sur y ha sido utilizado desde tiempos ancestrales por culturas como los mayas y aztecas. En Bolivia, se encuentra principalmente en los departamentos de Beni, Pando, La Paz, Cochabamba y Santa Cruz, donde crece sin intervención humana y posee características únicas en sabor y aroma. Su importancia radica en la conservación de los bosques, su impacto económico para comunidades locales y su reconocimiento internacional por su calidad excepcional. Sin embargo, enfrenta desafíos como la deforestación, plagas, variabilidad en la calidad y baja industrialización, lo que limita su desarrollo. Implementar estrategias de conservación y manejo adecuado es clave para garantizar su sostenibilidad y aprovechamiento futuro. El objetivo de esta investigación es evaluar dos tipos de auxina en la formación de callos embriogénicos a partir de botones florales de cacao silvestre (*Theobroma cacao* L.) en la fase de establecimiento, la investigación se realizó en la Facultad de Ciencias Biológicas y Naturales de la Universidad Amazónica de Pando del municipio de Cobija, departamento de Pando, Bolivia. El material vegetal que se utilizó para la *callogenesis* fueron botones florales de cacao silvestre (*Theobroma cacao* L.) exactamente los estaminodios, los cuales fueron desinfectados con detergente y NaClO al 1% durante 5 minutos posteriormente fueron introducidos a medios de cultivo DKW (driver kuniyuki 1984). Suplementados con dos tipos de auxinas, vitaminas y sacarosa. Fueron 7 tratamientos, T1. Fue el testigo y 6 tratamientos con distintas concentraciones de auxinas que se evaluaron. el mejor resultado obtenido fue con el T6. 5ml de 2,4-D quien obtuvo 81,82% de formación de callos embriogénicos hasta la última evaluación.

Palabra clave: *Theobroma cacao* L., Cultivo *In vitro*, Auxinas, Picloram, **2,4-D** Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético, Callos Embriogénicos, Botón floral, Estaminodios.

ABSTRACT

Wild cacao (*Theobroma cacao L.*) originates from the Amazon region of South America and has been used since ancient times by cultures such as the Maya and Aztecs. In Bolivia, it is mainly found in the departments of Beni, Pando, La Paz, Cochabamba, and Santa Cruz, where it grows naturally without human intervention and possesses unique flavor and aroma characteristics. Its importance lies in forest conservation, its economic impact on local communities, and its international recognition for exceptional quality. However, it faces challenges such as deforestation, pests, quality variability, and low industrialization, which limit its development. Implementing conservation strategies and proper management is key to ensuring its sustainability and future utilization. This research aims to evaluate two types of auxins in the formation of embryogenic calluses from wild cacao (*Theobroma cacao L.*) floral buds during the establishment phase. The study was conducted at the Faculty of Biological and Natural Sciences of the Universidad Amazónica de Pando, in the municipality of Cobija, Pando, Bolivia. The plant material used for callogenesis consisted of wild cacao (*Theobroma cacao L.*) floral buds, specifically the staminodes, which were disinfected with detergent and 1% NaClO for five minutes before being introduced into DKW (Driver & Kuniyuki, 1984) culture media supplemented with two types of auxins, vitamins, and sucrose. Seven treatments were applied: T1 served as the control, and six treatments with different auxin concentrations were evaluated. The best result was obtained with T6, 5 ml of 2,4-D, achieving 81.82% embryogenic callus formation by the final evaluation.

Keywords: *Theobroma cacao L.*, in vitro culture, auxins, picloram, 2,4-D (2,4-Dichlorophenoxyacetic acid), embryogenic calluses, floral bud, staminodes.

INDICE

I. Introducción.....	1
1.1. Identificación y planteamiento del problema.....	3
1.2. Justificación.	4
1.3. Objetivos.....	6
1.3.1. <i>Objetivo general</i>	6
1.3.2. <i>Objetivos específicos</i>	6
1.4. Hipótesis.	6
2. Revisión Bibliográfica.	7
2.1. Generalidades del Cultivo.....	7
2.1.1. <i>Origen</i>	7
2.1.2. <i>Morfología y taxonomía</i>	7
2.1.3. <i>Planta</i>	7
2.1.4. <i>Morfología de la flor</i>	8
2.1.5. <i>Polinización</i>	9
2.1.6. <i>Diversidad</i>	10
2.2. Mejoramiento genético del cultivo de cacao	11
2.3. Propagación.....	13
2.3.1. <i>Propagación sexual</i>	13
2.3.2. <i>Propagación asexual ex vitro</i>	14
2.3.3. <i>Propagación asexual in vitro</i>	15
2.3.4. <i>Embriogénesis somática</i>	18
2.4. Medios de cultivo in vitro	20

2.4.1. Componentes de los medios de cultivo	20
2.4.2. Medios de cultivo para la propagación de embriogénesis	22
3. Materiales y Métodos.....	25
3.1. Ubicación del área de estudio.....	25
3.1.1. Clima.....	25
3.2. Materiales.....	26
3.2.1. Material vegetal.....	26
3.2.2. Colecta de los explantes (botones florales).....	26
3.3. Materiales de laboratorio.....	27
3.4. Metodología.....	27
3.4.1. Preparación de área de estudio.....	27
3.4.2. Preparación de medio de cultivo.....	28
3.4.3. Métodos establecimiento in vitro de botones florales de cacao.....	31
3.5. Introducción en el medio de cultivo:	33
3.6. Diseño Experimental.....	34
3.7. Modelo estadístico	34
3.8. Variables de respuesta:	35
Los explantes fueron observadas durante 45 días, las variables a evaluar fueron:.....	35
3.8.1. Porcentaje de contaminación:	35
3.8.2. Oxidación de los explantes:	36
3.8.3. Reactividad y estado evolutivo del callo embriogénico:.....	37
La evaluación se realizó a los primeros 15 días después de la introducción.....	37
3.8.6. Presencia de embriones:.....	38

4. Resultados.....	39
4.1. Porcentaje De Contaminación:	39
4.2. Oxidación.....	40
4.3. Reactividad y estado evolutivo del callo embriogénico	41
4.3.1. <i>Inflamación de estaminodios</i>	41
4.3.2. <i>Porcentaje de formación de callo embriogénico.</i>	44
4.3.3. <i>Posición de aparición del callo en el estaminodio:</i>	46
4.3.4. <i>Coloración del callo:</i>	49
4.4. Porcentaje de presencia de embriones somáticos.	51
5. Discusión.....	52
6. Conclusión	60
7. Recomendaciones.....	62
8. Bibliografía	63
9. Anexos.	72

INDICE DE TABLAS

Tabla 1 materiales y equipos de laboratorio.....	¡Error! Marcador no definido.
Tabla 2 Protocolo de macro y micronutrientes del medio de cultivo DKW (driver y kuniyuki 1984).....	28
Tabla 3 Diseño experimental de 2 factores y 7 tratamientos de 11 repeticiones.....	34
Tabla. 4 Análisis de varianza para la variable inflamación de estaminodios.....	42
Tabla. 5 Análisis de varianza para la variable porcentaje de formación de callos.....	44

INDICE DE FIGURAS

Figura 1 Partes de una flor de cacao (<i>Theobroma cacao</i> L.)	9
Figura 2 Croquis de ubicación del laboratorio de biotecnología vegetal	25
Figura. 3 Extracción de botones florales de cacao (<i>Theobroma cacao</i> L.) y métodos de traslado de material vegetal	26
Figura.4 Preparación del área de estudio	28
Figura 5 preparación del medio de cultivo y sus respectivos tratamientos.	30
Figura 6 Regulando el ph del medio de cultivo	30
Figura.7 Aplicación de 10 ml de medio de cultivo en cajas Petri de acuerdo al tratamiento y posteriormente esterilizar los medios en autoclave	31
Figura.8 Proceso de desinfección de botones florales de cacao (<i>Theobroma cacao</i> L.).....	32
Figura.9 Disección de los botones florales	33
Figura.10 Introducción de los estaminodios al medio de cultivo DKW (1984).....	33
Figura 11 Tipos de contaminación en cultivo in vitro	36
Figura 12 Niveles de oxidación.	37
Figura. 13 Desarrollo de callos en estaminodios	37
Figura. 14 Embrión de tipo torpedo.....	38
Figura. 15 Grafica de porcentaje de contaminación por hongos y bacterias en los explantes....	40
Figura. 16 Gráfico de barras de porcentaje total de estaminodios oxidados en la fase de establecimiento.	41
Figura. 17 Grafica de barras de porcentaje de inflamación de explantes en la etapa de establecimiento.	43

Figura. 18	Grafica de barras de porcentaje de inflamación de explantes por auxinas.....	43
Figura. 19	Explante de estaminodio normal y estaminodio inflamado	44
Figura. 20	Porcentaje de formación de callos.....	45
Figura 21.	Porcentaje de formación de callos embriogénicos por tipo de auxinas.....	46
Figura. 22	Primera evaluación de posición de aparición de callo.	47
Figura. 23	Segunda evaluación de posición de aparición de callo.	47
Figura. 24	Tercera evaluación de posición de aparición de callo.	48
Figura. 25	Posición de aparición del callo	48
Figura. 26	Coloración del callo en la fase de establecimiento.....	50
Figura.27	Coloración del callo.....	51

I. Introducción

El cacao (*Theobroma cacao* L.) es un árbol originario de las selvas amazónicas de América, su fruto es la base para la elaboración de chocolate y sus derivados (Borrone *et al.* 2007). Su cultivo es relativamente exigente en cuanto a altitud, latitud y humedad, viéndose favorecido con el clima cálido y húmedo, con temperaturas óptimas de crecimiento que oscilan entre los 18°C y 32°C y una precipitación anual de 1.500 a 2.000 mm (Menéndez *et al.*, 2.002). Tiene una importancia económica y cultural; es nutricionalmente completo, ya que contiene aproximadamente un 30% de materia grasa, un 6% de proteínas, un 61% de carbohidratos, y un 3% de humedad y de minerales (fósforo, calcio, hierro), además de aportar vitaminas A y del complejo B. (Valenzuela B., 2007)

A nivel mundial se producen más de 4,2 millones de toneladas de grano de cacao anualmente de los cuales 80,33% se concentran en cinco países (Costa de marfil, Ghana, Indonesia, Nigeria y Camerún) que correspondería a África occidental el mismo que alberga el 64% de la superficie sembrada de cacao. Los países de América contribuyen con el 17% de la producción mundial equivalente a más de 650.000 toneladas, así también el 17% del área sembrada con cacao, dentro del cual Brasil, Ecuador, Republica Dominicana, Perú, Colombia y México son los mayores representantes pues concentran el 90% de la producción y de superficie sembrada del continente (IICA, 2018).

En Bolivia se produce más de 6.000 toneladas de cacao, el cual cerca del 84% es producido en el Departamento de La Paz por aproximadamente 3.000 productores de la región de Alto Beni (Encuesta agropecuaria 2015). En la actualidad, el cacao boliviano es uno de los productos agrícolas con mayor demanda por el mercado nacional e internacional. A escala mundial, las

ventas por concepto de la venta de la semilla base del chocolate representan 80.000 millones de dólares (Diario Pagina Siete, 2020)

La producción de cacao en Bolivia tiene una importancia socio económica desde a la época pre colonial, donde los pequeños productores campesinos e indígenas se dedican a la producción y recolección del caco, estos se encuentran distribuidos en cinco Departamentos (La Paz, Beni, Cochabamba, Santa Cruz y Pando), Bolivia cuenta con dos tipos principales de cacao: el forastero y el cacao silvestre que crece naturalmente en toda la Amazonía boliviana. (HELVETAS Bolivia 2019)

El CNB (Cacao nacional boliviano) se encuentra diseminado y expandido en Rodales silvestres en riberas de la cuenca amazónica boliviana en los Departamentos de Beni, Pando, parte de Santa Cruz y Cochabamba. Distribuido en grandes extensiones de manchas o islas de áreas boscosas de la llanura beniana, siendo aún desconocida la manera como ha llegado a reproducirse (Surco, 2010). La superficie existente en su forma silvestre alcanza aproximadamente a 12.000 hectáreas, abarcando principalmente los Departamentos de Pando y Beni. Aun así, de esta superficie, apenas el 40% es aprovechado por las familias campesinas e indígenas. El cacao silvestre ha sobrevivido a diversas intervenciones humanas y fenómenos climáticos, como inundaciones e incendios forestales, deforestación y actualmente toma impulso debido a su potencial económico y debido a la oportunidad de conservación del medio natural amazónico y su aprovechamiento sostenido. Sin embargo, las amenazas persisten y están reduciendo los volúmenes de producción. Las causas son diversas y complejas, aunque las más evidentes son la presión sobre los bosques (OXFAM international, 2015).

En este sentido, los trabajos que se desarrollan actualmente en varias instituciones se orientan al perfeccionamiento de diferentes técnicas de propagación y conservación *in vitro*, entre

las que se encuentra la embriogénesis somática. (López-Baez *et al.*, 2001). Estas técnicas permitirían la propagación de plantas sanas con calidad genética (cacao fino de aroma) y en un corto período de tiempo. La embriogénesis somática es una técnica que permite obtener clones con una arquitectura di mórfica normal y un sistema radical de gran anclaje, además de los otros potenciales que esta técnica presenta para el mejoramiento genético, intercambio y conservación de material a fin de lograr regenerar clones que mantengan características genéticas (Hidalgo, 2014). En la fase de establecimiento es la fase más crítica debido a la contaminación por hongos y bacterias, como también por los niveles de oxidación. Teniendo en cuenta los aspectos anteriormente descritos, el objetivo de este trabajo de investigación es evaluar la formación de callos embriogénicos mediante botones florales de cacao silvestre.

1.1. Identificación y planteamiento del problema.

La formación de callos embriogénicos en botones florales de cacao silvestre es un proceso influenciado por la presencia y concentración de auxinas. Sin embargo, se desconoce qué tipo de auxina es más eficaz para favorecer la embriogénesis somática en la fase de establecimiento, lo que limita el desarrollo de protocolos eficientes de propagación *in vitro* y conservación de la especie en el departamento de Pando.

Los cacaotales silvestres, al tratarse de un producto del monte, corren el riesgo de desaparecer debido a la expansión agrícola y ganadera que genera presión sobre los bosques y ocasiona la quema (chaqueo) de estos, para la implementación de cultivos de frutas, tubérculos, hortalizas, cereales, pasturas para la ganadería, etc. Por si fuera ya poco, los fenómenos climáticos, sobre todo inundaciones, son factores de riesgo que inciden en la producción del cacao. Así mismo la normativa específica y el ordenamiento comunitario no están orientados a la protección y manejo

de cacaotales silvestres, lo que es un factor que incide en su destrucción paulatina. (OXFAM international, 2015).

Actualmente el cacao silvestre en el departamento, no esta siendo considerado por las autoridades y la falta conciencia de parte de los campesinos estan siendo cada vez mas atacados por todo lo mencionado anteriormente, sin saber que el cacao silvestre tiene un alto valor economico.

1.2. Justificación.

El cacao silvestre se encuentra dentro del sistema natural. Los árboles producen y se reproducen sin necesidad de la intervención del hombre. Molecularmente es diferente a los demás grupos genéticos del cacao cultivado, se caracteriza por ser único en sabor y aroma dentro de los grupos de cacaos más finos del mundo, y su producción está orientada a la demanda de mercados especiales cuyos precios son superiores debido a la poca producción y escasez en Bolivia. (OXFAM international, 2015).

Por las razones antes expuestas es necesario acudir a nuevas alternativas de propagación en la que podamos obtener plantas a gran escala y de buena calidad en menor tiempo y a menos costo, para esto tenemos la micro propagación *in vitro*, la cual es una técnica que nos permite generar un gran número de plantas, en un tiempo menos prolongado y además abaratar los costos de producción y lo más importante obtener plántulas con características fisiológicas similares a las plantas madres que son debidamente seleccionadas para su propagación.

Esta investigación beneficiará a distintos sectores involucrados en la conservación y aprovechamiento del cacao silvestre en la Amazonía boliviana.

Investigadores en biotecnología vegetal podrán utilizar los resultados para mejorar protocolos de cultivo in vitro, optimizando la formación de callos embriogénicos y facilitando la regeneración de genotipos valiosos.

Campeños y comunarios de Pando se beneficiarán al contar con nuevas estrategias de propagación, lo que les permitirá conservar variedades autóctonas de cacao silvestre y explorar su potencial productivo en sistemas agroforestales sostenibles. Productores agrícolas interesados en el mejoramiento genético podrán acceder a información clave sobre el uso óptimo de auxinas en la propagación del cacao, lo que puede reducir costos y mejorar la calidad del material vegetal disponible.

Programas de conservación ambiental, recibirán apoyo en la preservación de la diversidad genética del cacao silvestre, contribuyendo a la sostenibilidad de los ecosistemas amazónicos. Centros de investigación y universidades podrán utilizar los hallazgos como referencia para futuras investigaciones en biotecnología y cultivo de tejidos, ampliando el conocimiento sobre la regeneración de especies forestales en condiciones controladas.

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo general

- Evaluar dos tipos de Auxinas en la formación de callos embriogénicos a partir de botones florales de Cacao silvestre (*Theobroma cacao L.*) en la fase de establecimiento

1.3.2. Objetivos específicos

- Evaluar la formación de callos embriogénicos a partir de botones florales de cacao silvestre (*Theobroma cacao L.*)
- Determinar las concentraciones apropiadas de Auxinas para propagación *in vitro* del cacao silvestre (*Theobroma cacao L.*)
- Determinar el porcentaje de contaminación de explantes de cacao silvestre (*theobroma cacao L.*) en la fase de establecimiento *in vitro*

1.4. Hipótesis.

1.4.1. Hipótesis alternativa.

El uso de dos tipos de auxinas con diferentes concentraciones influye diferencialmente en la formación de callos embriogénicos de botones florales de cacao silvestre (*Theobroma cacao L.*)

1.4.2. Hipótesis nula.

El uso de dos tipos de auxinas con diferentes concentraciones no influye significativamente en la formación de callos embriogénicos de botones florales de cacao silvestre (*Theobroma cacao L.*)

2. Revisión Bibliográfica.

2.1. Generalidades del Cultivo

2.1.1. Origen

El género *Theobroma* es originario de la cuenca alta del río Amazonas que comprende países como Colombia, Ecuador, Perú, Bolivia y Brasil, siendo esta región donde la especie *Theobroma cacao* presenta la mayor variación de las especies, este cultivo en la época precolombina se extendió de Sudamérica hasta México y Costa Rica se dice que no está claro que su expansión se dio de una manera natural o con la ayuda del hombre la cual sigue siendo un misterio como llegó a Centro América (Mata, 2006). Según (Batista, L.; 2009). indica que el cultivo de cacao se inició en México y América Central y resalta al mismo tiempo que los españoles no lo vieron cultivado en América del Sur cuando arribaron a este continente, lo encontraron creciendo en forma natural en muchos bosques a lo largo de los ríos Amazonas y Orinoco y sus afluentes, donde en la actualidad existen tipos genéticos de un alto valor.

2.1.2. Morfología y taxonomía

Desde el punto de vista botánico el cacao se clasifica de la siguiente manera (Gutiérrez., 2015)

División: Espermatofita

Clase: Angiosperma

Subclase: Dicotiledónea

Orden: Malvales

Suborden: Malvíneas

Familia: Malvaceae

Tribu: Bitneraceae

Género: *Theobroma*

Especie: *Theobroma cacao* L.

2.1.3. Planta

Árbol de tamaño mediano (5-8 m) aunque puede alcanzar alturas de hasta 20 m cuando crece libremente bajo sombra intensa. Su corona es densa, redondeada y con un diámetro de 7 a 9

m. Tronco recto que se puede desarrollar en formas muy variadas, según las condiciones ambientales, su sistema radicular es pivotante con abundantes raíces secundarias, estos se encuentran en los primeros 30 cm de suelo (Castilla, 1.981). Sus hojas son simples, enteras y de color verde bastante variable (color café claro, morado o rojizo, verde pálido) y de pecíolo corto (Urquhart, 1.963). El fruto de tamaño, color y formas variables, pero generalmente tienen forma de baya, de 30 cm de largo y 10 cm de diámetro, siendo lisos o acostillados, de forma elíptica y de color rojo, amarillo, morado o café. La pared del fruto es gruesa, dura o suave y de consistencia como de cuero. Los frutos se dividen interiormente en cinco celdas. La pulpa es blanca, rosada o café, de sabor ácido a dulce y aromática. El contenido de semillas por baya es de 20 a 40 y son planas o redondeadas, de color blanco, café o morado, de sabor dulce o amargo (Dublin, 1.984). Sus flores son pequeñas y se producen al igual que los frutos, en racimos pequeños sobre el tejido maduro mayor de un año del tronco y de las ramas, alrededor en los sitios donde antes hubo hojas. Las flores son pequeñas, se abren durante las tardes y pueden ser fecundadas durante todo el día siguiente (Dublin, 1.984).

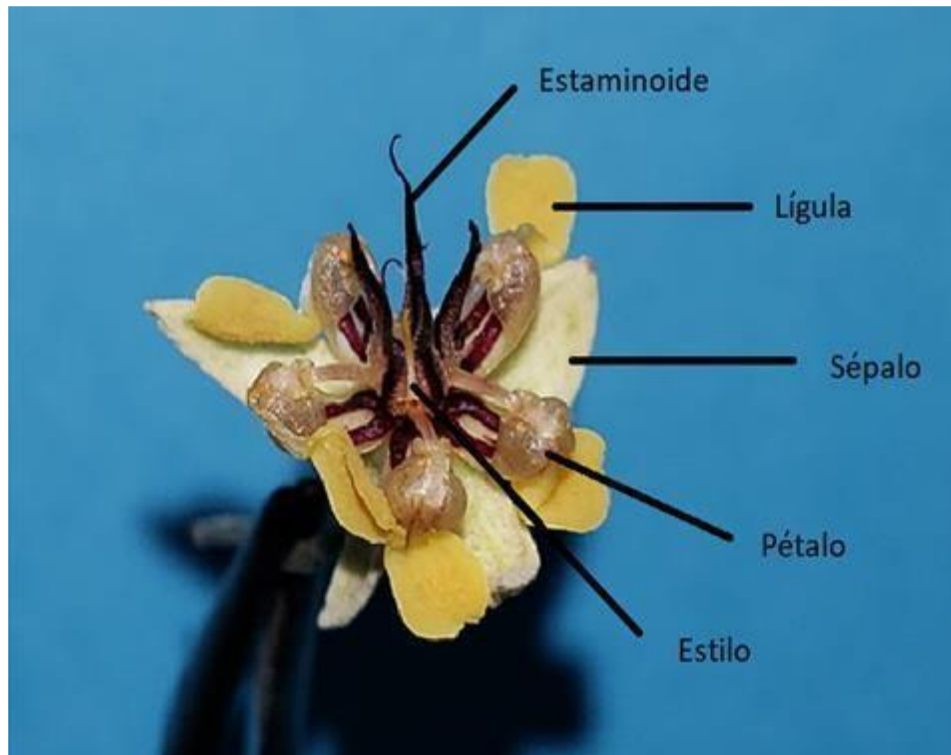
2.1.4. Morfología de la flor

La flor individual del cacao (**Figura 1**) tiene un pedicelo largo y fino de 1 a 1,5 cm de longitud, se compone de cinco sépalos agudos y rosados, de 6 a 8 mm de largo, pubescentes, que en la flor abierta se expanden formando ángulo recto con el pecíolo. La corola consiste de cinco pétalos blancos de 6 a 8 mm de largo. El centro de la flor lo ocupa el tubo estaminal, compuesto por 5 estambres fértiles, cortos y doblados hacia fuera, cada uno encerrado en la concha de un pétalo; y de 5 estaminodios internos, agudos y largos de posición erecta que rodean al gineceo. El ovario es súpero con 5 celdas y placentación central, con 30 a 50 rudimentos seminales. El estilo

se abre arriba en 5 ramas estigmáticas algunas de las cuales permanecen con frecuencia soldadas (León, 2.000).

