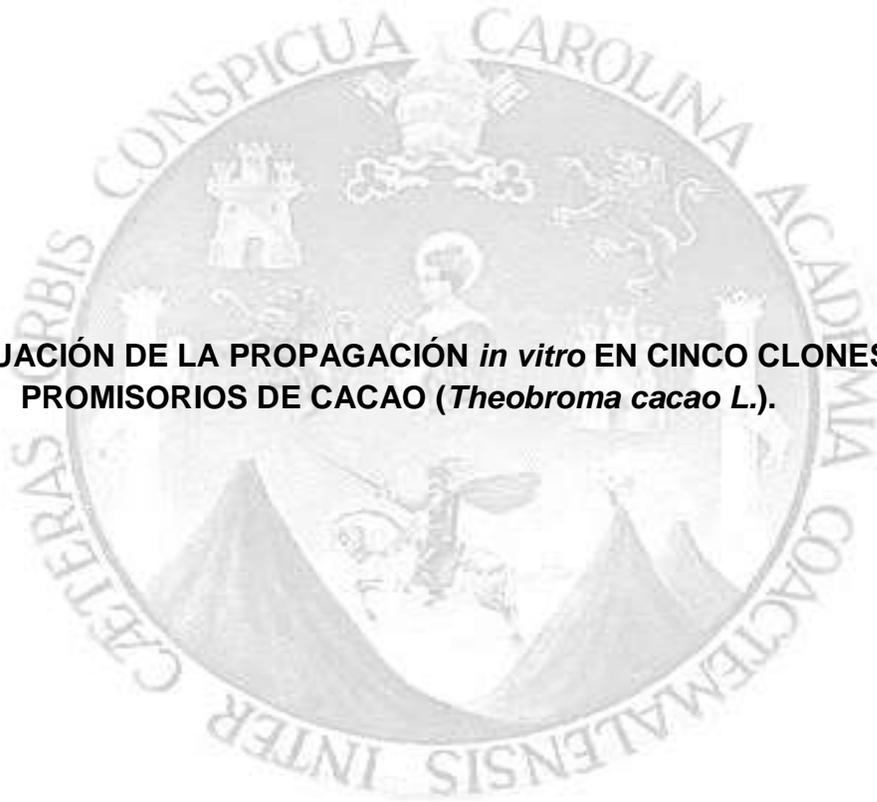


UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE AGRONOMÍA  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES AGRONÓMICAS

**EVALUACIÓN DE LA PROPAGACIÓN *in vitro* EN CINCO CLONES  
PROMISORIOS DE CACAO (*Theobroma cacao* L.).**



SERGIO ROLANDO GÓMEZ MEDRANO

GUATEMALA, MAYO 2010

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA**  
**FACULTAD DE AGRONOMÍA**  
**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES AGRONÓMICAS**

**EVALUACIÓN DE LA PROPAGACIÓN *in vitro* EN CINCO CLONES  
PROMISORIOS DE CACAO (*Theobroma cacao* L.).**

**TESIS**

**PRESENTADA A LA HONORABLE JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD DE  
AGRONOMÍA DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA**

**POR**

**SERGIO ROLANDO GÓMEZ MEDRANO**

**En el acto de investidura como**

**INGENIERO AGRÓNOMO**

**EN**

**SISTEMAS DE PRODUCCIÓN AGRÍCOLA  
EN EL GRADO ACADÉMICO DE LICENCIADO**

**Guatemala, mayo de 2010.**

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

RECTOR

Lic. Carlos Estuardo Gálvez Barrios

JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD DE AGRONOMÍA

|            |  |
|------------|--|
| DECANO     | MSc. Francisco Javier Vásquez Vásquez          |
| VOCAL I    | Ing. Agr. Waldemar Nufio Reyes                 |
| VOCAL II   | Ing. Agr. Walter Arnoldo Reyes Sanabria        |
| VOCAL III  | MSc. Oscar René Leiva Ruano                    |
| VOCAL IV   | P. Forestal Axel Esaú Cuma                     |
| VOCAL V    | P. Contador Carlos Alberto Monterroso Gonzáles |
| SECRETARIO | MSc. Edwin Enrique Cano Morales                |

Guatemala mayo del 2010

Honorable Junta Directiva  
Honorable Tribunal Examinador  
Facultad de Agronomía  
Universidad de San Carlos de Guatemala  
Presente.

Distinguidos miembros:

De conformidad con las normas establecidas en la ley orgánica de la Universidad de San Carlos de Guatemala, tengo el honor de someter a su consideración el trabajo de tesis titulado.

EVALUACIÓN DE LA PROPAGACIÓN *in vitro* EN CINCO CLONES  
PROMISORIOS DE CACAO (*Theobroma cacao L.*).

Presentando como requisito previo a optar el título de Ingeniero Agrónomo en Sistemas de Producción Agrícola, en el grado Académico de Licenciado.

En espera de su aprobación, me es grato presentarles mi agradecimiento.

Atentamente.

SERGIO ROLANDO GÓMEZ MEDRANO

## ACTO QUE DEDICO

- A DIOS: Por darme la vida, ser mi guía y la oportunidad de alcanzar esta meta, así también a nuestra madre la virgen María por iluminarme y acompañarme en el trascurso de mi vida
- A MIS ABUELITOS: Esteban Gómez (†), Agustina Álvarez (†), Miguel Medrano (†) que Dios los tenga en su gloria, y a Francisca López, por su cariño.
- A MI PADRE: Esteban Gómez Álvarez (†), porque su recuerdo ha sido ejemplo de lucha y trabajo.
- A MI MADRE: Isabel Medrano López por haberme traído al mundo, por su amor, cariño, comprensión, apoyo y su gran esfuerzo para poder alcanzar este triunfo juntos, te amo mamita.
- A MI HIJO: Sergio Andrés Gómez Girón, por su amor y ser la persona quien me incentivo para cumplir con este sueño.
- A MIS HERMANOS: Silvia, Francis, Cristy, Alfredo (que desde el cielo está celebrando este triunfo conmigo), Michael y Jakeline, por su amor, cariño y apoyo en los momentos de tristeza y alegría.
- A MIS CUÑADOS Esteban Laynez, Francisco Arenas y en especial a Javier Villatoro López por su amistad, cariño y apoyo en momentos dificultosos de mi vida.
- A MIS SOBRINOS: Esteban (chinito), Jennifer Isabel y Javier Alfredo, por sus muestras de cariño y amor.
- A MI FAMILIA: Gómez Álvarez y Medrano López, tíos (as) políticos (as), a mis primos en especial a Rigoberto Gómez Pérez y Luis López, por las vivencias compartidas.
- A MIS AMIGOS: Por los momentos que compartimos en las aulas de nuestra Facultad.

TESIS QUE DEDICO.

A:

SANTA CRUZ DEL QUICHE

COLEGIO PARROQUIAL SANTA CRUZ

COLEGIO NUESTRA SEÑORA DEL ROSARIO

INSTITUTO TECNICO EMILIANI PADRES SOMASCOS

COLEGIO SAN JOSE DE LOS INFANTES

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

FACULTAD DE AGRONOMIA

LABORATORIO DE CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES

## AGRADECIMIENTOS

Mis más sinceros Agradecimientos:

MSc. Domingo Amador Pérez, por sus enseñanzas y experiencias compartidas en el campo de la biotecnología y por darme la oportunidad de realizar el presente trabajo. Que Dios lo tenga en su Gloria.

Doctor David Monterroso Salvatierra, por su apoyo en la supervisión de mi ejercicio profesional supervisado y asesoría en la presente investigación.

Ing. Mario Enríquez, por su amistad, apoyo y asesoría en la realización de este trabajo de investigación.

Ing. Mario Cabrera Madrid, por su amistad y apoyo en el ejercicio profesional supervisado.

Ing. Julio Pérez, por su valiosa colaboración en la colecta del material vegetal en el Centro de Agricultura Tropical Bulbuxyá.

A mis compañeros y amigos del Centro Experimental Docente de Agronomía Ing. Domingo Amador (CEDA), por su amistad, cariño y apoyo durante mi EPS. En especial al señor Oswaldo Orellana por su confianza brindada.

A la Familia Girón Toledo por su amor y cariño para con Sergio Andrés, en especial al señor Francisco Girón.

A mis padrinos Licda. Cristina Elizabeth Gómez Medrano, Licda. Francis Rossmery Gómez Medrano, y Lic. Javier Villatoro López, por estar apadrinando este acto.



| <b>Contenido</b>  | <b>página</b> |
|---|---------------|
| <b>Índice de Cuadros</b> .....                          | v             |
| <b>Índice de Figuras</b> .....                          | vi            |
| 1 INTRODUCCIÓN .....                                    | 1             |
| 2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....                      | 3             |
| 3 MARCO TEÓRICO .....                                   | 4             |
| 3.1.1 Origen y taxonomía .....                          | 4             |
| 3.1.2 Botánica .....                                    | 4             |
| 3.2 Condiciones climáticas y edáficas del cultivo ..... | 5             |
| 3.2.1 Condiciones climáticas .....                      | 5             |
| 3.2.2 Condiciones edáficas .....                        | 7             |
| 3.3 Enfermedades .....                                  | 8             |
| 3.4 Diversidad genética .....                           | 9             |
| 3.4.1 Criollo: .....                                    | 9             |
| 3.4.2 Forastero: .....                                  | 10            |
| 3.4.3 Trinitarios .....                                 | 11            |
| 3.5 Mejoramiento genético del cacao .....               | 11            |
| 3.6 Métodos de propagación de cacao .....               | 12            |
| 3.6.1 Propagación sexual .....                          | 12            |
| 3.6.2 Propagación asexual .....                         | 13            |
| 3.6.2.1 Enraizado de estacas y acodos .....             | 13            |
| 3.6.2.2 Propagación por injerto .....                   | 14            |
| 3.6.2.3 Propagación <i>in vitro</i> .....               | 14            |

|          |  |    |
|----------|--|----|
| 3.6.2.4  | Embriogénesis somática.....  | 15 |
| 3.6.2.5  | Micropropagación.....  | 16 |
| 3.7      | Aspectos generales de la regeneración <i>in vitro</i> .....              | 16 |
| 3.7.1    | Factores que influyen en el cultivo <i>in vitro</i> .....                | 16 |
| 3.7.1.1  | Composición química del medio.....                                       | 17 |
| 3.7.1.2  | Sales minerales.....   | 17 |
| 3.7.1.3  | Vitaminas.....   | 17 |
| 3.7.1.4  | Carbohidratos.....   | 17 |
| 3.7.1.5  | Reguladores del crecimiento.....   | 18 |
| 3.7.1.6  | Auxinas (Acido 3 - indolacético).....                                    | 18 |
| 3.7.1.7  | Transporte de las auxinas.....   | 19 |
| 3.7.1.8  | Efecto de las auxinas sobre las raíces y la formación de las raíces..... | 20 |
| 3.7.1.9  | Mecanismos de acción de las auxinas.....                                 | 21 |
| 3.7.1.10 | Citocininas (5 bencil aminopurina).....                                  | 21 |
| 3.7.1.11 | Metabolismo de las citocininas.....                                      | 22 |
| 3.7.1.12 | Sitios de síntesis y transporte de citocininas.....                      | 23 |
| 3.7.1.13 | División celular y formación de órganos promovidos por citocininas.....  | 23 |
| 3.7.1.14 | Efecto de las citocininas en la inducción de tallos y raíces.....        | 24 |
| 3.7.1.15 | Mecanismos de acción de las citocininas.....                             | 25 |
| 3.8      | Compuestos orgánicos naturales.....                                      | 25 |
| 3.8.1    | Agentes gelificantes.....  | 26 |
| 3.8.2    | Preparación del medio de cultivo.....                                    | 26 |
| 3.8.3    | Medios semisólidos sin sustancias termolábiles.....                      | 26 |