Figura 1

Partes de una flor de cacao (Theobroma cacao L.)



Nota: Fuente: (Hidalgo, 2019)

2.1.5. Polinización

El mecanismo de polinización del cacao presenta caracteres de mucho interés. La estructura de la flor no facilita la polinización por ninguno de los medios comunes, más bien la dificulta. El polen es demasiado pegajoso para que pueda intervenir el viento, tampoco la posición de las anteras se adapta a la condición de una planta anemófila, por lo que ciertos insectos son los que se encargan de la fecundación (León, 2.000). Las flores fecundadas pierden los pétalos, sépalos y

estambres y el ovario inicia su crecimiento; muchos de los ovarios fecundados caen por diversas causas y sólo muy pocos llegan a la maduración (León, 2.000; Urquhart, 1.963).

La flor del cacao no siempre se fecunda a sí misma, sino que requiere del polen de otra flor, de otra planta. Este tipo de formas convierte al cacao en una especie altamente alógama o de polinización cruzada. (El cacao en sistemas agroforestales, (s/f). pag.13)

2.1.6. Diversidad

Los árboles de cacao tienden a ser agrupados por tradición en tres grupos principales llamados Criollo, Forastero y Trinitario; de los cuales muchos híbridos han sido y continuarán siendo desarrollados (ITC, 2.001).

La diversidad es más evidente en caracteres del fruto como la forma, relieve de la superficie y color; así como la forma de la semilla y el color de los cotiledones y en menor grado en caracteres del porte, follaje y flores. Menos visibles pero de gran importancia económica son las diferencias en susceptibilidad a enfermedades fungosas (León, 2.000).

Los cacaos criollos se caracterizan por tener frutos alargados, mazorcas de color rojo o amarillo en la madurez, los cotiledones frescos son de color blanco o violeta pálido. Requieren de un período corto para fermentar (2-3 días), es muy aromático y se los designa comercialmente como “cacao fino” (Vera, 1.987a). Este grupo se cultivó primeramente en Mesoamérica donde ya son muy raros, luego en Suramérica, se cruzaron con poblaciones forasteras, dando origen al grupo Trinitario (León, 2.000). Se ha reportado que los Criollos son extremadamente susceptibles a las enfermedades, especialmente a *Phytophthora spp* y *Ceratocystis* y no sobreviven a ataques persistentes de plagas (Toxopeus, 1.985).

Los Trinitarios no son encontrados en estado silvestre, supuestamente son descendientes de cruces entre los Criollos y poblaciones locales de Forasteros; la mayor parte de América del

Sur está ocupada por esta variedad. Las poblaciones de Trinitario tienen características de mazorca y semilla usualmente variables, debido a los caracteres altamente contrastantes de sus ancestros (León, 2.000; Toxopeus, 1.985).

Los Forasteros son un gran grupo que comprende tipos cultivados, semi-cultivados y silvestres, se cree que tienen su origen en la Amazonía. Las variedades de Forastero son por mucho las que producen el mayor tonelaje de semilla cosechada, de las cuales las poblaciones de Amelonado son las más cultivadas (León, 2.000; Toxopeus, 1.985). Actualmente la mayoría de árboles plantados de Forastero son híbridos, ya sea entre variedades de Forastero o una mezcla entre Criollo y Forastero. Estos híbridos son preferidos debido a la mayor resistencia a las enfermedades conocidas y a que tienen una mayor producción (ITC, 2.001).

2.2. Mejoramiento genético del cultivo de cacao

Existen dos criterios para el mejoramiento del cultivo del cacao: el mejoramiento para la producción y el mejoramiento para la resistencia a enfermedades. Cheesman y Pound en 1.934 establecieron las bases para el mejoramiento genético orientado a la producción. Así se estableció el Índice de mazorca como el número de mazorcas necesarias para hacer un kilogramo de cacao seco; también se estableció el Índice de semilla, como el peso seco de la almendra fermentada y seca (Enríquez, 1.983).

La Mazorca negra, la Escoba de bruja, la hinchazón de los brotes, la muerte vascular, y la monilia, son las cinco enfermedades consideradas como las más importantes del cultivo de cacao, ya que pueden destruir más del 40 % del total de los cultivos (Van der Vossen, 1.999). En los esfuerzos para reducir las pérdidas por estas enfermedades se han ensayado métodos químicos y profilácticos, pero poco se ha logrado y estas enfermedades continúan limitando la producción (Enríquez y Soria, 1.984).

En vista del poco éxito obtenido con el uso de productos químicos y el alto costo de los mismos para el combate, los centros de investigación han hecho esfuerzos para seleccionar material resistente a estas enfermedades con el fin de utilizarlo en programas de mejoramiento genético (Enríquez y Soria, 1.984). De esta manera, la búsqueda de resistencia a estas enfermedades ha dominado muchos programas nacionales de mejoramiento en varios países (Van der Vossen, 1.999).

En Costa Rica, el CATIE a través del programa de selección de genotipos superiores de alta producción y resistencia, se ha determinado la reacción de casi 600 clones de su Colección Internacional de Germoplasma, de los cuales una pequeña proporción (1%) ha mostrado un alto nivel de resistencia a enfermedades fungosas, principalmente a la Monilia.

Adicionalmente se ha iniciado la selección de genotipos superiores por su resistencia, producción, precocidad y/o vigor y se han identificado materiales cuya producción bajo condiciones de alta presión de inóculo, supera en más de un 300% la de algunos genotipos internacionales (Phillips, 2.003).

El mejoramiento genético del material plantado involucra varios pasos: el manejo de germoplasma, la caracterización y evaluación, el desarrollo de herramientas de mejoramiento genético, estudios genéticos, creación y selección de nuevas variedades y la multiplicación y distribución del nuevo material (Eskes, 2.001).

El mejoramiento genético convencional ha hecho posibles logros significativos en el desempeño agronómico de varios cultivos. Sin embargo, el advenimiento de nuevas tecnologías, amplía enormemente la habilidad de los mejoradores para efectuar mayores progresos en la calidad del cultivo, la resistencia a enfermedades y la producción (Wilkinson, 2.001).

Las nuevas tecnologías usadas en mejoramiento genético, actualmente están sufriendo un dramático desarrollo. Estas tecnologías pueden proveer nuevo conocimiento en la estructura genética del germoplasma y la herencia para la selección de cualidades. De esta manera se ofrece al mejorador una guía para tomar decisiones al escoger los progenitores que serán usados para el mejoramiento, así como los mejores métodos; incrementando la eficiencia de la selección (Eskes, 2.001).

Dentro de las nuevas tecnologías, la embriogénesis somática puede constituirse en una herramienta poderosa para la multiplicación, la conservación del germoplasma, el intercambio de germoplasma, así como la modificación genética en el cultivo de cacao (INGENIC, 2.001).

2.3. Propagación

La propagación del cacao se realiza por la vía sexual o por semillas y por métodos de reproducción asexual o vegetativa, la cual utiliza los métodos de estacas, injertos y acodos (Soto y Herrera, 1.985; Moreno *et al.*, 1.983).

2.3.1. Propagación sexual

Es la forma más generalizada y fácil para reproducir el cacao (Moreno *et al.*, 1.983). Existen dos formas principales de producir cacao por semillas; la primera es plantando las semillas directamente en el campo y la segunda es sembrando las semillas en un semillero temporal (Hardy, 1.960).

Plantar directamente la semilla en el campo disminuye el costo del trasplante, aunque es más difícil controlar enfermedades, pestes y plagas en el campo que en el semillero. Durante períodos secos es más económico irrigar un pequeño semillero, que irrigar un campo completo. En un invernadero es más fácil eliminar plantas pobres o débiles; aunque varios agricultores tienden a sembrar dos semillas en un mismo espacio para seleccionar la mejor planta, solucionando

así este problema (Hardy, 1.960). La principal desventaja de la siembra por semilla es la variabilidad en la producción (Moreno *et al*, 1.983).

En una población de plantas propagadas por semillas es de esperarse encontrar una gran variabilidad genética por tratarse de una planta alógama, por la estructura compleja de la flor y por la presencia de sistemas de incompatibilidad que caracteriza a ciertos tipos de cacao (Vera, 1.987). Las variaciones pueden darse aún entre la descendencia de un mismo fruto (Soto y Herrera, 1.985).

A pesar del problema que acarrea la variabilidad, es posible dar mayor seguridad a la propagación, mediante el uso de semillas mejoradas, obtenidas por cruzamientos entre clones seleccionados, que permiten tener una mayor producción por hectárea, así como cierto grado de resistencia a algunas plagas y enfermedades (Moreno *et al*, 1.983).

2.3.2. *Propagación asexual ex vitro*

En ningún individuo superior es posible fijar indefinidamente sus caracteres cuantitativos por medio de la reproducción sexual, por cuanto resulta difícil repetir la combinación de gametos que originaron el genotipo del individuo. De allí que la propagación vegetativa que da lugar a la propagación de clones, es el único procedimiento que permite perennizar genotipos superiores (Vera, 1.987).

Los métodos más utilizados para la propagación del cacao en forma asexual o vegetativa, son el injerto, la estaca y el acodo.

La injertación consiste en unir una rama o injerto a un patrón reproducido por semilla o enraizado, con el fin de que el cambium del injerto y del patrón queden en íntimo contacto, para que los nuevos tejidos provenientes de la división celular de ambos, queden justamente unidos y puedan transportar agua y alimentos a través de la unión (Vera, 1.987).

La propagación por estacas consiste en cortar una rama de un árbol seleccionado y someterla a un tratamiento especial para que enraíce. Para el enraizamiento es necesario el uso de propagadores, que pueden ser hechos de diversos materiales. La estaca requiere además reunir condiciones especiales de vigor y un manejo adecuado (Moreno *et al*, 1.983). Por ello la estaca debe provenir de plantas de alto rendimiento, buena calidad y tolerancia al ataque de plagas y enfermedades (Soto y Herrera, 1.985).

El acodo constituye otro procedimiento de reproducción vegetativa, en el que puede emplearse ramas de mayor edad que las ramillas. En este caso se debe cortar un anillo de corteza de un cm de ancho y depositar sobre ella cualquier hormona que estimule la emisión de raíces. La herida debe cubrirse con material enraizante, humedecido y sujeto por un plástico perforado. Luego de enraizada la rama, se la puede separar de la planta y sembrarla en fundas de polietileno llenas de tierra. Este procedimiento es menos usual para cacao (Vera, 1.987).

Las técnicas descritas de propagación vegetativa presentan eficiencia variable, requieren de jardines clonales para producir suficiente material para la propagación y un alto costo por planta obtenida, por lo que su utilización es muy limitada. Como resultado de programas de mejoramiento genético del cacao desarrollados en diversos centros del mundo, existe una cantidad considerable de genotipos mejorados: sin embargo, una de las mayores limitantes para aprovechar este germoplasma mejorado es la falta de métodos de clonación masiva de plantas seleccionadas, eficientes tanto desde el punto de vista económico como agronómico (López – Baez *et al.*, 2.001)

2.3.3. Propagación asexual *in vitro*

El deseo de obtener grandes cantidades de propágulos de cultivares de alto rendimiento ha estimulado los estudios en cultivos de tejidos (Elhag *et al.*, 1.988). Existen varias vías para realizar la propagación asexual *in vitro*; entre ellas están la multiplicación de brotes a partir de yemas

terminales, axilares o laterales, la organogénesis directa, la organogénesis indirecta, la embriogénesis somática, el microinjerto y el rescate de embriones (Krikorian, 1.991).

Archibald (1.954) consiguió por primera vez inducir callo del tejido cambial del cacao, usando el medio de White con agua de coco; sin embargo no pudo obtener la organogénesis. A partir de esta experiencia se han hecho varios intentos para lograr la propagación *in vitro* de este cultivo, utilizando diferentes vías como el cultivo de ápices, cultivo de microestacas, el cultivo de embriones cigóticos y la embriogénesis somática (Essan, 1.977). Algunos de los trabajos más importantes son descritos a continuación.

Hall y Collin (1.975) cultivando fragmentos de tallos de cacao joven en diferentes medios, a los que adicionaron sustancias reguladoras del crecimiento simples y complejas como la Kinetina, el agua de coco y extractos de frutos de cacao; en presencia de diferentes combinaciones de temperatura y de luz; obtuvieron callo, pero estas células no regeneraron. Orchard y colaboradores (1.979) cultivaron ápices en medio de Linsmaier y Skoog, al que adicionaron diversos reguladores de crecimiento (kinetina, zeatina, AIB, AIA, GA3).

Los explantes fueron extraídos de plantas jóvenes y se cultivaron en medio sólido y líquido en agitación. Estos ápices se volvieron turgentes y en algunos casos se produjo la formación de hojas. Passey y Jones (1.983) cultivaron ápices y nudos de 0,5 a 1 cm de largo, obtenidas de retoños jóvenes en pleno crecimiento, en un medio de Murashige y Skoog (1.962), adicionado con diversas combinaciones de citocininas (BAP, 2iP, IPA) y de auxinas (AIB, ANA). Se obtuvieron algunos brotes con hojas de escaso desarrollo. A pesar de las transferencias frecuentes sobre el medio fresco, ninguno de estos brotes sobrevivió más allá del 12° mes. En el mismo trabajo adicionando giberilinas sobre el medio base, se obtuvo el alargamiento de entrenudos y hojas, no obstante, las plantas murieron en las primeras semanas de establecido el cultivo.

También Janick y Whipkey (1.985), estudiaron la proliferación de yemas axilares y su desarrollo a partir de explantes obtenidos de nudos cotiledonares de cacao, utilizando medio MS modificado con diferentes fuentes de carbono, sales, 2iP o BA, solas o en combinación. Por su parte Miller cultivó explantes nodales con el objetivo de obtener tallos *in vitro* y a partir de ellos plantas enraizadas, probando diferentes combinaciones de medios y de reguladores de crecimiento (Murashige y Skoog, adicionados con AIB, AIA, BAP, 2iP). Pero, solamente se obtuvieron algunos explantes de yemas sin formación de tallo. Maxwell y Blake (1.984) también utilizaron explantes nodales de árboles jóvenes de cacaotales de edades de 4 y 5 años, lo que cultivaron sobre un medio de base simple, adicionando reguladores del crecimiento. Estos explantes produjeron una primera generación de brotes. Legrand y Missiso (1.986), determinaron la influencia de las dimensiones de los explantes y de los reguladores de crecimiento Zeatina, AIA, AIB, con respecto al desarrollo de los tejidos de *T. cacao in vitro*.

Legrand *et al.*, (1.984) utilizó varios explantes tomados en distintos niveles de plántulas de cacao; encontrando que la callogénesis y la rizogénesis se ven favorecidas por el ANA o la Leche de coco (LDC), según el origen del explante, además que el ANA parece inducir la proliferación de yemas de nudos cotiledonares. También se han realizado varios estudios respecto a la propagación de microestacas de cacao; así por ejemplo Legrand, *et al.*, (1.984), obtuvieron tallos *in vitro*, a partir de explantes extraídos de plántulas muy jóvenes. Dufour y Dublin (1.985), estudiaron la influencia de los factores físicos y de los factores químicos respecto a la obtención de tallos *in vitro*; logrando obtener microestacas con raíz, aptas para plantación en campo, a partir de fragmentos de tallos ortotrópicos de cacao. Por su parte, Bertrand (1.987), estudió las concentraciones de citocininas, auxinas, compuestos fenólicos y la etapa fisiológica de la rama en el momento del corte, con el objetivo de mejorar la fase de brote de la yema axilar de las estacas

ortotrópicas. Aguilar (1.996) estudió los factores que influyen en la falta de reactividad de las microestacas de cacao cultivadas y observó que se presentaban diferentes respuestas de acuerdo a las características ontogénicas de la planta y la posición de las yemas en las ramas; mientras Lardet *et al.*, (1.998) inició el cultivo de microestacas con explantes nodales, observando que la respuesta estaba influenciada considerablemente por el estado fisiológico de las ramas de donde fueron tomados los explantes, así como en la posición en que se encontraban los nudos en la rama, con respecto al ápice.

Aguilar *et al.*, (1.992) trabajando con la técnica de microinjerto de embriones somáticos probaron el uso de IBA para inducir el desarrollo de raíces adventicias y su efecto sobre el desarrollo del injerto; así como la respuesta de la presencia o ausencia de cotiledones del embrión somático sobre el prendimiento del injerto.

2.3.4. Embriogénesis somática

Hace más de 100 años Haberlandt declaró que era posible hacer crecer exitosamente en forma artificial embriones originados de células vegetativas (Krikorian *et al*, 1.969). Basado en la teoría celular de Schwann y Schleiden él consideró a cada célula como un organismo elemental y estaba convencido de la totipotencia de las células diferenciadas.

Sus experimentos de cultivos con células aisladas de hoja sientan los fundamentos del cultivo *in vitro* en general. Sin embargo, no fue hasta 1.958 que los embriones somáticos fueron detectados y reconocidos como tales en cultivos *in vitro* gracias a los trabajos independientes de Reinerth, Steward y colaboradores en cultivos derivados de explantes multicelulares de *Daucus carota* (Kohlenbach, 1.985). De acuerdo a Fehér *et al.*, (2.003), uno de los ejemplos más extremos de flexibilidad en el desarrollo de las plantas, es la capacidad de algunas células, a más de los cigotos, de iniciar el desarrollo embrionario. La embriogénesis somática es definida como un

proceso en el cual una estructura bipolar, con un eje radical y uno apical, semejante a un embrión cigótico, se desarrolla de una célula somática sin conexión vascular con el tejido original. Estas estructuras son capaces de crecer y formar plantas normales (Litz, *et al.*, 1991; Arnold *et al.*, 2002).

Un embrión puede ser definido como el más temprano estado multicelular reconocible de un individuo que ocurre antes de que se hayan desarrollado las estructuras u órganos característicos de una especie dada. Los embriones somáticos, asexuales o adventicios son los iniciados a partir de células que no son el producto de la fusión de gametos (Gray, 2000).

Mientras que la zanahoria fue la primera especie en que la embriogénesis somática *in vitro*, fue reportada; en los años siguientes muchas especies angiospermas y gimnospermas han sido adicionadas a la lista de éxitos (Gray, 2000). En cacao los primeros trabajos en embriogénesis somática, aunque sin la obtención de plantas fueron reportados por Esan (1977) y Pence (1979 – 1980) con explantes de embriones cigóticos inmaduros (Pence, 1995).

A partir de los intentos mencionados, se evaluó la capacidad embriogénica de diferentes explantes de la planta de cacao. Kononowicz *et al.* (1984) y Elhag *et al.*, (1988), trabajaron con embriones cigóticos extraídos de la semilla de cacao. Otros investigadores ensayaron nuevamente con embriones inmaduros (Novak *et al.*, 1986; Adu-Ampoah *et al.* 1988; Duham *et al.*, 1989; Dos Santos y Machado, 1989; Chatelet y Dufour, 1990). Aguilar y colaboradores (1992) y Omokolo *et al.*, (1997) probaron cotiledones maduros.

Estos métodos descritos fueron exitosos en producir embriones somáticos; sin embargo necesitaron explantes que no mantienen las características de sus progenitores y por lo tanto no son útiles para propagación clonal. Con el objetivo de mantener las características de las plantas progenitoras, se probaron tejidos somáticos; de esta manera Litz en 1986 utiliza el tejido de hojas

de cacao (Pence, 1.995). También se probaron nucelas en diferentes estados de desarrollo (Sondahl *et al.*, 1.989; Chatelet *et al.* 1.992; Figueira y Janick, 1.993). Sondahl *et al.*, (1.993), Lopez- Baez *et al.*, (1.993); Pence, 1.995; Lopez-Baez *et al.*, (1.996); Li *et al.*, (1.998) y Maximova *et al.*, (2.002) obtuvieron resultados promisorios en la obtención de embriones somáticos utilizando explantes florales.

De igual manera fue observada la respuesta de estos explantes en medios con diferente composición, teniendo en la mayoría de los casos el medio de Murashige y Skoog (1.962) como principal fuente de nutrientes inorgánicos (Figueira y Janick, 1.993; López-Baez *et al.*, 1.993). Pence *et al.*, (1.979) suplementó el medio basal con agua de coco y 1,5 mg/l de ANA, logrando la proliferación de embriones somáticos a partir de embriones sexuales.

Posteriormente, probó que tanto el ácido abscísico (ABA) como la sacarosa tienen efectos sobre la iniciación de los eventos asociados con la maduración del embrión *in vitro* (Pence, 1.995).

La eficacia del agua de coco también fue probada por Kononowicz *et al.*, (1.984a) y Elhag *et al.*, (1.988), obteniendo en ambos casos resultados positivos.

De acuerdo a Elhag *et al.* (1988) el 2,4-D no es esencial para la inducción de la embriogénesis somática en cacao, pero puede incrementarla en bajas concentraciones en algunos clones como el BC36. Chatelet *et al.*(1.992) obtuvieron células embriogénicas y proembriones en desarrollo temprano, cultivando nucelas y tegumento interno en medio MS suplementado con 4,5 uM de 2,4-D y 0,44 uM de BAP (Chatelet *et al.*, 1.992).