|        |  |    |
|--------|--|----|
| 3.8.4  | Medios líquidos con o sin sustancias termolábiles .....          | 27 |
| 3.8.5  | Medios semisólidos con una o más sustancias termolábiles .....   | 27 |
| 3.9    | Antecedentes en la micropropagación del cacao.....               | 28 |
| 3.10   | Potencialidades del cacao en Guatemala .....                     | 29 |
| 3.10.1 | Demanda mundial del cacao .....                                  | 30 |
| 3.11   | Marco Referencial.....   | 31 |
| 3.11.1 | Localización del experimento. ....                               | 31 |
| 3.11.2 | Localización de la obtención del material vegetal original ..... | 31 |
| 3.11.3 | Descripción de los clones.....                                   | 31 |
| 4      | OBJETIVOS.....   | 37 |
| 4.1    | General: .....   | 37 |
| 4.2    | Específico:.....   | 37 |
| 5      | HIPOTESIS.....   | 38 |
| 6      | MATERIALES Y MÉTODOS.....  | 39 |
| 6.1    | Métodos .....  | 39 |
| 6.1.1  | Tejido utilizado.....  | 39 |
| 6.2    | Preparación del material experimental en el campo.....           | 39 |
| 6.2.1  | Preparación de la planta donante de varetas .....                | 39 |
| 6.2.2  | Colecta del material .....                                       | 39 |
| 6.2.3  | Traslado del material .....                                      | 40 |
| 6.3    | Fase de laboratorio .....  | 40 |
| 6.3.1  | Preparación de medio de cultivos para brotes.....                | 40 |
| 6.3.2  | Preparación de medio para enraizamiento .....                    | 41 |
| 6.4    | Fase: Inducción de brotes .....                                  | 41 |

|         |   |    |
|---------|---|----|
| 6.5     | Fase: Enraizamiento de brotes obtenidos.....    | 42 |
| 6.5.1   | Medio de enraizamiento del explante.....        | 42 |
| 6.6     | Diseño experimental.....                        | 43 |
| 6.6.1   | Modelo Factorial.....                           | 43 |
| 6.6.2   | Unidad Experimental.....                        | 44 |
| 6.6.2.1 | Variables de inducción de brotes.....           | 44 |
| 6.6.2.2 | Variables de enraizamiento de brotes.....       | 45 |
| 6.7     | Manejo del experimento.....                     | 45 |
| 6.7.1   | Condiciones ambientales para la incubación..... | 45 |
| 6.8     | Materiales.....                                 | 47 |
| 6.8.1   | Material de vidrio y de plástico.....           | 47 |
| 6.8.2   | Equipos.....                                    | 47 |
| 6.8.3   | Otros Materiales.....                           | 47 |
| 7       | RESULTADOS Y DISCUSION.....                     | 48 |
| 7.1     | Explantes de yemas axilares de cacao.....       | 48 |
| 7.2     | Explantes de hoja de cacao.....                 | 55 |
| 7.3     | Explantes de meristemas apicales de cacao.....  | 56 |
| 7.4     | Fase de enraizamiento.....                      | 58 |
| 8       | CONCLUSIONES.....                               | 59 |
| 9       | RECOMENDACIONES.....                            | 60 |
| 10      | BIBLIOGRAFÍA.....                               | 61 |
| 11      | ANEXOS.....                                     | 66 |

## Índice de Cuadros

|  |    |
|--|----|
| Cuadro 1. Concentración y combinación de los reguladores de crecimiento ANA+BAP en medio de cultivo (MS).....  | 41 |
| Cuadro 2. Concentración de auxina y concentración de sales MS. ....  | 42 |
| Cuadro 3. Resultados del comportamiento de los clones de cacao en relación a la contaminación y oxidación (porcentaje) <i>in vitro</i> en el primer ensayo de explantes de yemas de cacao ( <i>Theobroma cacao</i> L)..... | 48 |
| Cuadro 4. Resultados de la segunda siembra para control de microorganismos que afectaron los explantes de cacao. ....  | 50 |
| Cuadro 5. Resultados de la última siembra en el ensayo de cacao para el control de microorganismos .....   | 53 |

## Índice de Figuras

|   |    |
|---|----|
| Figura 1. Cacao criollo .....   | 10 |
| Figura 2. Cacao forastero .....   | 10 |
| Figura 3. Comportamiento histórico futuro más cercano de cacao en nueva york.....   | 29 |
| Figura 4. Cacao futuro más cercano .....  | 30 |
| Figura 5. Resultados de contaminaciones y oxidaciones en yemas axilares de cacao expresados en porcentajes .....  | 49 |
| Figura 6. Tubos conteniendo explantes de cacao presentando oxidación y contaminación de hongos y bacterias. ....  | 49 |
| Figura 7. Resultado de porcentajes de unidades experimentales contaminadas en explantes de cacao .....  | 51 |
| Figura 8. Control de contaminantes en explantes de cacao ( <i>Theobroma cacao</i> ) .....   | 52 |
| Figura 9. Explantes de cacao oxidados 5 días después de la siembra en medio MS sin carbón activo.....   | 52 |
| Figura 10. Control de los microorganismos que afectan a los explantes de cacao expresados en porcentaje .....   | 54 |
| Figura 11. Explantes sin respuesta y presentan oxidación, medio MS + Carbón activo. ...   | 54 |
| Figura 12. Explante en medio de cultivo conteniendo carbón activo, sin evitar oxidación.....  | 55 |
| Figura 13. C. Meristemo de cacao D. Meristemos que fueron depositados dentro de los tubos de ensayo conteniendo medios de cultivo más carbón activo. .... | 56 |
| Figura 14. Meristemo cultivado en medio MS + carbón activo.....   | 56 |
| Figura 15. Demostrando la oxidación de los meristemos de cacao, se observan partes necróticas en la figura E así como en la figura F. ....                | 57 |
| Figura 16. Meristemo totalmente oxidado después de 25 días de sembrado. ....  | 57 |

EVALUACIÒN DE LA PROPAGACIÒN *in vitro* EN CINCO CLONES PROMISORIOS DE CACAO (*Theobroma cacao L.*).

EVALUATION OF *in vitro* PROPAGATION OF FIVE PROMISING CLONES OF COCOA (*Theobroma cacao L.*).

RESUMEN

El cacao pertenece a la familia Malvácea, es un cultivo importante y se puede propagar por la vía sexual y asexual, en la vía sexual se cultiva sin una visión de mejoramiento genético y se obtienen plantas no deseables agronómicamente, así también no se le da el mejor manejo agronómico para incrementar su producción y en la propagación asexual sus costos de producción son altos, se tiene una baja tasa de propagación y la mano de obra debe de ser calificada, principalmente cuando se realiza por la vía de injertación.

Se debe de trabajar con el cultivo de cacao (*Theobroma cacao L.*) a partir de la técnica *in vitro*, la cual es una herramienta de apoyo en la multiplicación y conservación de germoplasma, contribuyendo de esta manera a mejorar la propagación y multiplicación.

La técnica de cultivo de tejidos *in vitro* consiste esencialmente en el aislamiento de un explante, que se cultiva asépticamente en un medio de composición química definida y se incuba en condiciones ambientales controladas, la interacción de los distintos factores que intervienen en este proceso, determina las respuestas que se obtengan *in vitro*.

En el presente estudio se investigó la respuesta de cinco clones de cacao (*Theobroma cacao L.*) al cultivo de tejidos *in vitro*, a partir de un explante de yema axilar, meristemo apical, hoja, en un medio de cultivo (Murashige y Skoog) con 12 combinaciones de auxinas y citocininas, más un testigo absoluto (MS sin reguladores de crecimiento), con el propósito de generar conocimiento y tecnología que puedan contribuir a la propagación y conservación de dichas plantas. No se obtuvieron resultados positivos debido al alto grado de oxidación del material vegetal aun utilizando antioxidantes como ácido cítrico y carbón activo. Las auxinas utilizadas fueron ANA en niveles de 0.5, 1.0, 3.0, 5.0 mg/lit. y citocinas como BAP a niveles de 0.5, 1.0, 3.0, 5.0 mg/lit.

Se trabajó el cultivo de cacao por medio de la técnica de cultivo *in vitro*, pero existieron limitantes como el tiempo de traslado del material vegetal de la finca Bulbuxyá hacia el laboratorio de cultivo de tejidos en la Facultad de Agronomía de la ciudad de Guatemala para el desarrollo de las estructuras utilizadas conocidas como explantes, debido al alto porcentaje de oxidación que presenta la estructura.

Para obtener resultados satisfactorios en la etapa de inducción de brotes se recomienda reducir el tiempo de corte de las varetas porta yemas y el tiempo de siembra de los explantes a utilizar.

## 1 INTRODUCCIÓN

El cacao es un cultivo que se ha venido propagando sin una visión de mejoramiento genético por lo que actualmente en Guatemala, en las dos zonas cacaoteras se mantiene bajo una situación de plantaciones muy viejas con un manejo tecnológico bajo, con una influencia de enfermedades como mancha negra y el mal del machete que afectan seriamente la productividad y son materiales genéticamente no deseables agronómicamente.

El cacao es un cultivo originario del trópico húmedo mesoamericano, continúa manteniendo enorme importancia económica a nivel mundial. Un promedio de 3 millones de toneladas de cacao son producidas cada año, de las cuales aproximadamente un 90% son utilizadas como materia prima para la elaboración del chocolate. En la segunda mitad de la década de 1990's los países productores de cacao generaron un ingreso anual de más de 3000 millones de dólares por exportación de cacao en grano y de sus productos derivados (ITC, 2001). De este cultivo depende la subsistencia de muchos pequeños agricultores para los que genera trabajo (Mejía y Palencia, 2000). Contraste entre personas originarias y están dentro de los que menos producen siendo un país productor y en donde no optimizamos el rendimiento del cultivo.

El presente estudio fue la utilización de la técnica de cultivo *in vitro* en varios clones elite de cacao, para buscar alternativas de propagación para ayudar a la multiplicación de materiales promisorios. Para llevar acabo los objetivos del estudio se colecto material vegetativo (varetas), en el jardín clonal del Centro de Agricultura Tropical BULBUXYA, cuyo material se traslado al laboratorio de cultivo de tejidos vegetales de la Facultad de Agronomía, donde se cultivaron los explantes necesarios (yemas axilares) en medios de cultivo con diferentes concentraciones.

De todas las pruebas realizadas no se obtuvieron resultados positivos, debido a la ocurrencia de contaminaciones fúngicas de campo, contaminaciones de laboratorio (ácaros) y oxidación del material vegetativo, dentro de todo el proceso se lograron superar

las primeras dos situaciones pero la oxidación del material vegetativo persistió durante el proceso de colecta, traslado, preparación y siembra de explantes donde se utilizó carbón activo, para evitar el proceso de oxidación sin llegar a tener los resultados deseados. Por lo que se concluye que para el periodo transcurrido, durante la colecta hacia el laboratorio, el factor tiempo es elemental dentro del éxito y el fracaso para la propagación y multiplicación para los explantes de cacao.

## 2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El cacao (*Theobroma cacao L.*) es un cultivo importante y se puede propagar por la vía sexual y asexual, en la propagación sexual ocurre una recombinación genética en donde se traslada tanto característica del padre como de la madre, se puede realizar por medio de polinizaciones dirigidas o polinización natural, en la primera se debe tener conocimiento de las características de los padres y en la polinización natural se tiene incertidumbre de las plantas resultantes. Por la vía asexual se obtienen plantas genéticamente iguales a la planta madre y si es de una planta previamente seleccionada por sus características agronómicas los resultados serán mejores. Por la vía sexual la polinización dirigida tiene costos muy altos por la mano de obra calificada que se utiliza, en la polinización natural sus costos son bajos pero no todas las plantas son deseables agronómicamente los dos métodos tienen una alta tasa de propagación. En la vía asexual sus costos de producción son altos, se tiene una baja tasa de propagación y la mano de obra debe ser calificada principalmente cuando se realiza por la vía de la injertación, para obtener los mejores resultados se debe tener una visión de mejoramiento.

Bajo esta problemática de la propagación, la situación del cacao en Guatemala se ha caracterizado por una corta visión de mejoramiento por lo que actualmente se tiene condiciones de bajo rendimiento, susceptibilidad a enfermedades, baja tecnología en su manejo. Ya que la mayoría de las plantaciones híbridas (propagación sexual) se han realizado por vía de la polinización natural sin ninguna clasificación y selección de la semilla, con relación a la propagación asexual principalmente la vía de la injertación también se ha caído en el error de que el injerto por sí solo mejora las condiciones de la planta no se ha realizado ninguna selección de patrones ni de la planta donadora del tejido a injertar.