2.4. Medios de cultivo in vitro

2.4.1. Componentes de los medios de cultivo

Los componentes de los medios para el cultivo de tejidos incluyen macronutrientes, micronutrientes, un suplemento de hierro, vitaminas, una fuente de carbono y usualmente,

reguladores de crecimiento. Aparte del carbono, hidrógeno y oxígeno los constituyentes esenciales requeridos en relativamente grandes cantidades (macros) son el nitrógeno (N), fósforo (P), potasio (K), calcio (Ca), magnesio (Mg) y azufre (S). Trazas de ciertos elementos (micros) minerales son requeridos por todas las células vegetales, se incluyen el hierro (Fe), manganeso (Mn), zinc (Zn), boro (B), cobre (Cu), molibdeno (Mo), cobalto (Co), níquel (Ni) y Cloruro. Las vitaminas tienen funciones catalizadoras en ciertos sistemas enzimáticos por lo que también son necesarias en pequeñas cantidades. La tiamina es la única vitamina esencial para todos los cultivos, pero el ac. nicotínico y la piridoxina pueden también estimular el crecimiento. El ac. ascórbico (vit. C) en combinación con el ac. cítrico es utilizado como antioxidante. Todos los medios de cultivo requieren la presencia de una fuente de carbono y energía. Una respuesta óptima de crecimiento es determinante cuando se utiliza sacarosa o d-glucosa como fuente de carbón en el medio de cultivo, mientras que con otros sacáridos la respuesta es considerablemente variable. El mio-inositol es adicionado en algunos suplementos vitamínicos como un factor de crecimiento. Aunque este compuesto es un carbohidrato, tiene funciones especiales principalmente en la formación de fosfoinosítidos y fosfatidilinositol. Los reguladores de crecimiento son utilizados en el medio de cultivo cuando se desea forzar la dirección de la morfogénesis o bien potenciar la multiplicación de tejido. Las Auxinas son compuestos que estimulan la elongación de las células de brotes- Son usadas para estimular la formación de raíces adventicias, inhibir la formación de yemas y juegan un rol importante en la embriogénesis. Las principales son el ácido indol-acético, ácido indolbutírico y ácido naftalenacético. El ácido 2,4-D es un regulador sintético que cumple funciones sobresalientes substituyendo auxinas, principalmente en la formación de tejido de callos, sin embargo, suprime la organogénesis, y no deben ser usados en medios que involucren la formación de brotes o raíz. Las citocininas promueven la división células de los tejidos bajo ciertas

condiciones de ensayo. En el cultivo de callo estimulan la formación de brotes e inhiben la formación de raíz. Las citocininas son principalmente derivados de amino purinas. La combinación axino-citocininas regulan la división, elongación y diferenciación celular así como la formación de órganos. Otro grupo de reguladores de crecimiento son las giberelinas las cuales son usadas raramente, como en el caso de cultivos de meristemos (Contreras, 2.016).

2.4.2. Medios de cultivo para la propagación de embriogénesis

Kononowicks *et al.*, (1.984a) trabajó con 2,4-D y observó que en altas concentraciones induce la formación de callo y suprime la producción de embriones. Sin embargo, Omokolo *et al.*, (1.997) indujo la formación del callo en un medio MS suplementado con 2,4-D como principal elemento regulador, aunque adicionó una citocinina (2-iP o BAP) para el desarrollo del callo. Sondahl *et al.*, (1.993) utilizó un medio MS con sales reducidas enriquecido con auxina, citocinina, polivinilpirrolidona (PVP) y varios compuestos orgánicos como caseína hidrolizada, cisteína, extracto de malta y agua de coco para regeneración. Como resultado el 4,3% de explantes produjeron embriones somáticos. Así mismo citocininas, auxinas, ácido giberélico (GA3) y ácido abscísico (ABA) se han utilizado para el desarrollo y maduración de los embriones somáticos; así como sacarosa y carbón activado (Pence, 1.995). Omokolo *et al.*, (1.997) utilizó IBA en cacao y logró promover la inducción de embriones somáticos y también rizogénesis.

Li *et al.* (1.998) lograron inducir un crecimiento rápido del callo utilizando el medio DKW (Woody Plant Medium) para crecimiento primario y medio PCG (Primary Callus Growth) suplementado con Thidiazuron (TDZ). El efecto de la consistencia de los medios de cultivo fue estudiado por Adu-Ampomah *et al.*, (1.988), resultando el medio líquido más adecuado para promover el desarrollo de embriones, mientras que el medio sólido permitió abundante formación de callo.

Figueira y Janick (1.993) también usaron medio líquido y sólido. Estos autores lograron la formación de embriones nucleares en medio de iniciación líquido. Los embriones fueron transferidos posteriormente a medio semisólido donde se desarrollaron los estados globulares y torpedo del embrión; no obstante la maduración final fue realizada también en medio líquido.

Pence *et al.*, (1.979) cultivó explantes en la luz y en oscuridad sin obtener diferencias entre estos tratamientos. La mayor parte de los trabajos en embriogénesis somática en cacao, han sido realizados en la oscuridad (Adu-Ampomah *et al.*, 1.988; Sondhal *et al.*, 1.989; Aguilar *et al.*, 1.992).

Aunque el régimen de cultivo puede influenciar en el potencial embriogénico, en cacao las diferencias genóticas tienen también gran influencia en la capacidad a la embriogénesis somática (Adu-Ampomah *et al.*, 1.988).

Pence *et al.*, (1.979) observaron una mejor respuesta de los genotipos UF221 y 41R a la embriogénesis somática frente a SIAL 93 y UF 11. Asimismo, se mencionan diferentes respuestas de los clones de BC5, BC6 y BC36 ante los efectos del 2,4-D, del agua de coco, BA, prolina, sulfato de amonio y sulfato de adenina, así como a la aplicación de ácido giberelico (Kononowickz, 1984a; Kononowickz, 1984b; Elhag *et al.*, 1.988).

Se observó diferencia en la capacidad de iniciación de callo y de la embriogénesis somática en los explantes de S19, T79/501 y T63/967 al ser cultivados en un medio conteniendo 10 uM de ANA. El genotipo S19 produjo más callo, pero menos número de embriones por explante, los cuales fueron también más pequeños que aquellos regenerados de T79/501 y T63/967. Sin embargo, cuando los explantes fueron subcultivados en un medio diferente, S19 produjo más embriones somáticos que los otros dos genotipos estudiados (Adu-Ampomah *et al.*, 1.988).

Alemanno *et al.* (1.996) indican que cuando se utilizó el protocolo modificado de Lopez – Baez *et al.*, (1.993), solo 5 de 25 genotipos de cacao estudiados produjeron embriones somáticos, mientras que el resto no respondieron. Por otra parte, Li *et al.* (1.998) lograron estimular la embriogenesis somática de 19 genotipos de cacao, representantes de los 3 grupos más grandes (Forastero, Trinitario y Criollo), observando diferente respuesta en cada uno de los clones estudiados.

3. Materiales y Métodos.

3.1. Ubicación del área de estudio.

El trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal perteneciente a la Facultad de Ciencias Biológicas y Naturales (FCBN) de la Universidad Amazónica de Pando en el Municipio de Cobija. Departamento Pando.

Geográficamente se encuentra ubicada a 11° 01' 59,20'' latitud sur y 62° 45' 31,13'' de longitud oeste, cuenta con una temperatura promedio de unos 23°C a 36°C.

Figura 2

Croquis de ubicación del laboratorio de biotecnología vegetal



Fuente: Elaboración propia

3.1.1. Clima

En Cobija, la temporada de lluvia es opresiva y nublada, la temporada seca es bochornosa y parcialmente nublada y es muy caliente durante todo el año. Durante el transcurso del año, la temperatura generalmente varía de 18 °C a 33 °C y rara vez baja a menos de 15 °C o sube a más de 37 °C.

3.2. Materiales

3.2.1. Material vegetal

Para este estudio se utilizó estaminodios obtenidos de botones florales de cacao silvestre (*Theobroma cacao* L.)

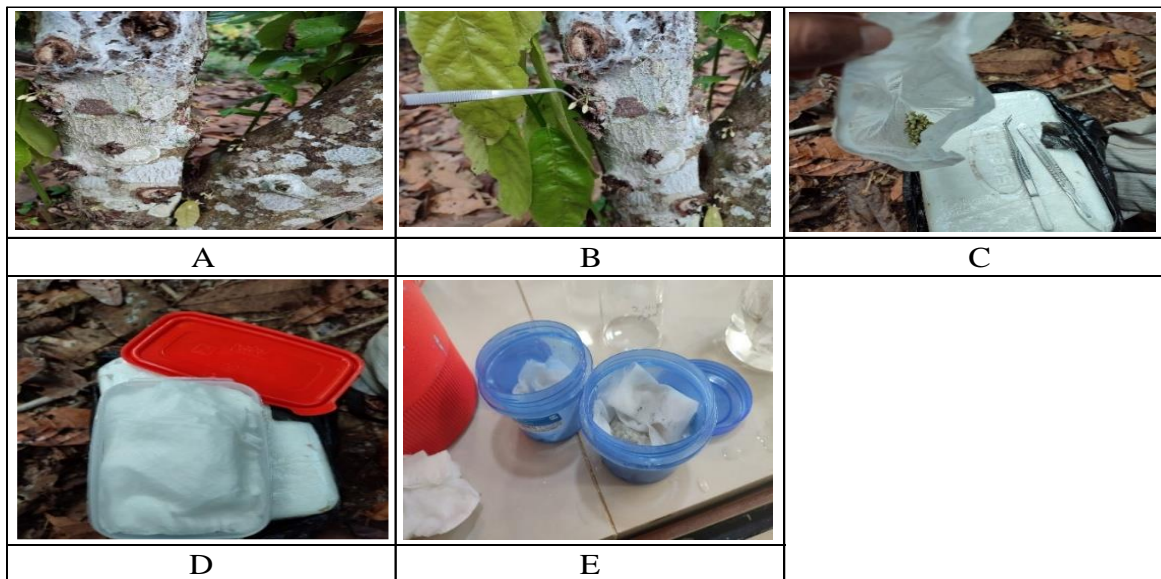
3.2.2. Colecta de los explantes (botones florales)

Los botones florales utilizados en este estudio fueron obtenidos de una planta madre de cacao silvestre, localizadas en condiciones naturales dentro del monte en la comunidad nueva Versalles del municipio de Filadelfia ubicada a 120 km de la ciudad de Cobija.

Seguidamente, los explantes fueron colocados en un recipiente cerrado con agua destilada fría y transportados al laboratorio de biotecnología vegetal

Figura. 3

Extracción de botones florales de cacao (Theobroma cacao L.) y métodos de traslado de material vegetal



A) Identificación de material vegetal. **B)** extracción de botón floral. **C)** botones florales colectados. **D)** envase con botones florales listos para ser transportados. **E)** botones florales en el laboratorio

Fuente: Elaboración propia

3.3. Materiales de laboratorio.

EQUIPOS DE LABORATORIO	MATERIAL DE VIDRIO Y PLÁSTICO	MATERIAL QUÍMICO	INSTRUMENTOS E IMPLEMENTOS DE LABORATORIO	MATERIAL DE ESCRITORIO
Agitador magnético.	Placas Petri	Sacarosa	Algodón	Papel bond A4
Autoclave.	Probetas (10, 50, 100, 500 ml.).	Auxinas	Bisturí	Regla
Balanza analítica.	Vasos de precipitación (25, 50, 800 y 1000 ml)	carbohidratos	Mechero de alcohol o Bunsen	Lapicero
Cámara de flujo laminar de aire.	Frascos de vidrio para almacenar soluciones (250, 500 ml).	Vitaminas	Papel aluminio	Lápiz
Horno microondas.		Micro elementos	Pinzas	Cámara fotográfica
pH metro.		Macro elementos	Espátula	Computadora.
Refrigerador.		Alcohol	Papel esterilizado	impresora
Temporizador (Control de horas luz - oscuridad).		Hipoclorito de sodio (cloro)	Gradilla	
Termó-higrometro digital.		Cloruro de mercurio		
Vitrinas con reguladores de luz		Sulfato de cobre pentahidratado (Phyton)		
Cámara de inducción térmica		Phytigel		
		Monooleato de polioxietilensorbitan (Tween 80)		
		Hidróxido de sodio		
		Agua destilada estéril		
		Driver y Kuniyuki (1984). (DKW)		

Fuente: Elaboración propia

Los equipos, reactivos, materiales e insumos (cuadro N° 1) que se utilizarán para este trabajo de investigación están a disposición del Laboratorio de Biotecnología Vegetal del Área de Ciencias Biológicas y Naturales de la Universidad Amazónica de Pando.

3.4. Metodología.

3.4.1. Preparación de área de estudio

Se realizó la preparación del laboratorio para obtener la investigación correctamente, la esterilización de los materiales y herramientas a utilizar para no contaminar el medio de cultivo, la desinfección de herramientas se hizo mediante el auto clavado a una temperatura de 120 °C, luego se realizó la desinfección de los equipos y el ambiente.

Figura.4

Preparación del área de estudio



a) Autoclave



b) Material esterilizado



c) Cajas petri

Fuente: Elaboracion propia

3.4.2. Preparación de medio de cultivo

Para la preparación del medio de cultivo se utilizó un vaso precipitado de 1000 ml donde se echó agua destilada 800 ml, también se le agregó 4,176 gramos de DKW (driver y kuniyuki 1984)

Tabla 1

Protocolo de macro y micronutrientes del medio de cultivo DKW (driver y kuniyuki 1984)

COMPUESTOS	DKW Mg/1t (Mm)
Macro nutrientes	
NH ₄ NO ₃	1416 (17,68)
KNO ₃	-----
MgSO ₄ ,7H ₂ O	740 (3.0)
CaCl ₂ , 2H ₂ O	149 (1,01)
KH ₂ PO ₄	265 (1,95)
Ca(NO ₃) ₂ , 4H ₂ O	1967 (8,33)
K ₂ SO ₄	1559 (8,96)
Micronutrientes	
KI	-----
H ₃ BO ₃	4.8 (0,078)
MnSO ₄ , 4H ₂ O	33,5 (0. 195)

ZnSO ₄ , 7H ₂ O	-----
Na ₂ MoO ₄ , 2H ₂ O	0,39 (0,0156)
CuSO ₄ , 5H ₂ O	0,25 (0,001)
CoCl ₂ , 6H ₂ O	-----
Na ₂ EDTA	45,4 (0,12)
FeSO ₄ , 7H ₂ O	33,8 (0,12)
NiSO ₄ , 6H ₂ O	0,005 (0,00002)
Zn(NO ₃) ₂ , 6H ₂ O	17 (0,057)

Nota: obtenido de la investigación Rescate y germinación in vitro de embriones inmaduros de cedro negro (*Juglans neotropica* Diels); por (Quintero-García & Jaramillo-Villegas, 2012).

Seguidamente se le agrego sacarosa 24 gr y vitaminas 16 ml, una vez agregado los tres mencionados, se le llevo al agitador magnético para que mezcle y disuelva bien los reactivos.

Una vez mezclado se procedió a dividir el medio preparado; se utilizó también 7 vasos precipitados de 150ml a donde se echó a cada vaso 120 ml del medio preparado, luego, después de dividir el medio de cultivo se procedió a poner las axinas en 6 vasos precipitados y uno quedo como **T1. Testigo** (sin auxinas).

De acuerdo al diseño experimental se utilizó **3 ml, 5 ml y 7 ml de PICLORAM y 3 ml, 5 ml y 7 ml de 2,4-D (Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético)**

Con la ayuda de una jeringa de 10 ml se procedió hacer la medición del PICLORAM y se puso en 3 vasos precipitados las cantidades necesarias de acuerdo al diseño experimental, **T2. 3 ml de PICLORAM, T3. 5 ml de PICLORAM y T4. 7 ml de PICLORAM** de igual forma se hizo lo mismo con el 2,4-D, con una jeringa se hizo la medición y se puso en 3 vasos las cantidades necesarias de acuerdo al diseño experimental. **T5. 3 ml de 2,4-D, T6. 5 ml de 2,4-D y T7. 7 ml de 2,4-D.**

Figura 5

preparación del medio de cultivo y sus respectivos tratamientos.



A) Auxinas a evaluar, **B)** medio de cultivo preparado con diferentes tratamientos

Fuente: Elaboración propia

Colocadas todas las auxinas en seis vasos precipitados se procedió a medir el PH con la ayuda del PH metro, el rango de PH que se calibro fue de 5,67 a 5,71, luego se procedió a colocar 1,6 gr de pita gel en todos los vasos precipitados que contienen el medio de cultivo DKW (1984) incluyendo el testigo.

Figura 6

Regulando el ph del medio de cultivo

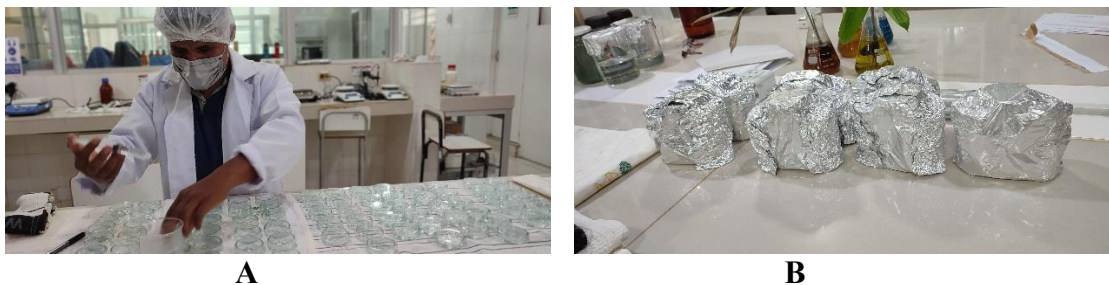


Fuente: Elaboración propia

Por último, una vez hecho todos estos procedimientos, se hizo hervir el medio preparado en una estufa, y ya hervido se procedió a colocar 10 ml de medio de cultivo en las cajas Petri con la ayuda de una jeringa de 10 ml, luego las cajas Petri que contienen el medio de cultivo DKW (1984) se envolvió con papel aluminio los cuales fueron esterilizados en autoclave a 120°C y 1,3 atm de presión durante 20 min. A si mismo las cajas Petri de acuerdo a los tratamientos fueron colocados dentro de una estufa de secado.

Figura.7

Aplicación de 10 ml de medio de cultivo en cajas Petri de acuerdo al tratamiento y posteriormente esterilizar los medios en autoclave



A) Aplicando medios de cultivo en cajas Petri **B)** cajas Petri esterilizadas envueltas con papel aluminio

Fuente: Elaboración propia

3.4.3. Métodos establecimiento *in vitro* de botones florales de cacao.

3.4.3.1. Desinfección de los explantes: Una vez llevadas al laboratorio fueron sometidos a procesos de desinfección. En la cámara de flujo laminar, los botones colectados se desinfectaron de la siguiente manera:

Los botones florales de cacao fueron sacados del envase en el que se transportó hasta el laboratorio de biotecnología vegetal para que posteriormente se dé una breve lavada con detergente y después enjuagar con agua destilada, una vez hecho este procedimiento se llevó a la cámara de flujo laminar para hacer la respectiva desinfección de los botones florales:

Los botones florales de cacao se introdujeron a hipoclorito de sodio al 1% durante 5 min. Al igual que (Díaz, 2017) y se enjuago tres veces con agua destilada.

Figura.8

Proceso de desinfección de botones florales de cacao (Theobroma cacao L)



- A) Material vegetal en envase cerrado
- B) Lavado de material vegetal con detergente
- C) Enjuague con agua destilada
- D) Desinfección con hipoclorito de sodio al 1% y enjuague 3 veces con agua destilada.

Fuente: Elaboración propia.

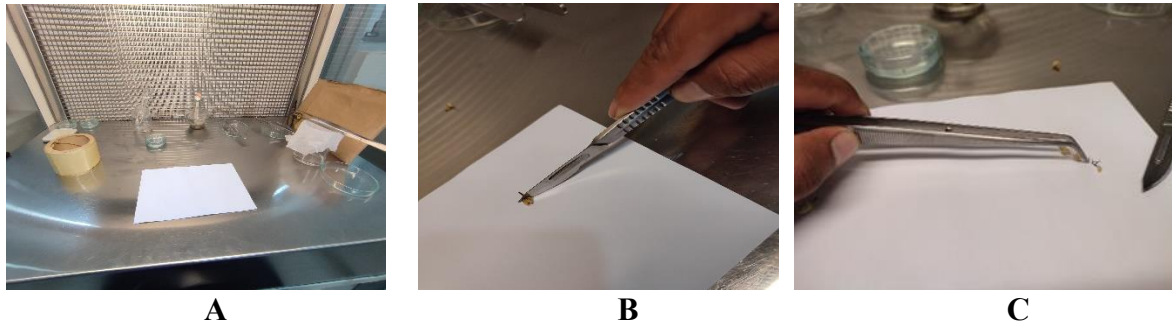
3.4.3.2. Disección de los explantes: la cámara de flujo laminar fue desinfectada con alcohol de 70° con la ayuda de papel absorbente, se puso un quemador en la mesa de la cámara de flujo laminar, se utilizaron dos bisturís, dos pinzas de punta fina, una caja Petri de 50 ml, papel esterilizado y un tubo de ensayo de 100 ml llenado de alcohol de 90°. **(figura 9 (A))**

Los botones florales desinfectados fueron seccionados con la ayuda de una pinza y un bisturí, la disección se realizó a $\frac{3}{4}$ del botón floral para la fácil extracción del estaminodio, extraemos el estaminodio y con la ayuda de una pinza de punta fina se introdujo los estaminodios al medio de cultivo.

Posteriormente se tapó la caja Petri, se envolvió con plástico de Parafilm, y el papel ya usado se dobló y se metió a una bolsa para no contaminar los otros explantes, este procedimiento se realizó para todos los tratamientos.

Figura.9

Diseción de los botones florales



- A) Material vegetal y materiales de laboratorio listo para hacer la introducción
B) Diseción de botón floral
C) Extracción de los estaminodios para luego introducir al medio de cultivo DKW (1984)

Fuente: Elaboración propia.