Por estas razones es importante la búsqueda de técnicas para superar las tasas de propagación, obtener plantas clonales libres de fitopatógenos, precoces, con características deseables agronómicamente.

### 3 MARCO TEÓRICO

#### 3.1.1 Origen y taxonomía

El cacao es una planta que se originó en América del sur, en el área del Alto Amazonas de acuerdo a los estudios de Pound, Chessman y otros. Debido al sistema de vida nómada que siempre llevaron los primeros habitantes de este continente, es difícil decir a ciencia cierta cuál fue el lugar exacto de origen (Enríquez, 1983).

El cacao ha sido cultivado desde hace siglos en América y uno de los principales centros de domesticación del cultivo fue en Mesoamérica, donde los Toltecas, aztecas y Mayas lo cultivaban desde mucho antes del descubrimiento de América (Hardy 1961). El cacao usado en el siglo XVI por los Aztecas y Mayas en muchas áreas de sureste de México y Centroamérica era el tipo criollo y no hay evidencia de que se plantara el tipo Forastero, antes que los españoles empezaran a difundir el cultivo (Wood 1985).

El hábitat natural del género *Theobroma* es el estrato bajo del bosque lluvioso siempre verde. Todas las especies silvestres del género se encuentran en los bosques lluviosos del hemisferio occidental, desde los 18° N a los 15° S, es decir desde sur este de México, hasta el sur de la Amazonía en Brasil y Bolivia (Toxopeus, 1985).

*Theobroma cacao* L. pertenece a la familia Esterculiáceae pero existe una corriente del cambio a la familia Malváceae, del orden Malvales. El género *Theobroma* comprende 22 especies, todas originarias de los bosques húmedos tropicales de la América Ecuatorial (Mossu, 1990)

#### 3.1.2 Botánica

*Theobroma cacao* fue el nombre dado por Linnaeus al árbol de cacao en la primera edición de *Species Plantarum*. La primera palabra del nombre de esta especie significa

“alimento de los dioses” (Toxopeus, 1985; Baker, 1891). El género *Theobroma* se divide en 6 secciones que contienen 22 especies, de estas *T. cacao* es la única que es cultivada ampliamente (Toxopoeus, 1985).

El árbol de cacao crece hasta alcanzar 10 metros de altura cuando está a la sombra de altos árboles forestales. En forma silvestre bajo la fuerte sombra del bosque primario ellos pueden crecer hasta 20 m. En una planta proveniente de semilla el tallo crece verticalmente y después de alcanzar de 1 a 1,5 m de altura, detiene el crecimiento apical y emite de 3 a 5 ramas laterales formando una horqueta; las ramas laterales se ramifican profusamente, debajo de la primera horqueta se forma un chupón que crece hasta formar un nuevo piso para continuar con el crecimiento vertical u ortotrópico de la planta. El árbol reproducido vegetativamente, no muestra un tallo único, predominando el crecimiento de las ramas laterales (ITC, 2001; Barahona, 1987).

El fruto es una mazorca de 15 a 25 cm. de largo, dentro de la cual se encuentran las semillas embebidas en una pulpa mucilaginosa; el número de semillas puede variar de 30 a 40, las que se convierten en el grano del cacao después de ser fermentadas y secadas.

Las mazorcas brotan del tronco principal y de las ramas de la copa. El cacaotal comienza a producir a partir del cuarto ó quinto año de haber sido plantado y puede producir por decenios (ITC, 2001; Wood 1985).

## **3.2 Condiciones climáticas y edáficas del cultivo**

### **3.2.1 Condiciones climáticas**

La temperatura, así como sus fluctuaciones estacionales o diarias, afecta a los procesos fisiológicos más importantes de las plantas y, particularmente, en el cacao ejerce un efecto sobre el ritmo de los brotes foliares, superficie foliar total, crecimiento secundario y floración.

La distribución mundial del cultivo está limitada, en gran parte, por los rangos restringidos de temperatura, bajo los cuales prospera la planta. A escala comercial, las temperaturas favorables pueden fijarse en 22° C como temperatura media y en 32° C como temperatura máximo. La temperatura mínima puede ser de 16° C y la temperatura óptima alrededor de 25° C (Hardy 1961; Urquhart, 1963).

Cuando los cambios de temperatura son bajos la humedad relativa incrementa y hay mayor incidencia de enfermedades como la *Phytophthora palmivora*, y se producen caída de las hojas, así como problemas en la floración. La formación de flores tiene su óptimo alrededor de los 27° C (Braudeau, 1970), pero temperaturas constantes de 31° C durante el día y la noche impiden la floración. El efecto de las bajas temperaturas se refleja en la tasa de crecimiento vegetativo, en el desarrollo de los frutos y en la intensidad de la floración.

El crecimiento y la producción del cacao están determinados no sólo por la abundancia de las precipitaciones, sino también por su distribución durante el año. En algunas zonas, el volumen así como la distribución de la cosecha están regulados por la lluvia más que por cualquier otro de los factores ecológicos (Vera 1987).

La mayoría de las zonas productoras de cacao presentan precipitaciones entre 1.200 mm. y 2.500 mm. por año, aunque en realidad se cultiva dentro de límites muchos más amplios. Se pueden mencionar algunas regiones como Nueva Guinea, donde se cultiva el cacao, aunque en baja cantidad, con precipitaciones que se aproximan a los 5.000 mm. por año (Smyth, 1967).

La humedad relativa suele ser muy alta en áreas cacaoteras y esto se ha señalado, frecuentemente, como una condición necesaria para su crecimiento y desarrollo (Urquhart, 1963). Sin embargo, las condiciones de alta humedad y alta temperatura son también favorables para el desarrollo de enfermedades fungosas que afectan al cacao (Braudeau, 1970).

### 3.2.2 Condiciones edáficas

El cacao requiere de suelos en los cuales las raíces puedan penetrar fácilmente, que retengan humedad durante la época seca y que permitan la circulación de aire y humedad. El sistema radicular de esta planta parece ser más sensible que otros cultivos (Hardy 1961; Smyth, 1967). Sin embargo, el cacao es capaz de adaptarse a los más variados tipos de suelo, incluso en aquellos cuyo contenido de nutrientes es muy bajo. En estos suelos la producción suele ser muy limitada, pero se pueden lograr rendimientos medios si el cultivo se mantiene bajo un adecuado sombraje y si los demás factores ecológicos son favorables (Braudeau, 1970).

Con relación a las propiedades físicas y químicas, el cultivo requiere de suelos profundos, con buen contenido de materia orgánica, nutrientes minerales y que no contengan obstáculos, tales como piedras y gravas, que impidan el buen desarrollo radicular. El sistema de raíces laterales del cacao se extiende radialmente y de ellas crecen raicillas que exploran la capa superficial mientras que la raíz principal explora las capas inferiores del suelo a profundidades de hasta 3 metros (Smyth, 1967; Braudeau, 1970).

En suelos de textura arcillosa, la penetración de las raíces se ve limitada dependiendo de los minerales que constituyan esta fracción (Smyth, 1967). Las arcillas más pesadas, incluyendo las constituidas por minerales arcillosos como los del grupo de la montmorillonita son, en general, inconvenientes para este cultivo (Smyth, 1967; Braudeau, 1970). La fracción arcillosa de la mayoría de los suelos en los trópicos húmedos se compone de arcillas caoliníticas y de óxidos de hierro y de aluminio, las cuales proporcionan un medio físico ideal para el desarrollo de las raíces del cacao (Smyth, 1967). Las mejores condiciones las presentan los terrenos franco-arcillosos.

### 3.3 Enfermedades

En la mayoría de los países productores de cacao uno de los factores mayormente responsables de los bajos rendimientos es la falta de control de las enfermedades más destructivas; tales como, la mazorca negra (*Phytophthora sp.*), Mal de Machete (*Ceratocystis fimbriata*) y En los últimos 15 años la rápida diseminación de estas enfermedades unido a los precios inestables, ha reducido la producción del cacao en Centro y Suramérica y las islas caribeñas cercanas en más de un 75% (Saunders et al 2000).

*Phytophthora palmivora* y otros hongos del mismo género pueden causar la mancha negra de las mazorcas, enfermedad conocida como “Mazorca Negra”. Estos hongos se encuentran en mayor o menor grado en todos los países donde se cultiva el cacao. La incidencia de la enfermedad varía con la cantidad de lluvia y con su distribución, con la humedad atmosférica y con la temperatura, siendo en general mayor en los países de precipitación más alta (Urquhart, 1963). *Phytophthora* es un patógeno del cacao de enorme importancia económica, de tal manera que el nivel de la incidencia de esta enfermedad puede bien determinar si es rentable o no plantar cacao en ciertas áreas (Lass, 1985).

La “Mazorca negra” es una enfermedad que ataca principalmente el fruto del cacao, este hongo puede reducir la producción hasta en un 100% durante los períodos más altos de infección. El hongo también ataca y destruye otras partes de la planta como hojas, chupones, yemas, raíces, flores y a veces inclusive el tallo (Hess, 1990).

El primer brote de “Mal de Machete” (*Ceratocystis fimbriata*) probablemente ocurrió en Ecuador en 1918. Esta enfermedad es ampliamente distribuida en el mundo y por lo tanto constituye una amenaza potencial siempre presente en los cultivos de cacao. Sin embargo sólo se manifiesta cuando los árboles atraviesan por condiciones de estrés (Lass, 1985). La enfermedad puede afectar principalmente a las ramas y troncos de los árboles de cacao; se presenta inicialmente con marchitamiento de la parte afectada. Las hojas se tornan amarillentas, luego de color café rojizo hasta secarse. Los árboles afectados

pueden llegar a morir al poco tiempo de presentar sus primeros síntomas iniciales, es característico que las hojas secas permanezcan adheridas a las ramas por cierto tiempo sin desprenderse (Urquhart, 1963). En los árboles afectados es típico encontrar un polvillo o aserrín de madera que sale de pequeños agujeros efectuados por insectos taladradores del género *Xyleborus*, los que actúa como transmisores de esta enfermedad a los árboles sanos (Lass, 1985).

### **3.4 Diversidad genética.**

La diversidad genética de las poblaciones cultivadas de cacao es tan amplia que se consideraba que incluía tres grupos diferenciados: *Theobroma cacao* que agrupa a los criollos, forasteros y trinitarios. Además existen otras especies que no se cultivan en áreas grandes pero que tienen valor por el uso doméstico que se les asigna en algunos países o regiones. (Gatica 1994).

#### **3.4.1 Criollo:**

El fruto es con frecuencia alargado con hombros anchos también tiene la punta pronunciada, doblada y aguda; la superficie es generalmente rugosa y hasta muy arrugada, de color verde, frecuentemente con salpicaduras de rojo a púrpura oscuro; los granos tienen usualmente una sección transversal redondeada y son grandes. Las poblaciones de criollo se subdividen todavía en criollo Centroamericano y criollo Sudamericano. (García 1984)

A este grupo también se le da el nombre cacao fino de aroma y lo utilizan para la preparación de chocolate.



**Figura 1.** Cacao criollo

#### **3.4.2 Forastero:**

Este grupo tiene su origen en el Amazonas e incluye poblaciones silvestres, semi silvestres y cultivadas. Estos se caracterizan por sus mazorcas verdes que al madurar se tornan amarillas, su cáscara es lisa y extremadamente dura, cada mazorca tiene más de 30 semillas de color violeta oscuro o púrpura de forma aplastada (Toxopeus 1985).

Se subdividen formas de fruto calabacillo, cundeamor, angoleta y amelonados, que poseen características de alto rendimiento y resistencia a enfermedades.



**Figura 2.** Cacao forastero

### **3.4.3 Trinitarios**

Este grupo es el resultado del cruzamiento natural entre los tipos Criollos y Forasteros (Wood 1985).