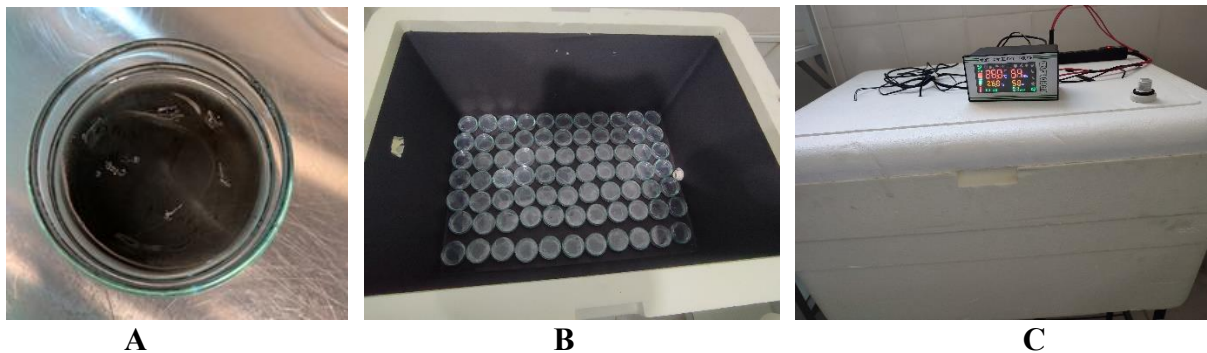
3.5. Introducción en el medio de cultivo:

Los estaminodios fueron introducidos de la siguiente manera:

Con la ayuda de la pinza de punta fina estéril se agarró los estaminodios y se puso en el medio de cultivo, la forma en que se puso los estaminodios, simplemente fueron encima del medio de cultivo (figura 10) y en forma circular los cinco estaminodios que contiene un botón floral. Posteriormente se llevó todos los tratamientos a una cámara de inducción térmica en total oscuridad por 50 días a una temperatura de 25°C

Figura.10

Introducción de los estaminodios al medio de cultivo DKW (1984)



- A) Estaminodios introducidos en medio de cultivo en forma circular

- B) Tratamientos introducidos a la cámara de inducción térmica
- C) Cámara de inducción térmica cerrada, programada a 26°C de temperatura

Fuente: Elaboración propia

3.6. Diseño Experimental

El presente trabajo es un diseño enteramente casualizado con 11 repeticiones donde cada repetición es una unidad experimental.

Tabla 2

Diseño experimental de 2 factores y 7 tratamientos de 11 repeticiones

Tratamientos	Factor A (auxinas)	Factor B (dosis)
T.1	0 ninguna (TESTIGO)	0 ml
T. 2	Picloram	3 ml
T. 3	Picloram	5 ml
T. 4	Picloram	7 ml
T. 5	2,4-D	3 ml
T. 6	2,4-D	5 ml
T.8	2,4-D	7 ml

Fuente: Elaboración Propia

El diseño que se empleó para el trabajo de investigación fue completamente al azar con 11 repeticiones, por lo tanto, el número de unidades experimentales será de $2 \times 3 \times 11 = 66$ y **Testigo** 11 repeticiones. **Total 77 repeticiones**

3.7. Modelo estadístico

Los datos de cada una de las variables de respuesta serán sometidos a los supuestos diseño experimental, se analizarán según el siguiente modelo estadístico:

$$Y_{ijkl} = \mu + Bi + Aj + Ck + Ijk + \epsilon_{ijkl}$$

Donde:

Y_{ijkl} = Variable respuesta en la unidad experimental l en la i -ésima REPETICIÓN del j -ésimo TRATAMIENTO y el k -ésimo CONCENTRACION

μ = Media general

B_i = Efecto del i-ésimo BLOQUE O REPETICIÓN

A_j = Efecto de la j-ésima AUXINA

C_k = Efecto del k-ésimo CONCENTRACIONES DE LAS AUXINAS

$I.j.k$ = Efecto DE LA INTERACCIÓN

ϵ_{ijkl} = Error EXPERIMENTAL

En base al modelo definido, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) con interacción utilizando el software SISVAR®, con el objetivo de probar hipótesis sobre los efectos fijos de los tratamientos. Posteriormente, se aplicaron pruebas de comparación de medias mediante la prueba de Tukey y contrastes ortogonales de un grado de libertad, con el fin de determinar y evaluar la formación de callos embriogénicos a partir de estaminodios de botones florales de cacao silvestre (*Theobroma cacao* L.)

3.8. Variables de respuesta:

Los explantes fueron observadas durante 45 días, las variables a evaluar fueron:

3.8.1. Porcentaje de contaminación:

Se pudo observar y determinar el tipo de contaminación en los medios de cultivo y explantes de cacao (*teobroma cacao* L.) para observar la contaminación en los tratamientos se utilizó un estereoscopio.

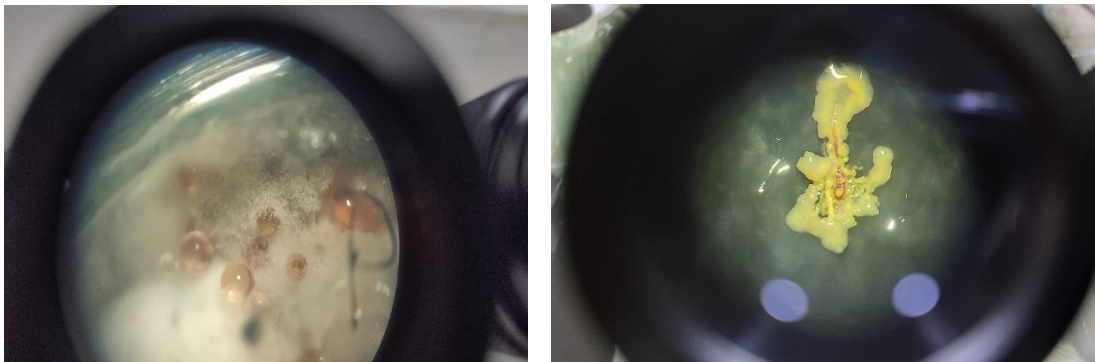
Según (Suárez E. P., 2020) las plantas en su condición de crecimiento natural tienen asociadas una fauna y flora microbiana con la cual interactúan sin verse afectado su desarrollo; por el contrario. Algunos microbios, dentro de los que se encuentran ciertas bacterias, actúan como agentes endófitos benéficos asociados al sistema vascular de la planta. Sin embargo, en

condiciones de cultivo *in vitro*, estos microbios se convierten en contaminantes o agentes facilitadores de contaminación para los explantes.

La contaminación en cultivos *in vitro* ocurre cuando no se realiza una buena y adecuada desinfección, ya sea de los materiales de trabajo como del material vegetal, que en este caso son botones florales de cacao (*Theobroma cacao* L.). En caso de que ocurra la contaminación en el cultivo *in vitro* provoca que este sea inseguro y no apto para su estudio. Los contaminantes más frecuentes en condiciones *in vitro* son los hongos y bacterias denominados vitropatógenos.

Figura 11

Tipos de contaminación en cultivo in vitro



A) Contaminación por hongo

B) contaminación por bacterias

Fuente: Elaboración propia

3.8.2. Oxidación de los explantes:

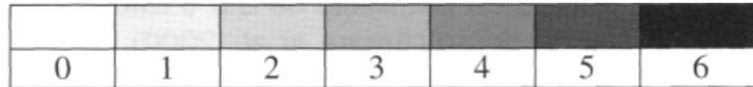
Esta variable consistió en observar el cambio de coloración de los explantes. La oxidación se evaluó según la escala de niveles de oxidación diseñada por Quintero y Jarma (2002) en el laboratorio de cultivo de tejidos vegetales, en la cual se designaron 7 valores de acuerdo con la intensidad de oxidación (oscurecimiento) del medio de cultivo.

Esta escala contempla 7 niveles numerados de 0 (medios no oxidados) a 6 (medio completamente oxidado), incluidos valores de 1, 2, 3, 4 y 5, los cuales hacen también referencia a

niveles intermedios de oxidación. Los niveles se representan en una escala con intensidades en tono gris, igualmente espaciados desde el 15% hasta el 90%. Se considera la semejanza que estas tonalidades tienen con la coloración real presentada en el medio de cultivo.

Figura 12

Niveles de oxidación.



Nota: Escala para medir niveles de oxidación en medios de cultivo. Laboratorio de cultivo de tejidos vegetales. Universidad de Córdoba (Quintero y Jarma, 2.000)

3.8.3. Reactividad y estado evolutivo del callo embriogénico:

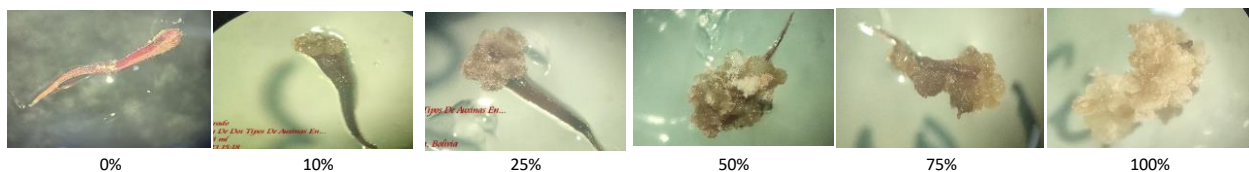
3.8.3.1 Porcentaje de Inflamación del estaminodio: La inflamación es uno de los primeros cambios que se presentan en los explantes después de la inducción, esta variable consistió en observar los estaminodios con un estereoscopio el cambio físico que experimentan los estaminodios con la reacción de las hormonas

La evaluación se realizó a los primeros 15 días después de la introducción.

3.8.3.2. Porcentaje de formación de callo embriogénico. Para evaluar el porcentaje de formación de callos se utilizó una escala de: 0%, 10%, 25%, 50%, 75% y 100%

Figura. 13

Desarrollo de callos en estaminodios



Fuente: Elaboración propia

3.8.3.3. Posición de aparición de callo en el estaminodio: Para esta variable se utilizó un microscopio para poder observar las apariciones de callos en el estaminodio de cacao y se registró en una planilla clasificando en ocho posiciones como ser:

- a) en la base del estaminodio
- b) callo en la parte media del estaminodio
- c) callo en la parte distal del estaminodio
- d) callo en la parte basal y media del estaminodio
- e) callo en la parte basal y distal de estaminodio
- f) callo en todo el estaminodio
- g) parte distal y medio
- h) en la parte basal distal y medio del estaminodio

3.8.3.4. Coloración de callo primario: Se observó con el microscopio la coloración que experimentan todos los callos embriogénicos de todos los tratamientos para su evaluación se clasifico de la siguiente manera:

- a) explantes con callo cristalino
- b) explantes con callo de coloración cremosa
- c) callo de coloración oscura

3.8.4. Presencia de embriones:

Hasta el día 45 o última evaluación no se presentaron brotes de embriones como se ve en la (figura. 14)

Figura. 14

Embrión de tipo torpedo



Nota: Obtenido de la guía de micropropagación; realizado por Navarro & Delgado, 2020

4. Resultados

4.1. Porcentaje de contaminación:

Para la variable de contaminación, se observó una mayoría de los explantes permanecieron sanos, lo que refleja un manejo excepcional en las condiciones de cultivo in vitro. La alta tasa de éxito muestra que los protocolos de esterilidad y las prácticas experimentales fueron ejecutados con precisión, minimizando cualquier tipo de contaminación.

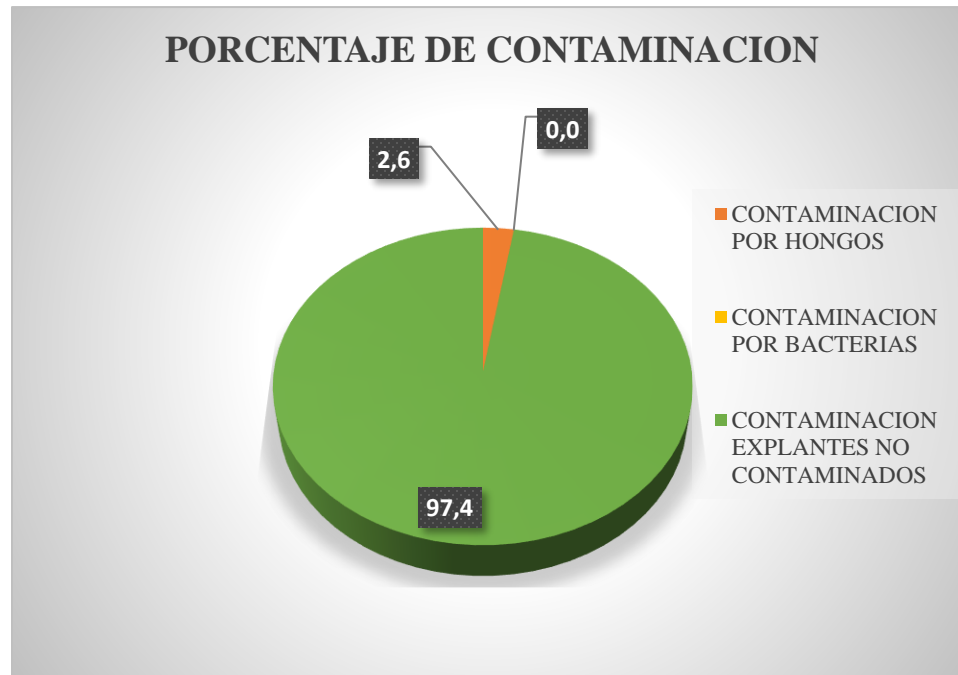
El porcentaje de contaminación por hongos fue bajo, pero existe y podría atribuirse a contaminaciones externas durante la manipulación, material vegetal no completamente esterilizado o esporas resistentes presentes en el ambiente. Este resultado indica que, aunque el control fue efectivo, podrían optimizarse algunas medidas preventivas para reducir aún más este tipo de contaminación.

La ausencia completa de contaminación por bacterias es un excelente indicador de éxito. Esto implica que los medios de cultivo, herramientas y el ambiente de trabajo estuvieron bajo control absoluto, eliminando por completo las posibles fuentes de contaminación bacteriana.

En el análisis de la contaminación en cultivos in vitro, en la gráfica circular, los resultados revelaron que el **97.40%** de los explantes permanecieron sanos (**figura 15**), destacando la efectividad de las medidas de esterilidad y manejo experimental. Solo un **2.60%** de los explantes presentó contaminación por hongos, lo que sugiere la necesidad de ajustes menores en las estrategias de control fúngico. Por otro lado, la contaminación por bacterias fue completamente nula (**0%**), reflejando el éxito de los protocolos implementados. Este alto porcentaje de explantes sanos garantiza la fiabilidad y continuidad del experimento, minimizando riesgos para los resultados obtenidos en cultivo in vitro de cacao (*Theobroma cacao* L.)

Figura. 15

Grafica de porcentaje de contaminación por hongos y bacterias en los explantes



Nota: A los 45 días después de la implementación se observó 97,4% de explantes libres de contaminación; *Fuente:* Elaboración propia.

4.2.Oxidación.

Para el control de niveles de oxidación en la formación de callos embriogénicos de cacao (*Theobroma cacao* L.), se pudo observar en toda la investigación utilizando dos tipos de auxinas como el PICLORAM con 3 ml, 5 ml y 7 ml de dosificación y 2,4-D con 3 ml, 5 ml y 7 ml de dosificación porcentaje de oxidación.

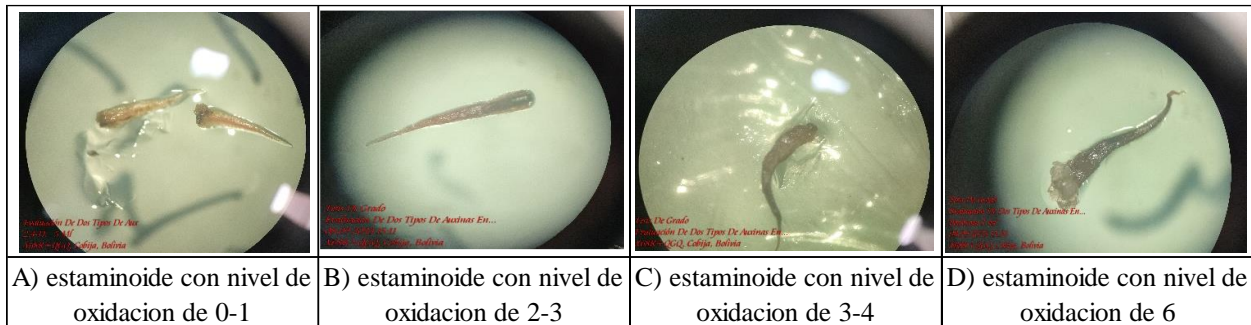
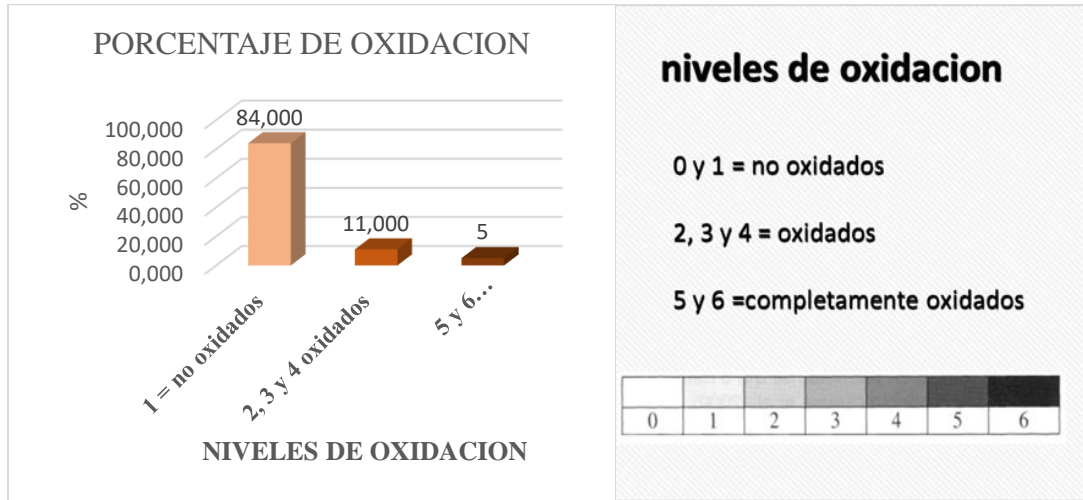
En el gráfico de barras se pudo evidenciar que un **84%** del total de repeticiones no presento oxidación eso quiere decir que estaría en el rango de nivel de oxidación de 0 a 1= no oxidados

En el rango de niveles de oxidación **2,3 y 4= oxidados**, se observó un **11%** del total de repeticiones oxidados, los cuales igual se observaron presencia de callos en los estaminodios, y un

5% del total de repeticiones se evidencio oxidación de niveles 5 y 6 =*completamente oxidados*, los estaminodios completamente oxidados no llegaron a formar callos ni inflamación.

Figura. 16

Gráfico de barras de porcentaje total de estaminodios oxidados en la fase de establecimiento.



Nota: Niveles de oxidación en explantes de estaminodios de cacao en la fase de establecimiento;

Fuente: Elaboración propia.

4.3. Reactividad y estado evolutivo del callo embriogénico

4.3.1. Inflamación de estaminodios

El análisis de varianza realizado sobre la variable dependiente ‘inflamación’ evidenció que el factor tipo de auxina presentó un efecto altamente significativo (CM = 0,0006; $p < 0,01$), mientras que el factor dosis (3 ml, 5 ml y 7 ml) mostró un efecto significativo (CM = 0,0102; $p <$

0,05). En contraste, la interacción entre ambos factores (auxinas × dosis) no fue estadísticamente significativa (CM = 0,677; $p > 0,01$), lo que indica que sus efectos son independientes. El coeficiente de variación (CV) fue de 28,73 %, lo cual representa una dispersión aceptable dentro de estudios fisiológicos, respaldando la confiabilidad de los datos obtenidos y la pertinencia del diseño experimental aplicado.

Tabla. 3

Análisis de varianza para la variable inflamación de estaminodios.

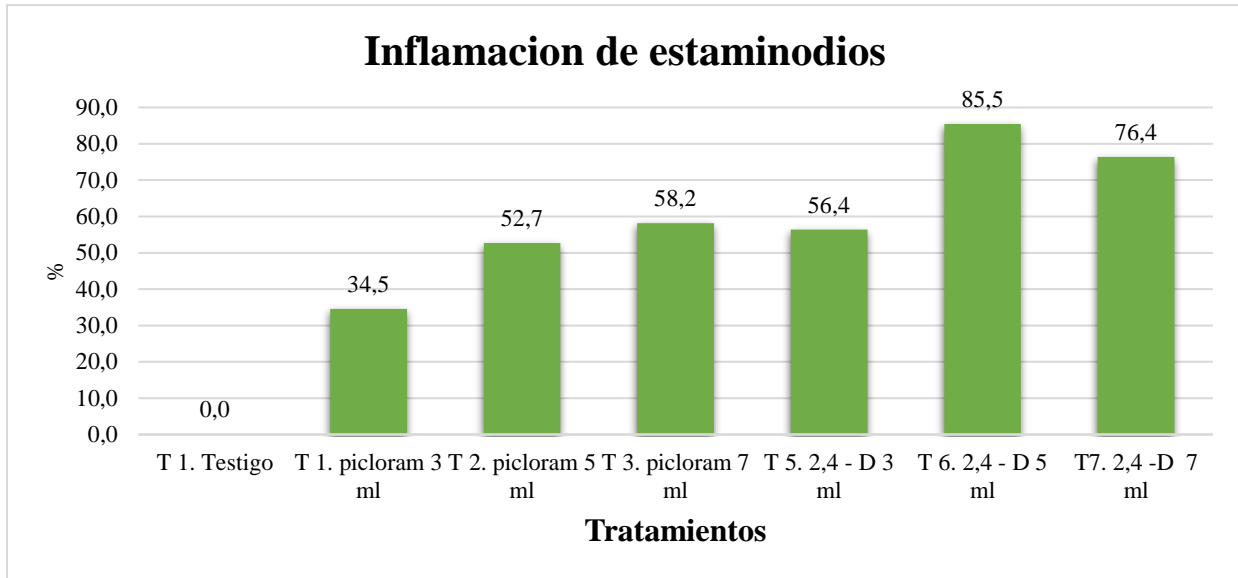
FUENTE DE VARIACIÓN	CM
	INFLAMACION
AUXINAS	0,0006 **
DOSIS	0,0102 *
AUXINAS*DOSIS	0,677 ns
CV	28,73

Notas: ^{ns} no significativo ($p > 0,01$); * significativo a 5% ($p < 0,05$); ** significativo a 1% ($p < 0,01$)

Para la variable de hinchazón de estaminodios, se muestra en el gráfico de barras (figura 17) que en el T1 testigo, no se produjo inflamación de los estaminodios debido a que no contenía ningún tipo de concentración de auxinas, seguidamente se observa que el **T2. (3 ml de picloram)** con un porcentaje de 34,5% de estaminodios inflamados, también se ve que los tratamientos como **T3. (5 ml picloram)**, **T4. (7 ml de picloram)** y **T5. (3 ml de 2,4-D)** tienen porcentajes de inflamación comparables, Estos tratamientos tienen medias superiores (52.72 a 58.18) indicando un efecto intermedio. Los **T6. (5 ml 2,4-D)** y **T7. (7 ml 2,4-D)**, Obtienen las mayores medias (76.36 y 85.45, respectivamente), mostrando el mayor efecto en inflamación. Sin embargo, podemos destacar el T6, (5 ml de 2,4-D) como el mejor tratamiento para promover la inflamación de estaminodios de cacao (*Theobroma cacao* L.)

Figura. 17

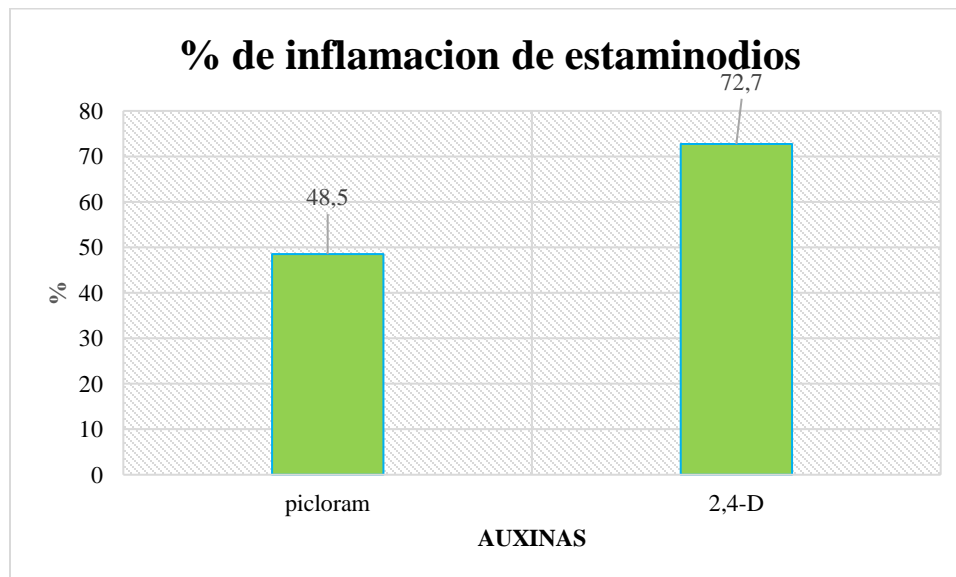
Grafica de barras de porcentaje de inflamación de explantes en la etapa de establecimiento.



Nota: El T6. 5 ml de 2,4-D presento mayor reactividad; Fuente: elaboración propia.

Figura. 18

Grafica de barras de porcentaje de inflamación de explantes por auxinas.



Fuente: Elaboración propia.

Figura. 19

Explante de estaminodio normal y estaminodio inflamado



A) Estaminodio normal



B) Estaminodio inflamado

Nota: La reactividad se observó a los 15 días después del establecimiento; *Fuente:* elaboración propia.

4.3.2. Porcentaje de formación de callo embriogénico.

El análisis de varianza aplicado al porcentaje de formación de callo reveló que tanto el tipo de hormona como la dosis (3 ml, 5 ml y 7 ml) ejercieron efectos altamente significativos sobre la variable evaluada (CM = 0 y CM = 0,0004; $p < 0,01$, respectivamente). Además, se detectó una interacción significativa entre ambos factores (CM = 0,0215; $p < 0,05$), lo que indica que el efecto de las hormonas sobre la formación de callo varía en función de la dosis aplicada. El coeficiente de variación (CV) fue de 35,2 %, lo que refleja una dispersión moderada-alta entre las repeticiones, aceptable en estudios fisiológicos

Tabla. 4

Análisis de varianza para la variable porcentaje de formación de callos.

FUENTE DE VARIACION	CUADRADO MEDIO % DE FORMACION DE CALLO
HORMONAS	0 **
DOSIS	0,0004 **
HORMONAS*DOSIS	0,0215 *
CV (%)	35,2

Notas: ^{ns} no significativo ($p > 0,01$); * significativo a 5% ($p < 0,05$); ** significativo a 1% ($p < 0,01$)

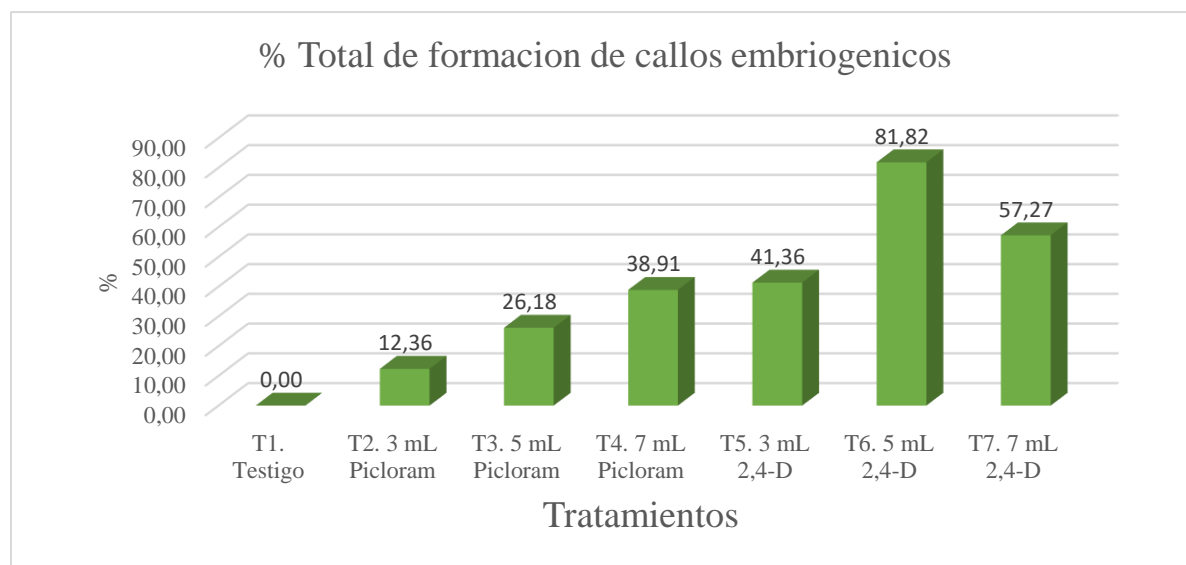
Para la variable de porcentaje de formación de callos embriogénicos, se pudo evidenciar en la gráfica de barras (figura 19) que el **T6. (5 ml de 2,4D)** presenta mayor porcentaje de formación de callos, siendo significativamente diferentes a los demás.

Así mismo se observa que el **T1. Testigo** no mostró formación de callos, confirmando que sin reguladores de crecimiento no hay respuesta en cuanto a la formación de callos embriogénicos

También se observa que en los **T2 (3 ml picloram), T3 (5 ml picloram) y T4 (7 ml picloram)** presentan un aumento progresivo en la formación de callos, pero sin alcanzar los valores de 2,4D. los tratamientos con **2,4D (T5-T7)** presentan una mayor respuesta a comparación del **picloram**, por otro lado, el **T7. (7 ml de 2,4D)** muestra que la efectividad disminuye ligeramente.

Figura. 20

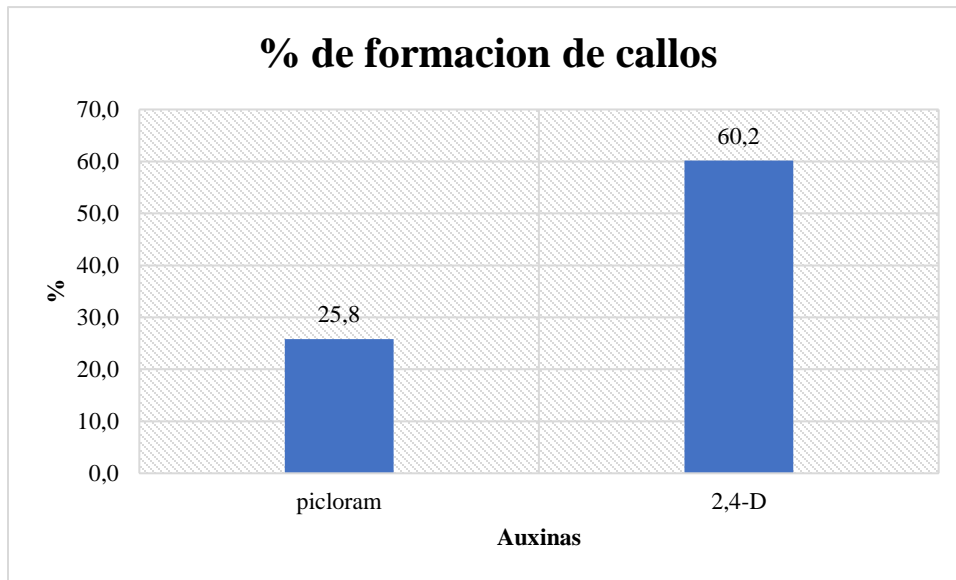
Porcentaje de formación de callos



Fuente: Elaboración propia.

Figura 21.

Porcentaje de formación de callos embriogénicos por tipo de auxinas.



Fuente: Elaboración propia.

4.3.3. Posición de aparición del callo en el estaminodio:

Para la variable de reactividad y estado evolutivo del callo se pudo observar en la etapa de inducción que desde la primera evaluación los callos fueron evolucionando hasta la tercera evaluación

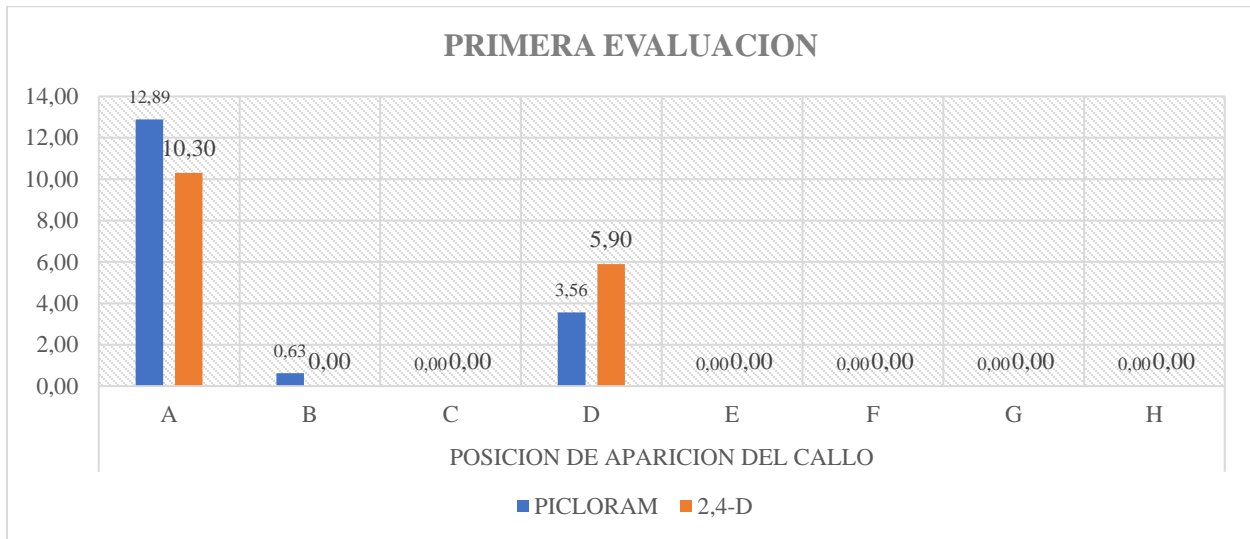
A los 15 días de inducción de los explantes, se observa mayor aparición en el la parte basal del estaminodio tanto en picloram como en el 2,4-D así mismo se observa que en el picloram y el 2,4-D hay un porcentaje mínimo de aparición en la parte basal y media del estaminodio. (**figura 20**) y en las otras áreas del estaminodio no se vieron apariciones de callo.

En la segunda evaluación (**figura 21**) se presenta una evolución significativa, apareciendo callos en otras áreas del estaminodio, destacando que el área basal tiene el mayor porcentaje de aparición y formación de callos tanto en picloram como en 2,4-D, también se ve un aumento significativo de aparición de callos en la parte basal y media del estaminodio y otras áreas del estaminodio, por

otro lado se observa que el 2,4-D logro formar callos en todo el estaminodio 9,90%, mientras que el picloran no alcanzo ese nivel de formación

Figura. 22

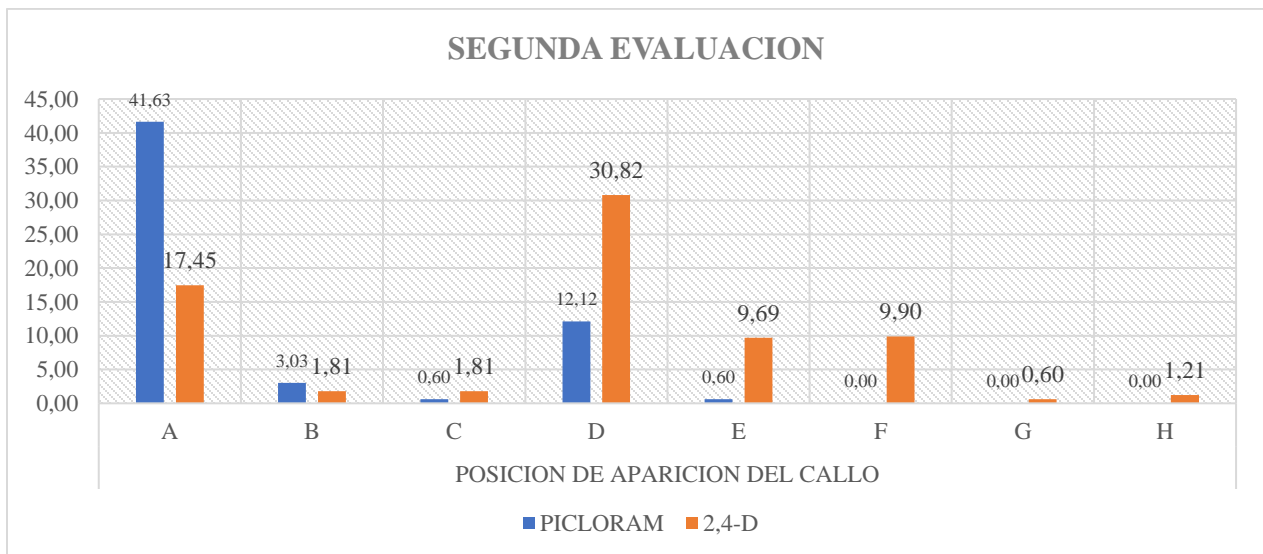
Primera evaluación de posición de aparición de callo.



Nota: A los quince días después de la implementación; *fuentes:* elaboración propia

Figura. 23

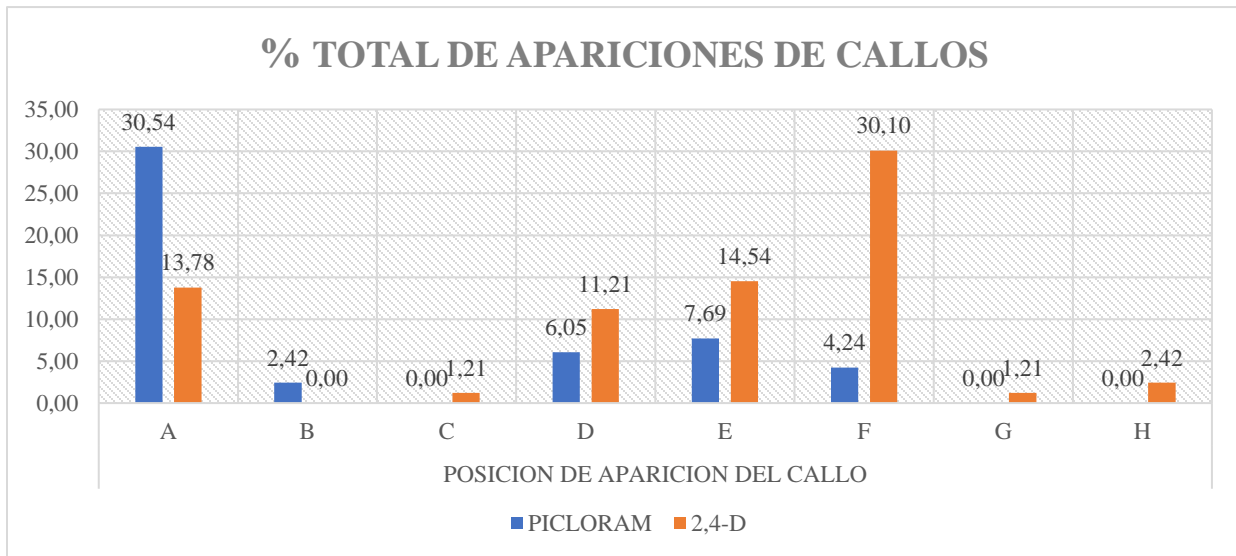
Segunda evaluación de posición de aparición de callo.



Nota: A los 30 días después de la implementación; *fuentes:* Elaboración propia

Figura. 24

Tercera evaluación de posición de aparición de callo.

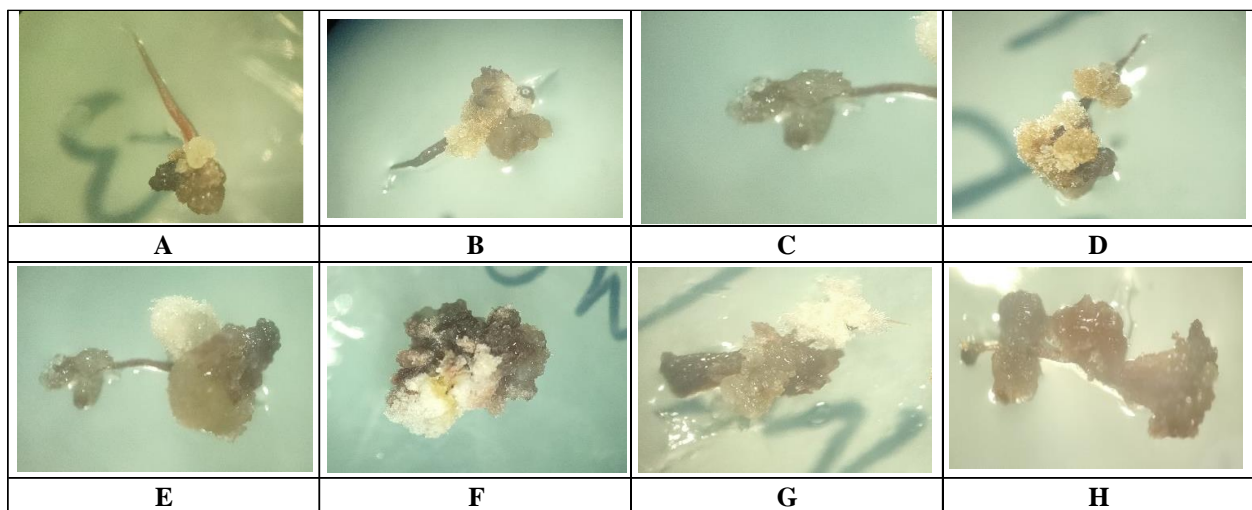


A) en la base del estaminodio **B)** callo en la parte media del estaminodio **C)** callo en la parte distal del estaminodio **D)** callo en la parte basal y media del estaminodio **E)** callo en la parte basal y distal de estaminodio **F)** callo en todo el estaminodio **G)** parte distal y medio **H)** en la parte basal distal y medio del estaminodio

Nota: A los 45 días (última evaluación) después de la implementación; *fuentes:* elaboración propia

Figura. 25

Posición de aparición del callo



Fuente: Elaboración propia.

El porcentaje total de aparición de callos en la etapa de establecimiento se pudo evidenciar que el picloram y el 2,4-D comenzaron a formar callos en su mayoría a partir del **A) área basal del estaminodio**, de área basal y media del estaminodio y en otras áreas del estaminodio en bajo porcentaje (**figura 20, 21**), hasta la última evaluación (**figura 22**) se descubrió que la aparición de callos en el estaminodio fue avanzando así mismo cubriendo totalmente el estaminodio que es lo más importante.

En la gráfica (**figura 22**) se observa que la hormona 2,4-D tuvo mayor porcentaje de explantes totalmente cubiertos de callos **F) en todo el estaminodio (30,10%)** una diferencia significativa a comparación del picloram que tuvo solo un 4,24% en la formación de callos en todo el estaminodio. En el **A) área basal del estaminodio**, se observa disminución de porcentaje de aparición de callos en la hormona **2,4-D** y esto se debe a que los callos van formando y cubriendo más áreas del estaminodio y así el porcentaje aumenta en otras categorías (**A)13% -F) 30,10 – E) 14,54**), estos resultados señalan que usando **2,4-D** se obtiene mayor porcentaje de explantes cubiertos de callos al 100% aplicando la dosis correcta como **T6.5 ml**

Se presenta también el **picloram** una disminución de porcentaje en la parte basal del estaminodio, también debido a que los callos durante la inducción fueron avanzando cubriendo algunas áreas del estaminodio, esto nos indica que los tratamientos con picloran (3 ml, 5 ml y 7 ml) tienen un efecto gradual limitado.

4.3.4. Coloración del callo:

Para la variable reactividad y estado evolutivo del callo se observó.

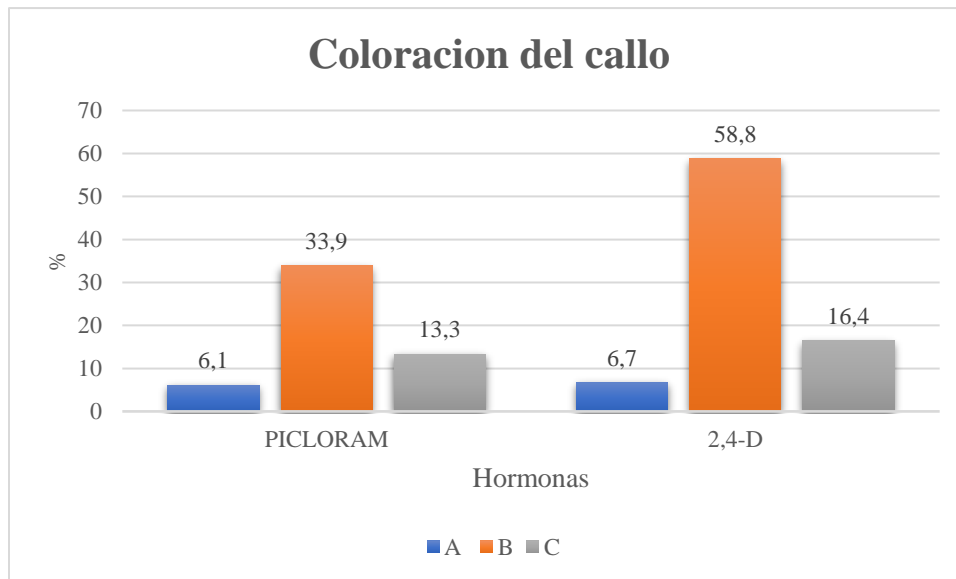
En el tratamiento con **Picloram**, observamos una menor proporción de explantes con **callo cristalino** (6,1%) en comparación con otros colores. Esto sugiere que Picloram puede inducir un desarrollo temprano (callos cristalinos) en menor medida que el 2,4-D. Una proporción mayor de

explantos desarrolla **callos cremosos** (33.90%), lo cual indica una etapa avanzada con posibilidad embriogénica moderada. La formación de **callos oscuros** (13.3%) sugiere que algunos explantes podrían estar experimentando oxidación o estrés, aunque en menor medida que con el **2,4-D**.