Los trinitarios tienen características intermedias entre estos grupos, y no se encuentran en estado Silvestre, el primer cruce que fue encontrado en Trinidad dio árboles muy vigorosos, productivos y resistentes, estas características continuaron por unas pocas generaciones, pero en generaciones posteriores el vigor declinó (Toxopeus 1985)

### **3.5 Mejoramiento genético del cacao.**

Las introducciones sucesivas de cacaos Forasteros y Trinitarios en los cacaotales han ocasionado una gran variabilidad genética en las plantaciones colocando en riesgo de desaparición a los genotipos Criollos que son cacaos finos y de aroma pero menos vigorosos y productivos con mayor susceptibilidad a enfermedades. Varios cientos de años de cruzamiento naturales con la intervención más reciente del mejoramiento genético dirigido hacia el aumento de la productividad y no hacia el mantenimiento de la calidad, ha sido la base de la problemática de la pérdida de la calidad (FONCACAO 1994)

El mejoramiento genético convencional ha hecho posible 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 de cultivo, la resistencia a enfermedades y la producción (Wilkinson 2001)

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 2001).

La única forma de producir árboles de alta calidad uniforme es por la propagación vegetativa la cual reproduce exactamente las características del árbol paternal. Un número de métodos de propagación vegetativa han sido desarrollados; tales como, injertos, enraizamiento de estacas, acodos y cultivos de tejidos (Bowers y Bailey 2004).

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, 2001).

### **3.6 Métodos de propagación de cacao.**

#### **3.6.1 Propagación sexual**

El cacao ha sido propagado comúnmente por semilla debido a que es la manera más sencilla y barata. Es la forma más Antigua y común para el establecimiento de plantaciones de cacao pero se obtiene una gran variabilidad de árboles, por lo que no se recomienda su utilización salvo cuando se utilicen semillas de elevada calidad. En los últimos años se han recomendado la siembra de semilla certificada, debido al buen comportamiento de los árboles provenientes de semilla de polinización controlada, usando clones seleccionados (Wood y Lass 1985).

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 1987).

### **3.6.2 Propagación asexual**

La propagación asexual o vegetativa juega un rol importante para reproducir con fidelidad las características deseables de un árbol o grupo de árboles seleccionados.

En el caso del cacao, especie perenne, alógama y con un ciclo de mejoramiento considerablemente largo (15 años), la propagación vegetativa se practica tradicionalmente mediante el enraizado de ramas y el injerto en yemas. Sin embargo, ambas técnicas presentan eficiencia variable, requieren de jardines clonales para producir suficiente material para la propagación y usualmente un alto costo por la planta obtenida, por lo que su utilización es muy limitada. Como resultado de programas de mejoramiento genético desarrollados en diversos centros de investigación del mundo, existe una cantidad considerable de genotipos mejorados; sin embargo, una de las mayores limitantes para aprovechar este germoplasma es la falta de métodos de clonación masiva de las plantas seleccionadas, eficientes tanto desde el punto de vista económico como agronómico (López Baez *et al.* 2000a, Astorga 2001).

#### **3.6.2.1 Enraizado de estacas y acodos**

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.*, 1983).

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, 1987).

### **3.6.2.2 Propagación por injerto**

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 1987).

Los tipos de injerto más comunes son los de púa central, púa lateral y parche. La selección del método obedece a criterios de costo y la disposición de asumirlos (Adriazola 2003)

### **3.6.2.3 Propagación *in vitro***

El cultivo *in vitro* de plantas se realiza colocando bajo condiciones asépticas, fragmentos de la planta de las cuales regeneran nuevas plantas. Estos fragmentos de tejido son llamados comúnmente explantes y la parte de la planta de la cual son obtenidos va a depender de la metodología de multiplicación utilizada y de la cantidad de plantas que se desea producir (Evans *et al.* 1984).

El deseo de obtener grandes cantidades de propágulos de cultivares de alto rendimiento ha estimulado los estudios en cultivos de tejidos (Elhag *et al.*, 1988). 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 1991).

La principal ventaja del cultivo *in vitro* como vía de propagación, es la producción uniforme de plantas que conservan los mismos caracteres de la planta de origen (López Baez *et al.* 2000a)

#### **3.6.2.4 Embriogénesis somática**

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).

La embriogénesis somática fue reportada por primera vez por (Reinert 1958 y Steward 1958) en zanahoria. Sus trabajos se establecieron a partir del postulado de Haberlandt de 1902 que establece que “cualquier célula vegetal, cuando es expuesta a un ambiente y estímulos apropiados es capaz de regenerar una planta”. Según el concepto de la totipotencia celular cualquier tejido puede dar origen a una planta completa, si las condiciones ambientales pueden ser reguladas adecuadamente.

Es un método muy eficiente para reproducir plantas de mejoramiento genético y ofrece el potencial para la conservación y la producción de un número ilimitado de plantas. Se cree que los cultivos embriogénéticos tarde o temprano eventualmente se pudieran utilizar en la producción comercial de árboles. Sin embargo, son necesarias tasas considerablemente mayores de producción y sistemas de manejo en gran escala para utilizar la embriogénesis somática para la producción en masa de las plantas (Sutton 2002).

### **3.6.2.5 Micropropagación.**

Micropropagación, es referirse al proceso a través del cual, se colocan en un medio de cultivo explante de tejidos órganos u otras estructuras de tejidos vegetales, haciéndolo asépticamente para lograr la propagación masiva de plantas bajo condiciones *in vitro* (ICTA 1996).

## **3.7 Aspectos generales de la regeneración *in vitro***

Al hablar de regeneración, se tiene que considerar algunos aspectos fundamentales relacionados con la teoría celular, referidos principalmente a la totipotencialidad de las células vegetales. La organización estructural de cada órgano o tejido en particular, es un efecto de la información genética contenida en cada célula del tejido y cada una de esa célula es capaz de expresar su potencialidad genética para generar una planta completa.

La propagación *in vitro*, micropropagación o cultivo de tejidos vegetales, consiste en el cultivo *in vitro* de las partes de una planta que pueden ser células, protoplastos o tejidos especializados (denominados explantes), bajo condiciones asépticas en un medio nutritivo adecuado y ambiente controlado.

### **3.7.1 Factores que influyen en el cultivo *in vitro***

En los estudios realizados sobre organogénesis, se ha establecido que el éxito depende de tres factores fundamentales que son: la composición química y las características físicas del medio de cultivo, control del ambiente de cultivo y la elección del explante.