Con **2,4-D**, la proporción de explantes con **callo cristalino** (6.7%) es más alta que con Picloram, lo que indica que esta auxina favorece más el estado inicial embriogénico. La formación de **callos cremosos** es significativa (58,8%), mostrando que **2,4-D** tiene un efecto más fuerte en promover la etapa avanzada de diferenciación con potencial embriogénico más desarrollado. La proporción de **callos oscuros** (16.4%) es ligeramente mayor que con Picloram, lo que podría indicar mayor oxidación o acumulación de compuestos fenólicos bajo este tratamiento.

Figura. 26

Coloración del callo en la fase de establecimiento

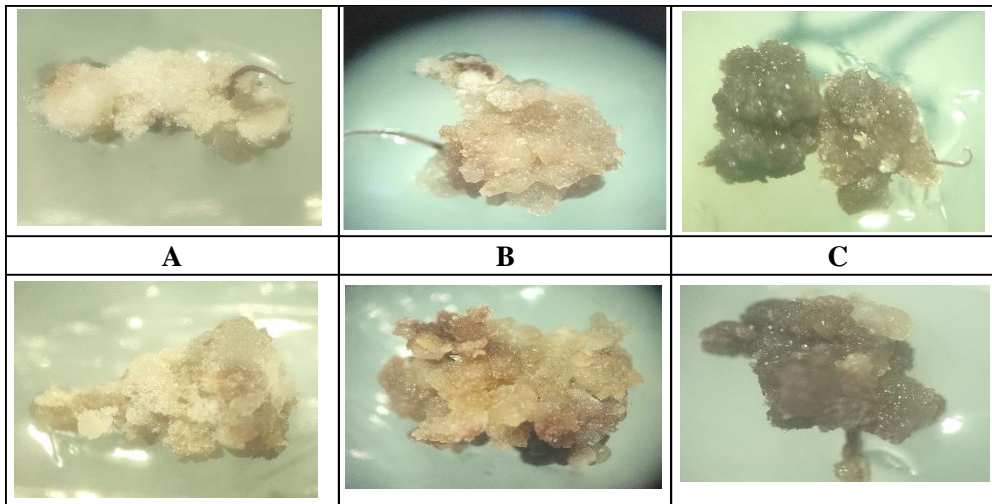


A) explantes con callo cristalino **B)** explantes con callo de coloración cremosa
C) callo de coloración oscura

Fuente: Elaboración propia.

Figura.27

Coloración del callo



- A)** Explantes con callo cristalino **B)** Explantes con callo de coloración cremosa
C) Callo de coloración oscura

Fuente: Elaboración propia.

4.4. Porcentaje de presencia de embriones somáticos.

Para la variable independiente de porcentaje de presencia de embriones somáticos, la presencia de embriones fue nula.

5. Discusión

Según Díaz-López et al., (2009), en la embriogénesis de cacao, el genotipo es un factor que afecta la obtención de embriones, puesto que interactúa con otros como el tamaño del botón floral, la concentración de azúcares en el medio de cultivo (Aguilar 1990; Chantásig 2004; Velásquez et al. 2006; Traore y Guiltinan 2006; Díaz-López et al. 2009), el tipo de explante (Maximova et al. 2002; Velásquez et al. 2006; Traore y Guiltinan, 2006; Minyaka et al. 2008; Solano 2008), la concentración de diferentes componentes del medio de cultivo (Li et al., 1998; Minyaka et al. 2008; Chantásig 2004).

En esta investigación se trabajó con botones florales de cacao (*Theobroma cacao* L.) para la inducción específicamente se utilizó estaminodios y de acuerdo a los resultados obtenidos en la investigación, influye mucho los factores que mencionan los autores en la formación de callos.

Para el experimento se utilizó **DKW** (Driver y Kuniyuki 1984) como medio de cultivo, las hormonas que se evaluaron fueron **PICLORAM** y **2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético)** con tres concentraciones cada hormona (3ml, 5ml y 7ml), fueron 7 tratamientos con 11 repeticiones cada uno, la evaluación fue hasta los 45 días,

Los resultados obtenidos fueron mayor porcentaje de reactividad (inflamación) en el **T6. 5 ml de 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético)** con 85,45% de inflamación de estaminodios, seguidamente **T7. 7 ml de 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético)** con 76,36 % de inflamación y mayor porcentaje de formación de callos en lo que destaca el **T6. 5 ml de 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético)** con 81,82% de formación de callos mientras que el picloram demostró efectos graduales limitados en cuanto a la formación de callos, y en la reactividad mostro efectos mayores al 50% en inflamación de estaminodios.

En investigaciones anteriores, Hidalgo (2014) logró inducir la formación de callos en los estaminodios a los 40 y 60 días, obteniendo porcentajes variables de callos inducidos en diferentes medios de cultivo.

Los resultados encontrados en la investigación, coinciden con Velásquez, Sandra, Betancourt, Mata y García (2006), quienes observaron que los estaminodios son los tejidos que proporcionan los mejores resultados para la inducción de callos embriogénicos en distintos genotipos. Se encontró que una concentración de 80g/l sacarosa y 4mg/l de 2,4-D indujo la mayor cantidad de callos embriogénicos a partir de estaminodios florales de cacao.

ESCOBAR (2011) nos dice que los mejores resultados corresponden al tratamiento en el cual se emplea **10,0 mg.l-1 con valores del 100 %** de callos formados a los 20 y 30 días, seguido por los tratamientos 2 y 3 (**2,0 y 5,0 mg.l-1**) con valores de **57,14 y 60,0 %** respectivamente, sin diferencias entre ellos. Los resultados más bajos de formación de callos se obtuvieron al emplear 20,0 mg.l-1 de 2,4-D, en el cual solo se alcanzó un 44,44 %. Cuando no se utilizó el 2,4-D no se produjo la formación de callo

También dice que el empleo de la auxina 2,4-D en los medios de cultivo preparados para la formación de callos en explantes de (*Theobroma cacao* L.), dio los mejores resultados imprescindibles. El uso de las concentraciones de **2,4-D de 5 mg.l-1** o superiores fue propicio para la formación de callos en todos los explantes evaluados. Se observó en este experimento que a medida que aumento la concentración de 2,4-D se incrementó el tamaño de los callos formados.

Asimismo, Cabrera (2011), obtuvo 100% y 85,7% de formación de callo en medios suplementados con 5mg/L 2,4-D y 10 mg/L 2,4-D respectivamente y reporto que concentraciones mayores a 10 mg/L de 2,4-D disminuyen la formación de callo en explantes de pétalo.

En este estudio se tubo de igual forma resultados significativos, aplicando **5 ml de 2,4-D** hasta el día 45 (3ra evaluación) se ha obtenido **81,82%** de formación de callos y podemos decir que coinciden los resultados con resultados de otros autores, el **T5. 3 ml de 2,4-D** presento un **41,36%** de formación de callos, claramente se puede decir que a menor concentración o dosis de 2,4-D menor será la respuesta

Montes de Godoy² & Acuña (2017), realizaron un trabajo similar y describe que, Según los resultados obtenidos para la variedad de cacao criollo estudiada, es necesario emplear de 1 a 2ml L⁻¹ de 2-4D para generar callos en la primera etapa del proceso, ya que, si no se adiciona, la generación de callos es muy pobre.

Trabajos similares se describen por Li et al., (1998) y Maximova et al. (2002), quienes utilizaron explantes de la inflorescencia de cacao a través de la embriogénesis somática, logrando la producción de embriones de doce genotipos de cacao diferentes. Los mejores resultados se obtuvieron utilizando 2,4-D; sin embargo, si la dosis de 2,4-D es incrementada, aumenta la producción de callos, pero no generan embriones. De acuerdo a El-hag et al. (1988), el 2,4-D no es esencial para la embriogénesis somática de cacao, pero puede incrementarla en algunos clones utilizando bajas concentraciones.

(Marcos Daquinta, Gregori, Cid, Lezcano, & Sagarra, 2007) Logró un 80% de formación de callos en *G. angustifolia* Kunth. con 6 mg.l⁻¹ de picloram en el medio de cultivo MS a partir de segmentos de tejido intercalar.

Molina, Avilés, Bonomo, & Díaz (2015) logró inducir in vitro, en explantes cotiledonares de “tipa colorada”, un porcentaje del 93,78 y 95,22 % de callos embriogénicos de coloración cremosa, los cuales se cultivaron durante 30 días en oscuridad, en medios MS adicionados con Picloram en las concentraciones de 3.31 µM y 4.14µM respectivamente.

Muñoz (2019) menciona que en su investigación “Efecto de fitohormonas en la callogénesis in vitro de café -variedad Obatá”. El testigo y los tratamientos con TDZ, Picloram y Ácido salicílico no presentaron formación de callo. La mayor cantidad de explantes con crecimiento callogénico se presentó en el medio suplementado con 2,4-D 0.25 mg/L + kinetina 0.5 mg/L.

González et al. (2001), en su estudio de inducción de embriogénesis somática en *Coffea canephora* reportó, que los medios suplementados únicamente con Picloram (0.1, 0.5 y 1.0 mg/L) no inducen a la formación y desarrollo de callos.

Landau (2022) en su investigación logro buenos resultados aplicando los tratamientos Picloram 0.5 mg/L + Kinetina 1.9 mg/L, Picloram 0.5 mg/L + BAP 2 mg/L y Picloram 0.5 mg/L, indujeron a la formación y crecimiento de callos en los explantes foliares, tanto en la variedad Lempira, como en la variedad Geisha de café (*Coffea canephora*)

En la presente investigación de evaluación de 2 tipos de auxinas en la formación de callos embriogénico de cacao (*Theobroma cacao* L) el picloram presentó porcentajes moderados, los tratamientos **T2. 3 ml de picloram** 12,36%, **T3. 5 ml de picloram** 26,18% y **T4. 7 ml de picloram** 38,91% de formación de callos, los autores mencionados utilizaron diferentes concentraciones de picloram en sus investigaciones y obtuvieron buenas respuestas en cuanto a la reactividad y formación de callos, lo cual coinciden los resultados de la investigación, con excepción de González et al. (2001) que no obtuvo respuesta.

Varios autores han descrito los callos con aptitud embriogénica, sin embargo, ninguno es coincidente en su descripción con los resultados mostrados en este trabajo o con otras descripciones (Kononowics et al., 1984b; Adu-Ampomah et al., 1988; Elhag et al., 1988; Alemanno, 1995). Estas diferencias posiblemente se deban a que en cada trabajo se utilizaron

metodologías diferentes para la producción de callo y también a que no existe un sistema de descripción uniforme para los diferentes tipos de callo.

Palacios (2022) Observo En la etapa de proliferación la variable de color no obtuvo una diferencia significativa, ya que los colores que predominaban en los callos iban desde traslúcidos a tornarse en colores un poco cremosos hasta amarillos. Lo mismo que concuerda con la investigación realizada por Chantásig Vaca (2004) en donde determina que el color del callo va a variar según la etapa en la que esté, además que la coloración se vuelve a tornar un poco más clara cada vez que una nueva capa de callo recubre el explante.

La observación de los callos formados en esta etapa de cultivo permitió definir diferentes tipos de callo, en nuestro estudio mayormente se observaron callos granulosos de color entre cristalina y cremosa, en algunos casos se presentaban coloraciones oscuras, los tipos de callos fueron observada en los 6 tratamientos (**figura 24**). Similares observaciones se han realizado en estudios de otros autores, Chantásig (2014), observó que callo cristalino y cremoso de texturas compactas o granuloso. Henao et al, (2018) observaron también diferentes tipos de, el primer tipo estaba compuesto por células vítreas blancas, redondas y translúcidas; el segundo tipo consistía en células amarillas cerosas y finalmente un callo blanco filamentoso, en genotipos de cacao peruano, Gárate-navarro y Arévalo-Gardini (2017), observaron también diferentes tipos de callo como cristalinos friables y compactos, otros de coloración cremosa. Un tipo de callo no es exclusivo de un tratamiento o genotipo en específico, pueden observarse los diferentes tipos de callo en el mismo tratamiento, sin embargo, las frecuencias con que se presentan los tipos de callo, basados en su coloración, mostraron una fuerte relación con el genotipo y el tratamiento aplicados. Los genotipos I11, I14 e I32 formaron mayormente callos de coloración cremosa y textura granulosa, mientras que los genotipos I63, I64 e I70 desarrollaron callos primarios de coloración mayormente

cristalina (Figura 7). La diferenciación de callos embriogénicos y no embriogénicos en esta etapa no es posible ya que el desarrollo y diferenciación de callos es muy temprana (Chanatásig, 2004).

En la presente investigación se pudo observar en la formación de callos en la fase de establecimiento diferente posición de aparición de callos en el estaminodio, desde la primera evaluación (15 días) hasta la tercera evaluación (45 días) (Figura 20, 21 y 22), se observó la evolución del callo, se observó que los callos aparecen en su mayoría en la parte basal del estaminodio y con el transcurso del tiempo llegan a cubrir totalmente el explante dependiendo el tipo de tratamiento que se utilice. Rojas, (2020) señala que la observación de la posición de aparición del callo, indica que los callos pueden aparecer en la base del callo (zona de corte), en la zona media, en simultáneo en la base y zona media, en simultáneo en la base y el ápice del estaminodio y en algunos casos cubriendo todo el explante. Por lo general se presentó el inicio de la callogénesis en la base del explante, en la zona de corte, similar observación fue realizada por Aguilar (1990), quien identificó la aparición de callo compacto en la zona de corte del explante. La aparición de callo en las zonas de corte fue observada también en otros cultivos como Café (López-gómez et al., 2010), esto se debe a que el contacto del medio de cultivo con células expuestas es más activo en estas zonas del explante. La presencia de reguladores de crecimiento endógenos puede también favorecer la aparición de callo en sectores específicos (de la Cruz et al., 2017).

Narváez y González (1983). Explica que la fenolización u oxidación de los fenoles que oxidan los explantes después de ser cortados, es un proceso el cual influye, en combinación con la edad del explante, en la Re diferenciación de los tejidos.

En el porcentaje de oxidación de explantes de cacao (*Theobroma cacao* L.) en la fase de establecimiento, se presentó un 5% de oxidación de explantes no formaron callos y un 11% de

explantes levemente oxidados los cuales llegaron formar callos hasta cierto grado y se presentó 84% de explantes sin oxidación. Comparable resultado obtuvo en su investigación Echeverría (2019) La fenolización en los explantes durante los primeros siete días fue diferente para cada explante. Los pétalos de ambas variedades fueron los que más cambios mostraron (Figura 5), empezando el cambio de coloración café oscuro en la base durante los primeros dos días después de siembra, luego se expandió a los bordes del explante. En los estaminodios de ambas variedades no se observó ningún cambio en su tonalidad durante los primeros siete días. También expresa que la fenolización no es un factor que afecte a los explantes a partir de pétalos o estaminodios de cacao en algunas variedades.

Mientras que el clon TSH-565, se comportó mejor en el mismo medio, pero en condiciones de oscuridad. Se observó que este clon presenta altos índices de fenolización; es bien sabido que el proceso de fenolización afecta el establecimiento de los tejidos vegetales “in vitro”, por otro lado González, García Rojas, & Sigarrosa Rieche (2005) observó que los explantes de cacao (*Theobroma cacao* L.) tuvo menor porcentaje de oxidación de explantes, menciona también que los tratamientos en la etapa de establecimientos in vitro en completa oscuridad pueden ayudar a controlar el proceso de oxidación de fenoles, por ello los clones que tienen más contenido fenólico muestran mejores respuestas cuando son sometidos a oscuridad total. En la presente investigación de la misma forma los tratamientos fueron sometidos a completa oscuridad desde el primer día de establecimiento. Citando a Bray et al. (2000), Pompeu et al. (2008) y Azofeifa. (2009) aseguran que, en los cultivos de tejidos in vitro, los procesos de oxidación son causados principalmente por el efecto “abrasivo” del agente desinfectante (NaClO) aplicado durante la asepsia del explante, demostrándose con el oscurecimiento de los tejidos vegetales y consecuentemente con su muerte. Entonces se puede decir que el protocolo utilizado para esta investigación es la correcta

desinfección con NaClO al 1% durante 5 minutos y establecimiento de explantes en completa oscuridad lo cual mostro bajo porcentaje de oxidación y contaminación.

En la presente investigación, en la variable de contaminación de explantes, se observó 2,60% de contaminación específicamente se presentaron hongos mientras que el 97,40% de explantes libres de contaminación (figura 15), el protocolo de desinfección fue la misma que utilizo (Díaz, 2017) con concentración de NaClO al 1% durante 5 min.

Espinosa, Silva, Sariago, L. Cholo Masapanta, & Delgado (2012) logro un 100% de explantes libres de contaminación utilizando NaClO al 1% durante 15 minutos, similar protocolo aplico en la desinfección de explantes de cacao (*Theobroma cacao* L.) Salas et al. (2004), mostraron valores superiores al 80% de desinfección de explantes obtenidos de hojas de morera con el uso de hipoclorito de sodio al 1%, durante 20 minutos, lo que coincide con lo obtenido en esta investigación. Quezada & Calle Alanoca, (2020) en su evaluación de diferentes métodos de desinfección observo mejores resultados con el método 1 el cual consistía desinfectar explantes de estaminodios y pétalos de cacao (*Theobroma cacao* L.) con NaClO al 1% por 5 minutos y presento 63% de explantes vivos libres de contaminación.

6. Conclusión

En relación a la evaluación de la formación de callos embriogénicos a partir de botones florales podemos realizar las siguientes conclusiones:

La formación de callos embriogénicos fue influenciada significativamente por el tipo y concentración de auxina utilizada, confirmando la hipótesis alternativa.

En relación a las concentraciones más apropiadas de Auxinas para la propagación in vitro del cacao, podemos afirmar lo siguiente:

El tratamiento T6, con la aplicación de 5 ml de 2,4-D, presentó el mayor porcentaje de formación de callos (81,82%), demostrando ser significativamente más efectivo en comparación con los demás tratamientos evaluados. Este resultado subraya la importancia de una concentración adecuada de auxinas sintéticas para maximizar la inducción de callos lo cual indica que este tratamiento es ideal para la formación de callos embriogénicos utilizando estaminodios como explantes. Aunque T5 (3 ml de 2,4-D) y T7 (7 ml de 2,4-D) también mostraron resultados elevados (41,46% y 57,27%, respectivamente), su efectividad fue inferior a lo alcanzado con T6.

El testigo sin auxinas (T1) no presentó formación de callos embriogénicos, lo que evidencia que los reguladores de crecimiento son indispensables para activar la embriogénesis somática en explantes de botones florales de cacao silvestre

El 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) es una auxina y también es utilizado como herbicida en el campo en altas dosis, en embriogénesis somática, la aplicación de esta hormona es excelente para estimular y formar callos embriogénicos en la fase de establecimiento utilizando estaminodios como explantes.

El picloram también es una hormona parte de las auxinas, observando los resultados y otras investigaciones de diferentes autores donde evalúan otras especies, obtuvieron diferentes

resultados de 0 a 100% de formación de callos dependiendo de la dosis que aplicaron y también dependiendo de la especie, sin embargo en la evaluación de auxinas el picloram 3 ml, 5 ml y 7 ml presento efectos graduales en los explantes de cacao (*Theobroma cacao* L.) en conclusión podemos decir que la dosis de picloran no son suficientes para la formación de callos embriogénicos a partir de estaminodios de cacao (*Theobroma cacao* L.) pero si existe reacción.

Con respecto al porcentaje de contaminación:

El porcentaje de contaminación de explantes de cacao fue muy bajo con 2,6% de contaminación y 97,4% de explantes sanos, este resultado refleja la importancia de la asepsia y el uso de métodos de desinfección adecuados para el cultivo in vitro.

7. Recomendaciones

En base a los resultados obtenidos en el presente estudio se puede identificar otros factores de estudio tales como; fuentes auxinas y otros reguladores de crecimiento, medios de cultivo y protocolos de introducción, tipos de explantes como pétalos.

Se recomienda aplicar 5 ml de 2,4-D en medio de cultivo DKW (1984) para la formación de callos embriogénicos de cacao (*Theobroma cacao* L.) utilizando estaminodios como explantes.

Evaluar las concentraciones de 2,4-D utilizadas en otros tipos de explantes del cultivo de cacao (*Theobroma cacao* L.)

Evaluar otras concentraciones de 2,4-D en embriogénesis somática de cacao (*Theobroma cacao* L.) utilizando pétalos, anteras y estaminodios.

Mejorar los tratamientos de picloram, los resultados obtenidos con esta auxina fueron debajo del 50% de formación de callos, se recomienda experimentar con dosis de arriba de 7ml/L

Seguir con la investigación hasta llegar a la embriogénesis somática, basándose en guías de micropropagación de cacao (*Theobroma cacao* L.)

Se recomienda evaluar diferentes tipos de concentraciones de NaClO y realizar un protocolo de desinfección para explantes florales de cacao (*Theobroma cacao* L.) tomando en cuenta a NaClO al 1% por 5 min.

Se recomienda obtener el material vegetal a tempranas horas del día y la implementación sea el mismo día Para tener mejores resultados

Continuar con la investigación hasta lograr un protocolo eficiente para la embriogénesis somática de cacao (*Theobroma cacao* L.) para el departamento de Pando

Realizar investigación con otros medios de cultivo en la propagación in vitro de cacao (*Theobroma cacao* L.)

8. Bibliografía

- Aguilar, M.E. 1990.** *Obtención de plantas de cacao (Theobroma cacao L.) a partir de Microinjerto de Embriones Somáticos.* Tesis M.Sc. Costa Rica, Turrialba, CATIE.131 p.
- Aguilar, M. E.; Villalobos, V; Vásquez, N. 1992.** Production of Cocoa Plants (*Theobroma cacao* L.) Via Micrografting of Somatic Embryos. *In Vitro Cell. Dev* 28: 15-19.
- Adu-Ampomah, Y., Novak, F. J., & Afun, J. V. K. (1988).** *Initiation and growth of somatic embryos of cocoa. Café Cacao Thé, 32(3), 187–200*
- Alemanno, L. (1995).** *Embriogénesis somática en cacao (Theobroma cacao L.): Limitaciones, avances y perspectivas.* [Tesis doctoral, Universidad de Montpellier].
- Archibald, J. 1954.** *Culture in vitro of cambial tissue of cacao.* *Nature* 173: 351-352.
- Arnold, S; Sabala, I; Bozhkov, P; Dyachok, J;Filonova, L. 2002.** *Developmental Pathways of Somatic Embryogenesis.* *Plant Cell Tissue and Organ Culture.* 69:233-249.
- Azofeifa, Á. (2009).** *PROBLEMAS DE OXIDACIÓN Y OSCURECIMIENTO DE EXPLANTES CULTIVADOS INVITRO.* Universidad de costa rica, Costa rica. Obtenido de <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=43711514016>
- Batista, L.; 2009.** *Guía Técnica el Cultivo de Cacao en la República Dominicana.* Santo Domingo, República Dominicana. CEDAF, 2009. 250pp.
- Bertrand, B. 1987.** *Algunos Aspectos de la Reproducción por Microestacas del Cacao (Theobroma cacao L.).* *Café Cacao, Thé* 31(3): 175 -182.
- Borrone, J. W., Meerow, A. W., Kuhn, D. N., Whitlock, B. A., & Schnell, R. J. (2007).** *The potential of the WRKY gene family for phylogenetic reconstruction: An example from the Malvaceae.* *Molecular Phylogenetics and Evolution, 44(3), 1141–1154*
- Bolivia dispone 13.500 has de cacao silvestre.* (6 de diciembre de 2020). Obtenido de Pagina siete: <https://www.paginasiete.bo/economia/2020/12/6/bolivia-dispone-de-13500-hectareas-de-cacao-silvestre-277213.html>

- Bray, E.; Bailey, J. y Weretilnyk, E. (2000).** *Responses to abiotic stresses. In: Buchanan, B; Gruissem, W; Jones, R. eds. Biochemistry and molecular biology of plants. American Society of Plant Physiologists. Maryland,US. pp. 1158-1203.*
- Castilla. J. (1981).** *Fitotécnia del cacao.* Editorial Pueblo y Educación. La Habana. Cuba, p: 279.
- Chatelet, P; Dufour, M. 1990.** Culture in Vitro du Cacaoyer (*Theobroma cacao* L.). Progrès Récent en Embryogénèse Somatique et Micropropagation. Cinquanten.
- Chatelet, P; Michaux Ferriere; Dublin, P. 1992.** Potentialités Embryogènes du Nucelle du Tégumen Interne de Graines Inmatures de Cacaoyer (*Theobroma cacao* L.). Comptes-Rendus de l'Academie des Sciences. no. 315: 55-62.
- Chanatásig Vaca, C., Dzib Castillo, B., & González Valdivia, N. A. (2014).** *Estructura y composición en dos comunidades arbóreas de la selva baja caducifolia y mediana subcaducifolia en Campeche, México. Revista Mexicana de Biodiversidad, 85(1), 167–178.*
- Chanatásig, C. I. (2004).** *Inducción de la embriogénesis somática en clones superiores de cacao (Theobroma cacao L.), con resistencia a enfermedades fungosas.* Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza CATIE.
- Cacao que cambia vidas.* (20 de noviembre de 2015). Obtenido de OXFAM international: <https://www.oxfam.org/es/search?keys=cacao>
- chocolate.* (s.f.). Obtenido de https://www.mapa.gob.es/es/ministerio/servicios/informacion/chocolate_tcm30-102348.pdf.
- Contreras, C. V. (2016).** *Manual de Prácticas.* Mexico. Obtenido de <http://ri.uaemex.mx/>
- Cueva, R. E. (2015).** *OBTENCIÓN DE CALLOS EMBRIOGÉNICOS APARTIR DE EXPLANTES FLORALES EN 2 CLONES DE CACAO (Thepbroma cacao).* machala, ecuador.
- de la Cruz, D. I., Ruiz-sanchez, M. E., & Guerrero-abad, J. C. (2017).** *Respuesta de la embriogénesis somática directa en tres regiones foliares de Phalaenopsis amabilis.* Rev. de Investig. Agroproduccion <https://doi.org/10.25127/aps.20173.377>.
- Díaz, M. G. (2017).** *Implementación de un protocolo para la obtención de callos de cacao (Theobroma cacao L.) con interés comercial.* Quito, Ecuador.
- Dos Santos, A; Machado, R. 1989.** *A Scanning Electron Microscope Study of Theobroma cacao L. Somatic Embryogenesis.* Ann Bot no. 64: 293-296.
- Dublin, P. (1984).** *Cacao.* In: Handbook of Plant Cell Culture: 541-563.

Duham, K; Le Mercier N; Boxus, P. 1989. *Donnés Nouvelles sur l'induction et le Development d'embryons Somatique chez Theobroma cacao L.* Café, Cacao, Thé 33(1): 9-14

el cacao en sistemas agroforestales. (s/f). Obtenido de <https://cacaomovil.com/site/pdf/10/guide1>.

El cacao silvestre boliviano es de alta calidad. (21 de abril de 2019). Obtenido de HELVETAS Bolivia: <https://www.helvetas.org/es/bolivia>.

Echeverria, S. H. (2019). *Evaluación de dos medios de cultivo para la formación de callo en pétalos y estaminoides de cacao (Theobroma cacao L.) cultivados in vitro.* Zamorano, Honduras.

Elhag, H; Whipkey, A; Janick, J. 1988. *Factors Affecting Asexual Embryogenesis Via Callus in Theobroma cacao L.* Agril. Biol Sci. 6(1): 31-43.

ENRÍQUEZ, G. 1983. *El cultivo del cacao.* CATIE, Turrialba, Costa Rica. 162 p.

Essan, E. 1977. *Tissue Culture Studies on Cocoa (Theobroma cacao L.) A Suplimentation of Current Research.* Actes de la 5^a Conférence Internationales sur la Recherche Cacaoyere. Nigeria. Ibadan:116- 125.

Escobar, P. D. (2011). *FORMACION DE CALLOS Y ESTABLECIMIENTO DE SUSPENSIONES CELULARES EN EL CULTIVO DE CACAO (THEOBROMA CACAO L.).* Cotopaxi, Ecuador.

Eskes, B. 2001. *Introductory Notes.* In. *Ingenic. Proceedings of the International Workshop on new Technologies and Cocoa Breeding.* Malaysia. Ingenic.190 p.

Espinosa, A., Silva, J., Sariego, S., L. Cholo Masapanta, & Delgado, H. (2012). Efecto del tipo de explante y la concentración de ácido 2,4-diclorofenoxiacético en la formación de callos en *Morus alba L.* Bayamo, Cuba.

Fehér, A; Taras, P; Pasternak, P; Dudits, D. 2003. *Transition of Somatic Plant Cell to an Embryogenic State.* Plant Cell, Tissue and Organ Culture 74: 201-228.

Gárate-Navarro, J., & Arévalo-Gardini, E. (2017). *Optimización de la fertilización orgánica e inorgánica del cacao (Theobroma cacao L.) con la inclusión de Trichoderma endófito y micorrizas arbusculares.* Revista Tecnología en Marcha, 30(1), 67–78.

González M, Santana N, López C. 2001. *Efecto de la Composición del Medio de Cultivo y el Genotipo en la Inducción de la Embriogénesis Somática en Clones de Coffea canephora*

- p. var. robusta*. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA); [consultado el 2 de jun. de 2022]. 22(1):17–21. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=193218206003>.
- González, L. S., García Rojas, C., & Sigarroa Rieche, A. 2005.** *OBTENCIÓN DE EMBRIONES SOMÁTICOS PRIMARIOS DE Theobroma cacao EN CLONES DE INTERÉS REGIONAL PARA EL DEPARTAMENTO NORTE DE SANTANDER, COLOMBIA*. Norte de Santander, Colombia
- González M, Santana N, López C. 2001.** *Efecto de la Composición del Medio de Cultivo y el Genotipo en la Inducción de la Embriogénesis Somática en Clones de Coffea canephora p. var. robusta*. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA); [consultado el 2 de jun. de 2022]. 22(1):17–21. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=193218206003>.
- Guanoluisa, B. E. (2011).** *EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE 2,4-D Y EL TIPO DE EXPLANTE EN LA FORMACIÓN DE CALLOS EMBRIOGÉNICOS EN EL CULTIVO IN VITRO DE CACAO (THEOBROMA CACAO L)*. (tesis de grado). Universidad mayor de san Andres, La Paz, Bolivia.
- Guanoluisa, B. E. (2011).** *EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE 2,4-D Y EL TIPO DE EXPLANTE EN LA FORMACIÓN DE CALLOS EMBRIOGÉNICOS EN EL CULTIVO IN VITRO DE CACAO (THEOBROMA CACAO L)*. (trabajo de diploma). universidad tecnica de Cotopaxi, Latacunga, Ecuador.
- Gutiérrez., L. A. (2015).** *MANUAL DE PRODUCCIÓN DE CACAO FINO DE AROMA A TRAVÉS DE MANEJO ECOLÓGICO*. Cuenca: Universidad de Cuenca.
- Gray, D. 2000.** *Nonzygotic embryogenesis*. In Trigiano, R; Gray, D. eds. *Plant Tissue Culture Concepts and Laboratory Exercises*. USA, CRC Press. P. 175 – 190.
- Hardy, F. 1960.** *Cacao Manual (English Edition)*. IICA. Turrialba, Costa Rica. 395 p.
- Hall, R; Collin, H. 1975.** *Initiation and Growth of Tissue Cultures of Theobroma cacao*. *Annals of Botany* no. 39: 555-570.
- Hess, Oleen. 1990.** *Cocoa Production Technology*. The Pan American Development Foundation Cocoa Rehabilitation & Development Project. 176 p.
- Hidalgo, J. (2014).** *La embriogénesis somática: Técnica para el mejoramiento genético y conservación de material vegetal*. [Informe técnico]. Quito, Ecuador: Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP).

Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (**IICA**). (2018). *Informe anual 2018*. San José, Costa Rica: IICA. Disponible en [repositorio del IICA](#).

INGENIC, 2001. *Proceedings of the International Workshop on new Technologies and Cocoa Breeding*. Ingenic. 190 p.

ITC. 2001. *Cocoa: A guide to trade practices*. International Trade Centre. Product and Market Development. Geneva. 180 p.

Janick, J; Whipkey, A. 1985. *Axillary Proliferation of Shoots from Cotyledonary Nodal Tissue of Cacao*. Revista Theobroma. 15(3): 125-131.

Kohlenbach, H. 1985. *Fundamental and Applied Aspects of In Vitro Plant Regeneration by Somatic Embryogenesis*. In. Nijhoff, M; Junk, W. Eds. *In Vitro Techniques, Propagation and Long Term Storage*.

Kononowicz, H., Kononowicz, K., y Janick, J. (1984). *Asexual embryogenesis via callus of Theobroma cacao L.* Zeitschrift für Pflanzenphysiologie, 113(4), 347-358.

Krikorian, A. 1991. *Propagación clonal in vitro*. In *CIAT. Roca, W; Mroginski; eds. Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones*. Colombia. p 91-125.

Krikorian, A; Berquam, D. 1969. Revista Botánica. 35p.

Landau, A. E. (2022). *Evaluación de Picloram, BAP y Kinetina en la propagación in vitro de dos variedades de café (Coffea arabica L.) a partir de explantes foliares*. Honduras.

Lardet, L; Aguilar, M. E; Michaux-Ferrière, N; Berthouly, M. 1998. *Effect of Strictly Plant Related Factors on the Response of Hevea brasiliensis and Theobroma cacao Nodal Explants Cultured In Vitro*. In Vitro Cell. Dev. Biol 34:34-40.

Legrand, B; Mississo, E. 1986. *Influencia de las Dimensiones de los Explantes y de los Reguladores de Crecimiento con Respecto al desarrollo de los tejidos de Theobroma cacao L. var. Amelonado, en cultivo in vitro*. Café Cacao Thé. 30(4): 239-246.

LEÓN, J. 2000. *Botánica de los Cultivos Tropicales*. Tercera edición. Costa Rica, San José, IICA. 678 p.

- López-Báez, R., Pérez-Jiménez, M., & Gómez-Lara, C. (2001).** *Perfeccionamiento de técnicas de propagación y conservación in vitro, incluyendo la embriogénesis somática.* Informe técnico. Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA). Caracas, Venezuela.
- López-Gómez, P., Iracheta-Donjuan, L., Castellanos Juárez, M., Méndez-López, I., Sandoval Esquivel A., Aguirre-Medina, J., Ojeda Zacarías, M., Gutiérrez-Díez, A. 2010.** *Influencia del Explante y Medio de Cultivo en la Embriogénesis Somática en Hojas de Café.* Revista Fitotecnia Mexicana. 33(3): 205 – 213
- Litz, R; Jarret, R.1991.** *Regeneración de Plantas en el Cultivo de Tejidos: Embriogénesis Somática y Organogénesis.* In CIAT. Roca, W; Mroginski; eds. Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones. Colombia. p 111-120.
- Li, Z; Abdoulaye, T; Maximova, S; Gultinan, M. 1998.** Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration from Floral Explants of Cacao (*Theobroma cacao* L.) Using Thidiazuron. In Vitro Cell. Dev. Biol.- Plant 34: 293-299.
- Marcos Daquinta, Gregori, A., Cid, M., Lezcano, Y., & Sagarra, F. (2007).** *Formación de callos e inducción de brotes a partir de tejido intercalar de ramas de plantas adultas de Guadua angustifolia Kunth* (Vol. 7). Ciego de Ávila, Cuba.
- Maxwell, P; Blake, J. 1984.** Micropropagation of cacao through Axillary bud Culture. Plant Tissue Culture and its Agricultural Applications sep: 17-21.
- Moreno, L; Cadavid, S; Cubillos, G; Sánchez, J. 1983.** Manual para el Cultivo del Cacao. Compañía Nacional de Chocolates. Colombia. 151 p.
- Molina, M. V., Avilés, Z., Bonomo, M., & Díaz, L. (2015).** Efecto del picloram en la inducción de embriogénesis somática en *Pterogyne nitens* Tul. Tipa colorada (Vol. 11). San Miguel de Tucumán, Argentina.
- Montes de Godoy², M. E., & Acuña, H. O. (2017).** *Micro propagación de variedades nativas de cacao (Theobroma cacao) mediante embriogénesis somática* (Vol. 6). El Salvador.
- Muñoz, J. F. (2019).** *Efecto de fitohormonas en la callogénesis in vitro de café -variedad Obatá.* Honduras.
- Macuaga, S. M. (2019).** *CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE ÁRBOLES PROMISORIOS DE CACAO (Theobroma cacao L.) CON GRADOS DE TOLERANCIA A MONILIASIS*

- (*Moniliophthora roreri* Cif & Par. Evans et al.) EN AREA IIA, MUNICIPIO PALOS BLANCOS - LA PAZ. (tesis de grado). universidad mayor de san andres, La Paz, Bolivia.
- Maximova, S; Alemanno, L; Young, A; Ferreiere, N; Traore, A; Gultinan, M. (2002).** *Efficiency, genotypic variability and cellular origin of primary and secondary somatic embryogenesis of Theobroma cacao L. In Vitro Cell. Dev. Biol.—Plant.* Vol. 38; pp. 252–259.
- Métodos de Mejora Genética del cacao (theobroma cacao L.).* (19 de abril de 2011). Obtenido de Fitomejoramiento: <http://fitomejoramientofca2011.blogspot.com>
- Minyaka, E; Niemenak, N; Fotso; Sangare, A; Ndoumou, D. (2008).** Effect of MgSO₄ and K₂SO₄ on somatic embryo differentiation in *Theobroma cacao L.* *Plant. Cell. Tiss. Organ. Cult.* Vol. 94; pp. 149–160.
- Narváez J, González J. 1983.** *Cultivo de tejidos del arroz, Oryza sativa l.: Inducción de callo y regeneración de plantas.* 33 (1), 5–24 p. [consultado el 24 de jun. de 2019]. https://revistas.unal.edu.co/index.php/acta_agronomica/article/view/48340.
- Novak, F; Donini, B; Owusu, G. 1986.** Somatic Embryogenesis and In Vitro Plant Development of Cocoa (*Theobroma cacao L.*). *Proc Int Symp nuclear Techniques and In Vitro Culture for Plant Improvement.* IAEA. Vienna. p 443 449.
- Omokolo, D; Ndzomo, G; Niemenak, N. 1997.** Phenol Content, Acidic Peroxidase and IAA-oxidase During Somatic Embryogenesis in *Theobroma cacao L.* *Biologia Plantarum* 39(3): 337-347.
- Orchard, J; Collin, H; Hardwick, K. 1979.** *Culture of Shoot Apices of Theobroma cacao.* *Physiología Plantarum* 47: 207-210.
- Palacios, M. A. (2022).** *Establecimiento in vitro de Cacao (Theobroma cacao L.) híbrido CCN-51 usando explantes foliares.* Honduras.
- Passey, A; Jones, O. 1983.** *Shoot Proliferation and Rooting in vitro of Theobroma cacao L. Type Amelonado.* *Journal of Horticultural Science.* 58(4): 589-592.
- Pence, V; Hasegawa, M; Janick, J. 1979.** *Asexual Embryogenesis in Theobroma cacao L.* *Journal of American Society for Horticultural Science* 104(2):145-148.
- Pence, V. 1980.** *Initiation and Development of Sexual Embryos Theobroma cacao L. In Vitro Z Pflanzelphysiol.* 98: 1-14.

- Pence, V. 1995.** *Somatic Embryogenesis in Cacao (Theobroma cacao)*. Biotechnology in Agriculture and Forestry. 30:455-467.
- Phillips, W. 2003.** *Nuevas Expectativas en la Lucha contra la Moniliasis del Cacao: origen, dispersión y diversidad genética del hongo Moniliophthora roreri e incorporación de fuentes de resistencia a través de mejoramiento genético*. CATIE, Costa Rica. 3p.
- Pompeu, G.; Vitorello, V. y Azevedo, R. 2008.** *Antioxidant isoenzyme responses to nickel-induced stress in tobacco cell suspension culture*. Scientia Agricola. Piracicaba: BR. 65: pp. 548-552.
- Quezada, M. A., & Calle Alanoca, D. (2020).** *EFEECTO DE DIFERENTES MÉTODOS DE DESINFECCIÓN EN EL ESTABLECIMIENTO IN VITRO DE CACAO (Theobroma cacao L.) EN LA ESTACIÓN EXPERIMENTAL SAPECHO - BOLIVIA*. Sapecho, Bolivia.
- Quintero, A., & Jarma, B. (2000).** *Efecto del ácido naftalenacético en el enraizamiento in vitro de cultivares de ñame (Dioscorea sp.)*. Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales, Universidad de Córdoba.
- Quirós, A. M. (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 del CATIE*. Turrialba, costa rica.
- Rojas, B. K. (2020).** *EFEECTO DE THIDIAZURON (TDZ) SOBRE LA RESPUESTA EMBRIOGÉNICA Y GENÉTICA EN ESTAMINODIOS DE 10 GENOTIPOS DE CACAO (Theobroma cacao L.) NATIVO FINO DE AROMA*. chachapoyas, Peru.
- Solano, W. (2008).** *Embriogénesis somática de clones superiores de cacao (Theobroma cacao L.) obtenidos en el Programa de Mejoramiento Genético del CATIE*. Tesis M.Sc. Turrialba, CR. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza; p. 92
- Sondhal, M; Sereduk, T; Chen, Z; Bellato, C. 1989.** *Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration of Cacao Patent*. Republic of South Africa.
- Sondahl, M; Liu, S; Bellato, C; Bragin, A. 1993.** *Cacao Somatic Embryogenesis*. Acta Horticulturariae 336: 245- 248.
- Soto, J; Herrera, S. 1985.** *Propagación*. In. SARH. *Manual sobre el Cultivo del Cacao*. Tapachula, Chiapas, México. p 38-49

- Surco, J. (2010).** *El cacao nacional boliviano (CNB) y su expansión en rodales silvestres en la cuenca amazónica boliviana.* Lima, Perú.
- Terán, L. M. (2019).** *EVALUACIÓN DE ENRAIZADORES EN ESTACAS DE CACAO (Theobroma cacao L.) CON TRES DIFERENTES CORTES DE HOJA TOLERANTES A LA MONILIA EN LA ESTACION EXPERIMENTAL SAPECHO - ALTO BENI.* (tesis de grado). universidad mayor de san Andres, La Paz, Bolivia.
- Toxopeus, H. 1985.** *Botany, Types and Population, in Cocoa.* London. Longman. p 11 37.
- Traore, A; Gultinan, M. (2006).** *Effects of carbon source and explant type on somatic embryo genesis of four cacao genotypes.* HortScience Vol. 41(3); pp. 753-758
- Urquhart, D.H. (1963).** *El cacao.* Edición Revolucionaria. La Habana. Cuba.230p.
- Vaca, C. I. (2004).** *Inducción de la embriogénesis somática en clones superiores de cacao (Theobroma cacao L.), con resistencia a enfermedades fungosas.* turrialba, Costa Rica.
- Valenzuela B., A. (2007).** *El chocolate, un placer saludable.* Revista Chilena de Nutrición, 34(3), [páginas específicas si se conocen]. Santiago, Chile: Sociedad Chilena de Nutrición, Bromatología y Toxicología.
- Van der Vossen, H. 1999.** *Strategies of Variety Improvement in Cocoa with Emphasis on Durable Disease Resistance.* In Ingenic. Proceedings of the International Workshop on the Contribution of Disease Resistance to Cocoa Variety Improvement. Imprenta CIRAD. p 23-31.
- Velásquez, R., Sandra, Y., Betancourt, C., Mata, J., y García, F. (2006).** *Embriogénesis somática en cultivares de cacao venezolanos.* Obtenido de https://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0002192X2006000100004
- Vera, J. 1987 a.** *Botánica y Clasificación del Cacao.* In Suarez, C. ed. *Manual del Cultivo del Cacao. Programa Nacional del Cacao.* Quevedo, INIAP. p 16-26.
- Wilkinson, M. 2001.** *The Applications and Constrains of New Tecnologies in Plant Breeding.* In Ingenic. *Proceedings of the International Workshop on new Technologies and Cocoa Breeding.* Ingenic. p 12-23.
- WOOD, G. y LASS, R. 1985.** *Cocoa, New York, Longman Group Limited. Cuarta edición.* 620 p.

9. Anexos.

Anexo 1

Tabla de registro de datos de trabajo de campo de las variables contaminación, oxidación e inflamación.

		Registro de datos					
Tratamientos	Repeticiones	% de contaminación		% de oxidación			% de inflamación
		si	no	0 - 1	2, 3 - 4	5 a 6	
TESTIGO T1	R 1	0	100	100	0	0	0
	R 2	hongo 100	0	0	100	0	0
	R 3	0	100	100	0	0	0
	R 4	0	100	40	60	0	0
	R 5	0	100	100	0	0	0
	R 6	0	100	0	100	0	0
	R 7	0	100	100	0	0	0
	R 8	0	100	100	0	0	0
	R 9	0	100	100	0	0	0
	R 10	0	100	100	0	0	0
	R 11	0	100	100	0	0	0
T2. PICLORAM 3 ml	R 1	0	100	100	0	0	0
	R 2	0	100	100	0	0	20
	R 3	0	100	100	0	0	20
	R 4	0	100	0	100	0	40
	R 5	0	100	100	0	0	60
	R 6	0	100	100	0	0	20
	R 7	0	100	0	60	40	20
	R 8	0	100	100	0	0	80
	R 9	0	100	0	0	100	60
	R 10	0	100	100	0	0	40
	R 11	0	100	60	40	0	20
T3. PICLORAM 5 ml	R 1	0	100	100	0	0	60
	R 2	0	100	100	0	0	40
	R 3	0	100	100	0	0	40
	R 4	0	100	100	0	0	0
	R 5	0	100	100	0	0	40
	R 6	0	100	0	60	40	60
	R 7	0	100	100	0	0	80
	R 8	0	100	0	60	40	60
	R 9	0	100	100	0	0	80
	R 10	0	100	100	0	0	60
	R 11	0	100	100	0	0	60
T4. PIC LO RA M7	R 1	0	100	100	0	0	80
	R 2	0	100	40	20	40	60

	R 3	0	100	100	0	0	80
	R 4	0	100	0	0	100	60
	R 5	0	100	100	0	0	80
	R 6	0	100	100	0	0	40
	R 7	0	100	100	0	0	20
	R 8	0	100	80	20	0	40
	R 9	0	100	100	0	0	80
	R 10	0	100	100	0	0	80
	R 11	0	100	100	0	0	20
T5. 2,4-D 3 ml	R 1	0	100	100	0	0	80
	R 2	hongo 100	0	0	60	40	40
	R 3	0	100	60	40	0	0
	R 4	0	100	100	0	0	60
	R 5	0	100	100	0	0	100
	R 6	0	100	100	0	0	40
	R 7	0	100	100	0	0	60
	R 8	0	100	100	0	0	80
	R 9	0	100	100	0	0	20
	R 10	0	100	100	0	0	60
	R 11	0	100	100	0	0	80
T6. 2,4-D 5 ml	R 1	0	100	100	0	0	100
	R 2	0	100	100	0	0	100
	R 3	0	100	100	0	0	100
	R 4	0	100	40	60	0	100
	R 5	0	100	100	0	0	40
	R 6	0	100	100	0	0	100
	R 7	0	100	100	0	0	100
	R 8	0	100	100	0	0	100
	R 9	0	100	100	0	0	20
	R 10	0	100	100	0	0	100
	R 11	0	100	100	0	0	80
T7. 2,4-D 7 ml	R 1	0	100	100	0	0	80
	R 2	0	100	100	0	0	100
	R 3	0	100	100	0	0	40
	R 4	0	100	100	0	0	100
	R 5	0	100	80	20	0	100
	R 6	0	100	100	0	0	100
	R 7	0	100	80	20	0	0
	R 8	0	100	100	0	0	100
	R 9	0	100	100	0	0	80
	R 10	0	100	100	0	0	100
	R 11	0	100	80	20	0	40
Promedio		2,5974026	97,402597	84	11	5	51,948052

Anexo 2.

Resultados del porcentaje de inflamación de estaminodios por tratamiento.

Tratamientos	hormonas	dosis	% de inflamación
T1	Testigo	0 ml	0
T2	Picloram	3 ml	34,5454546
T3	Picloram	5 ml	52,7272727
T4	Picloram	7 ml	58,1818182
T5	2,4-D	3 ml	56,3636364
T6	2,4-D	5 ml	85,4545455
T7	2,4-D	7 ml	76,3636364

Anexo 3.

Tabla de registro de datos de la variable porcentaje de formación de callos

		Registro de datos						
Tratamientos	Repeticiones	% de formación de callos	Escala de formación del callo					
			0%	10%	25%	50%	75%	100%
TESTIGO T1	R 1	0	0	0	0	0	0	0
	R 2	0	0	0	0	0	0	0
	R 3	0	0	0	0	0	0	0
	R 4	0	0	0	0	0	0	0
	R 5	0	0	0	0	0	0	0
	R 6	0	0	0	0	0	0	0
	R 7	0	0	0	0	0	0	0
	R 8	0	0	0	0	0	0	0
	R 9	0	0	0	0	0	0	0
	R 10	0	0	0	0	0	0	0
	R 11	0	0	0	0	0	0	0
promedio		0						
T2. PICLORAM 3 ml	R 1	0	0	0	0	0	0	0
	R 2	10	0	40	0	0	0	0
	R 3	10	0	0	20	0	0	0
	R 4	10	0	0	20	0	0	0
	R 5	25	0	0	20	20	0	0
	R 6	10	0	0	20	0	0	0
	R 7	10	0	40	0	0	0	0
	R 8	29	40	20	0	20	0	0
	R 9	22	20	40	20	0	0	0
	R 10	5	0	20	0	0	0	0
	R 11	5	0	20	0	0	0	0
promedio		12,3636364						

T3. PICLORAM 5 ml	R 1	19	40	60	0	0	0
	R 2	18	80	0	20	0	0
	R 3	7	20	20	0	0	0
	R 4	50	0	40	60	0	0
	R 5	4	40	0	0	0	0
	R 6	0	0	0	0	0	0
	R 7	5	0	20	0	0	0
	R 8	50	0	0	100	0	0
	R 9	5	0	20	0	0	0
	R 10	80	0	0	0	80	20
	R 11	50	0	0	20	0	40
promedio		26,1818182					
T4. PICLORAM 7 ml	R 1	35	0	20	0	40	0
	R 2	25	0	0	20	20	0
	R 3	50	0	0	0	40	20
	R 4	85	0	20	0	0	80
	R 5	47	20	0	60	20	0
	R 6	10	0	40	0	0	0
	R 7	0	0	0	0	0	0
	R 8	50	0	0	20	0	40
	R 9	37	20	20	60	0	0
	R 10	52	20	0	0	40	20
	R 11	37	20	20	0	40	0
promedio		38,9090909					
T5. 2,4-D 3 ml	R 1	80	0	0	20	40	40
	R 2	40	0	0	20	40	0
	R 3	0	0	0	0	0	0
	R 4	50	0	0	40	40	0
	R 5	90	0	0	20	0	80
	R 6	24	40	0	0	0	20
	R 7	0	0	0	0	0	0
	R 8	31	60	0	20	20	0
	R 9	20	0	0	40	0	0
	R 10	40	0	0	0	0	40
	R 11	80	0	0	0	80	20
promedio		41,3636364					
T6. 2,4-D 5 ml	R 1	95	0	0	0	20	80
	R 2	100	0	0	0	0	100
	R 3	65	0	0	20	20	40
	R 4	85	0	20	0	0	80
	R 5	100	0	0	0	0	100
	R 6	85	0	0	0	60	40
	R 7	75	0	0	0	100	0
	R 8	90	0	0	20	0	80

	R 9	5	0	20	0	0	0
	R 10	100	0	0	0	0	100
	R 11	100	0	0	0	0	100
	promedio	81,8181818					
T7. 2,4-D 7 ml	R 1	85	0	20	0	0	80
	R 2	65	0	20	0	80	0
	R 3	10	100	0	0	0	0
	R 4	70	0	0	20	80	0
	R 5	95	0	0	0	20	80
	R 6	40	0	40	60	0	0
	R 7	50	0	0	40	40	0
	R 8	70	0	0	0	40	40
	R 9	50	0	0	40	40	0
	R 10	85	0	20	0	0	80
	R 11	10	100	0	0	0	0
	promedio	57,2727273					

Anexo 4

Estado evolutivo del callo en la etapa de establecimiento.

		Registro de datos I								
Tratamiento	Repeticiones	posicion de aparicion de callo en el estamodio								
		A	B	C	D	E	F	G	H	
TESTIGO T1	R 1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	R 2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	R 3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	R 4	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	R 5	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	R 6	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	R 7	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	R 8	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	R 9	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	R 10	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	R 11	0	0	0	0	0	0	0	0	0
p r o m e d i o										
T2. PICLORAM 3 ml	R 1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	R 2	20	0	0	0	0	0	0	0	0
	R 3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	R 4	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	R 5	40	0	0	0	0	0	0	0	0
	R 6	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	R 7	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	R 8	20	0	0	0	0	0	0	0	0
	R 9	0	0	0	20	0	0	0	0	0
	R 10	0	0	0	20	0	0	0	0	0
	R 11	20	20	0	0	0	0	0	0	0
p r o m e d i o		9,0909091	1,8181	0	3,6363636	0	0	0	0	0
T3. PICLORAM 5 ml	R 1	40	0	0	0	0	0	0	0	0
	R 2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	R 3	20	0	0	0	0	0	0	0	0
	R 4	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	R 5	20	0	0	0	0	0	0	0	0
	R 6	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	R 7	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	R 8	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	R 9	40	0	0	0	0	0	0	0	0
	R 10	20	0	0	20	0	0	0	0	0
	R 11	20	0	0	20	0	0	0	0	0
p r o m e d i o		14,545455	0	0	3,6363	0	0	0	0	0
T4. PICLORAM 7 ml	R 1	20	0	0	0	0	0	0	0	0
	R 2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	R 3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	R 4	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	R 5	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	R 6	40	0	0	20	0	0	0	0	0
	R 7	20	0	0	0	0	0	0	0	0
	R 8	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	R 9	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	R 10	40	0	0	20	0	0	0	0	0
	R 11	20	0	0	0	0	0	0	0	0
p r o m e d i o		12,727273	0	0	3,6363636	0	0	0	0	0

T5. 2,4-D 3 ml	R 1	20	0	0	0	0	0	0	0
	R 2	0	0	0	0	0	0	0	0
	R 3	20	0	0	0	0	0	0	0
	R 4	20	0	0	0	0	0	0	0
	R 5	0	0	0	20	0	0	0	0
	R 6	20	0	0	0	0	0	0	0
	R 7	0	0	0	0	0	0	0	0
	R 8	20	0	0	0	0	0	0	0
	R 9	0	0	0	0	0	0	0	0
	R 10	0	0	0	20	0	0	0	0
	R 11	20	0	0	20	0	0	0	0
p r o m e d i o	10,909091	0	0	5,4545455	0	0	0	0	
T6. 2,4-D 5 ml	R 1	0	0	0	0	0	0	0	0
	R 2	20	0	0	0	0	0	0	0
	R 3	0	0	0	0	0	0	0	0
	R 4	0	0	0	0	0	0	0	0
	R 5	20	0	0	0	0	0	0	0
	R 6	0	0	0	20	0	0	0	0
	R 7	20	0	0	0	0	0	0	0
	R 8	20	0	0	0	0	0	0	0
	R 9	20	0	0	0	0	0	0	0
	R 10	0	0	0	20	0	0	0	0
	R 11	20	0	0	20	0	0	0	0
p r o m e d i o	10,909091	0	0	5,4545455	0	0	0	0	
T7. 2,4-D 7 ml	R 1	20	0	0	20	0	0	0	0
	R 2	0	0	0	0	0	0	0	0
	R 3	20	0	0	20	0	0	0	0
	R 4	20	0	0	20	0	0	0	0
	R 5	20	0	0	0	0	0	0	0
	R 6	0	0	0	0	0	0	0	0
	R 7	0	0	0	0	0	0	0	0
	R 8	20	0	0	0	0	0	0	0
	R 9	0	0	0	0	0	0	0	0
	R 10	0	0	0	0	0	0	0	0
	R 11	20	0	0	0	0	0	0	0
p r o m e d i o	10,909091	0	0	5,4545455	0	0	0	0	

Registro 2

Registro de datos 2									
Tratamiento	Repeticiones	posicion de aparicion de callo en el estamodio							
		A	B	C	D	E	F	G	H
TESTIGO T1	R 1	0	0	0	0	0	0	0	0
	R 2	0	0	0	0	0	0	0	0
	R 3	0	0	0	0	0	0	0	0
	R 4	0	0	0	0	0	0	0	0
	R 5	0	0	0	0	0	0	0	0
	R 6	0	0	0	0	0	0	0	0
	R 7	0	0	0	0	0	0	0	0
	R 8	0	0	0	0	0	0	0	0
	R 9	0	0	0	0	0	0	0	0
	R 10	0	0	0	0	0	0	0	0
	R 11	0	0	0	0	0	0	0	0
p r o m e d i o									
T2. PICLORAM 3 ml	R 1	40	0	0	0	0	0	0	0
	R 2	40	0	0	20	0	0	0	0
	R 3	0	0	0	0	0	0	0	0
	R 4	40	0	0	0	0	0	0	0
	R 5	60	0	0	0	0	0	0	0
	R 6	20	0	0	0	0	0	0	0
	R 7	60	0	0	0	0	0	0	0
	R 8	60	0	0	0	0	0	0	0
	R 9	0	0	0	20	0	0	0	0
	R 10	0	0	0	20	0	0	0	0
	R 11	60	0	0	0	20	0	0	0
p r o m e d i o									
		32,727273	0	0	5,4545455	1,8181818	0	0	0
T3. PICLORAM 5 ml	R 1	80	0	0	0	0	0	0	0
	R 2	80	0	0	20	0	0	0	0
	R 3	40	0	0	0	0	0	0	0
	R 4	0	0	0	0	0	0	0	0
	R 5	60	0	0	0	0	0	0	0
	R 6	80	0	0	20	0	0	0	0
	R 7	60	0	0	20	0	0	0	0
	R 8	100	0	0	0	0	0	0	0
	R 9	40	0	0	0	0	0	0	0
	R 10	20	0	20	60	0	0	0	0
	R 11	80	0	0	0	0	0	0	0
p r o m e d i o									
		58,181818	0	1,8181818	10,909091	0	0	0	0
T4. PICLORAM 7 ml	R 1	60	40	0	0	0	0	0	0
	R 2	80	0	0	20	0	0	0	0
	R 3	0	0	0	0	0	0	0	0
	R 4	20	0	0	80	0	0	0	0
	R 5	40	0	0	60	0	0	0	0
	R 6	40	20	0	20	0	0	0	0
	R 7	20	0	0	0	0	0	0	0
	R 8	0	0	0	0	0	0	0	0
	R 9	0	0	0	0	0	0	0	0
	R 10	40	20	0	40	0	0	0	0
	R 11	60	20	0	0	0	0	0	0
p r o m e d i o									
		32,727273	9,0909091	0	20	0	0	0	0

T5. 2,4-D 3 ml	R 1	0	0	0	40	0	60	0	0
	R 2	40	0	0	60	0	0	0	0
	R 3	20	0	0	20	0	0	0	0
	R 4	0	0	0	0	0	0	0	0
	R 5	40	0	0	20	20	20	0	0
	R 6	20	0	0	0	0	0	0	0
	R 7	20	0	20	20	40	0	0	0
	R 8	20	0	0	20	40	0	0	0
	R 9	0	20	0	60	0	0	0	0
	R 10	0	0	0	0	0	0	0	0
	R 11	20	0	0	60	0	20	0	0
p r o m e d i o		16,363636	1,8181818	3,6363636	27,272727	9,0909091	9,0909091	0	0
T6. 2,4-D 5 ml	R 1	0	0	0	80	0	0	20	0
	R 2	0	0	0	0	0	0	0	0
	R 3	20	40	0	20	0	20	0	0
	R 4	20	0	0	80	0	0	0	0
	R 5	20	0	0	0	0	20	0	0
	R 6	0	0	0	40	40	0	0	20
	R 7	20	0	0	0	60	0	0	20
	R 8	40	0	0	60	0	0	0	0
	R 9	20	0	0	80	0	0	0	0
	R 10	20	0	0	20	40	20	0	0
	R 11	20	0	0	0	0	0	0	0
p r o m e d i o		16,363636	3,6363636	0	34,545455	12,727273	5,4545455	1,8181818	3,6363636
T7. 2,4-D 7 ml	R 1	40	0	0	40	0	0	0	0
	R 2	20	0	0	40	0	20	0	0
	R 3	0	0	0	0	0	0	0	0
	R 4	20	0	0	20	20	40	0	0
	R 5	20	0	0	20	0	60	0	0
	R 6	40	0	0	40	20	0	0	0
	R 7	20	0	0	60	0	20	0	0
	R 8	40	0	0	60	0	0	0	0
	R 9	20	0	0	60	0	0	0	0
	R 10	0	0	0	0	0	0	0	0
	R 11	0	0	20	0	40	0	0	0
p r o m e d i o		20	0	1,8181818	30,909091	7,2727273	12,727273	0	0

Registro 3

Registro de datos 3									
Tratamiento	Repeticiones	posicion de aparicion de callo en el estamodio							
		A	B	C	D	E	F	G	H
TESTIGO T1	R 1	0	0	0	0	0	0	0	0
	R 2	0	0	0	0	0	0	0	0
	R 3	0	0	0	0	0	0	0	0
	R 4	0	0	0	0	0	0	0	0
	R 5	0	0	0	0	0	0	0	0
	R 6	0	0	0	0	0	0	0	0
	R 7	0	0	0	0	0	0	0	0
	R 8	0	0	0	0	0	0	0	0
	R 9	0	0	0	0	0	0	0	0
	R 10	0	0	0	0	0	0	0	0
	R 11	0	0	0	0	0	0	0	0
p r o m e d i o		0	0	0	0	0	0	0	0
T2. PICLORAM 3 ml	R 1	0	0	0	0	0	0	0	0
	R 2	40	0	0	0	0	0	0	0
	R 3	20	0	0	0	0	0	0	0
	R 4	20	0	0	0	0	0	0	0
	R 5	40	0	0	0	0	0	0	0
	R 6	20	0	0	0	0	0	0	0
	R 7	40	0	0	0	0	0	0	0
	R 8	40	0	0	0	40	0	0	0
	R 9	40	20	0	20	0	0	0	0
	R 10	0	0	0	20	0	0	0	0
	R 11	20	0	0	0	0	0	0	0
p r o m e d i o		25,454545	1,8181818	0	3,6363636	3,6363636	0	0	0
T3. PICLORAM 5 ml	R 1	60	0	0	40	0	0	0	0
	R 2	60	0	0	0	20	20	0	0
	R 3	40	0	0	0	0	0	0	0
	R 4	0	0	0	40	40	20	0	0
	R 5	40	0	0	0	0	0	0	0
	R 6	0	0	0	0	0	0	0	0
	R 7	20	0	0	0	0	0	0	0
	R 8	60	0	0	20	20	0	0	0
	R 9	20	0	0	0	0	0	0	0
	R 10	60	0	0	20	20	0	0	0
	R 11	0	0	0	0	20	40	0	0
p r o m e d i o		32,727273	0	0	10,909091	10,909091	7,2727273	0	0
T4. PICLORAM 7 ml	R 1	60	0	0	0	0	0	0	0
	R 2	0	0	0	20	20	0	0	0
	R 3	40	20	0	0	0	0	0	0
	R 4	60	0	0	20	20	0	0	0
	R 5	60	0	0	0	0	20	0	0
	R 6	20	0	0	0	0	0	0	0
	R 7	0	0	0	0	0	0	0	0
	R 8	20	20	0	0	20	0	0	0
	R 9	60	0	0	0	0	20	0	0
	R 10	20	0	0	0	0	0	0	0
	R 11	40	20	0	0	0	20	0	0
p r o m e d i o		34,545455	5,4545455	0	3,6363636	5,4545455	5,4545455	0	0

T5. 2,4-D 3 ml	R 1	20	0	0	20	20	40	0	0
	R 2	40	0	0	20	0	0	0	0
	R 3	0	0	0	0	0	0	0	0
	R 4	40	0	20	0	20	0	0	0
	R 5	20	0	0	0	0	80	0	0
	R 6	40	0	0	0	0	20	0	0
	R 7	0	0	0	0	0	0	0	0
	R 8	40	0	0	20	20	0	0	0
	R 9	0	0	0	0	0	0	20	20
	R 10	0	0	0	0	0	40	0	0
	R 11	40	0	0	0	40	20	0	0
p r o m e d i o		21,818182	0	1,8181818	5,4545455	9,0909091	18,181818	1,8181818	1,8181818
T6. 2,4-D 5 ml	R 1	0	0	0	20	0	80	0	0
	R 2	0	0	0	0	0	100	0	0
	R 3	20	0	0	20	0	40	0	0
	R 4	20	0	0	0	0	80	0	0
	R 5	0	0	0	0	0	100	0	0
	R 6	20	0	0	20	20	40	0	0
	R 7	0	0	0	40	60	0	0	0
	R 8	20	0	0	0	0	80	0	0
	R 9	0	0	0	0	20	0	0	0
	R 10	0	0	0	0	0	100	0	0
	R 11	0	0	0	0	0	100	0	0
p r o m e d i o		7,2727273	0	0	9,0909091	9,0909091	65,454545	0	0
T7. 2,4-D 7 ml	R 1	20	0	0	0	0	80	0	0
	R 2	20	0	0	40	40	0	0	0
	R 3	60	0	0	0	40	0	0	0
	R 4	20	0	0	40	40	0	0	0
	R 5	0	0	0	0	20	80	0	0
	R 6	40	0	0	60	0	0	0	0
	R 7	0	0	0	40	40	0	0	0
	R 8	0	0	20	0	20	40	0	0
	R 9	0	0	0	20	40	0	0	20
	R 10	0	0	0	0	0	80	0	20
	R 11	0	0	0	20	40	0	20	20
p r o m e d i o		14,545455	0	1,8181818	20	25,454545	25,454545	1,8181818	5,4545455

Anexo 5.

Resultados por tratamientos de la variable coloración del callo en etapa de establecimiento.

Coloración del callo			
Tratamientos	A	B	C
T1 Testigo	0	0	0
T2. Picloram 3 ml	3,6	21,8	9,1
T3. Picloram 5 ml	5,5	41,8	14,5
T4. Picloram 7 ml	9,1	38,2	16,4
T5. 2,4-d 3 ml	5,5	41,8	14,5
T6. 2,4-d 5 ml	5,5	67,3	16,4
T7. 2,4-d 7 ml	9,1	67,3	18,2

Resultados por hormonas

Coloración del callo			
Hormonas	A	B	C
Picloram	6,1	33,9	13,3
2,4-d	6,7	58,8	16,4