### **3.7.1.1 Composición química del medio**

Los compuestos esenciales son clasificados en cinco grupos: sales minerales, vitaminas, azúcares, reguladores de crecimiento y otros compuestos orgánicos:

### **3.7.1.2 Sales minerales**

Utilizadas para suplir los requerimientos de macronutrientes y micronutrientes deben ser de una gran pureza o grado de reactivo. Esta mezcla de sales minerales es considerada como medio básico, ya que su composición siempre va a permanecer constante.

### **3.7.1.3 Vitaminas**

Tiene un papel muy importante dentro del sistema enzimático actuando como coenzimas en los diferentes procesos fisiológicos de la planta. Solamente la tiamina es considerada como esencial, mientras otras como el ácido nicotínico y piridoxina son agregados para estimular procesos específicos.

### **3.7.1.4 Carbohidratos**

En el cultivo *in vitro* el CO<sub>2</sub> es suplido en todo el ciclo de desarrollo por una fuente de carbono orgánica o carbohidratos. Todos los medios de cultivo requieren la presencia de azúcar en mayor o menor cantidad, por el hecho de que los explantes *in vitro*, son inducidos a desarrollarse heterotróficamente al inducirlos en un microambiente donde se interrumpe significativamente el intercambio y disponibilidad del CO<sub>2</sub>; necesariamente para el desarrollo normal de la fotosíntesis, disminuyendo ésta, hasta casi desaparecer.

Los carbohidratos aparentemente tienen un papel biofísico y bioquímico en la formación de brotes, encontrándose que existe una acumulación de almidón antes de la formación de brotes. La sacarosa en la se ha utilizado con mayor frecuencia debido a que se han obtenido los mejores resultados sobre otros azúcares como la glucosa, fructuosa, maltosa, etc.

#### **3.7.1.5 Reguladores del crecimiento**

Cuando los explantes (células, tejidos u órganos) son aislados de la planta madre para cultivarlos *in vitro*, es necesario suministrar todos los compuestos que se encuentren en cantidades limitadas. Entre estos se encuentran las hormonas o reguladores de crecimiento, los cuales se clasifican en tres tipos: auxinas, citocinas y giberlinas, donde los dos primeros tienen especial importancia en el medio de cultivo vegetal.

Skoog y Miller; citados por Brown y Thorpe, concluyeron que las interacciones cuantitativas entre reguladores de crecimiento; especialmente auxinas y citocinas, proporcionan un mecanismo, incluyendo la formación de órganos. Es decir, una alta concentración de citocinas suprime la formación de raíces e incrementa la producción de brotes en callos de tabaco; y por el contrario, una alta concentración de auxinas favorece la formación de raíz e inhibe el desarrollo de brotes.

#### **3.7.1.6 Auxinas (Acido 3 - indolacético)**

El nombre auxina significa en griego 'crecer' y es dado a un grupo de compuestos que estimulan la elongación. El ácido indolacético (IAA) es la forma predominante, sin embargo, evidencia reciente sugiere que existen otras auxinas indólicas naturales en plantas. Aunque la auxina se encuentra en toda la planta, las más altas concentraciones se localizan en las regiones meristemáticas en crecimiento activo. Se le encuentra tanto

como molécula libre o en formas conjugadas inactivas. Cuando se encuentran conjugadas, la auxina se encuentra metabólicamente unida a otros compuestos de bajo peso molecular. Este proceso parece ser reversible. La concentración de auxina libre en plantas varía de 1 a 100 mg/kg peso fresco. En contraste, la concentración de auxina conjugada ha sido demostrada en ocasiones que es sustancialmente más elevada (González. A, Raisman. J, Aguirre. M 1999).

### **3.7.1.7 Transporte de las auxinas**

En contraste con el movimiento de azúcares, iones y algunos otros solutos, el ANA no suele translocarse a través de los tubos cribosos del floema o por el xilema, sino principalmente a través de células parenquimatosas que se encuentran en contacto con haces vasculares.

El transporte tiene características que difieren de las del transporte en el floema. En primer lugar, el movimiento de auxinas es lento, de solo 1 cm. h<sup>-1</sup> en raíces y tallos, aunque es 10 veces más rápido de lo que podría esperar por difusión. En Segundo lugar, el transporte de auxinas es polar, en tallos siempre se presenta de manera preferencial en sentido basipétalo (hacia la base), sin importar si la base está abajo como es normal o si la planta se invierte. El transporte en las raíces también es polar pero de preferencia en sentido acropétalo (hacia los ápices). En tercer lugar, el movimiento de la auxina requiere energía metabólica como lo evidencia la capacidad que tienen para bloquear los inhibidores de la síntesis del ATP o la carencia de oxígeno.

El transporte polar a través de un órgano requiere que la auxina salga solo por el extremo basal de una célula opuesto por donde entró. Esta salida preferencial por el extremo basal supone que algunos portadores situados en esta región de la membrana extraen auxinas cargadas hacia la pared celular, donde de nuevo el pH provoca que la mayor parte de ellas se vuelvan moléculas sin carga (Salisbury, Rossi 1978).

### 3.7.1.8 Efecto de las auxinas sobre las raíces y la formación de las raíces

El ANA existe en raíces a concentraciones similares a las que se encuentran en muchas otras partes vegetales. La administración de auxinas promoverá la elongación de secciones escindidas de raíces o aún de raíces intactas de muchas especies, pero solo a concentraciones extremadamente bajas (10 a 10M. dependiendo de la especie y la edad de las raíces).

La suposición es que las células radicales suelen contener auxina suficiente o casi suficiente para la elongación normal. Ciertamente, muchas raíces extirpadas crecen durante días o semanas *in vitro* sin necesidad de esta hormona. Una de muchas preguntas acerca del mecanismo de acción de las auxinas tiene que ver con la manera en que pueden inhibir el crecimiento de la raíz a concentraciones micromolares.

Desde hace mucho se ha supuesto que parte de esta inhibición se debe al etileno, ya que las auxinas de todos los tipos estimulan la producción de etileno en muchos tipos de células vegetales, en especial cuando se agregan cantidades relativas elevadas de auxinas. En la mayoría de las especies el etileno retarda la elongación tanto en raíces como en tallos.

La capacidad de las raíces escindidas de crecer en cultivos de tejidos durante semanas, meses, significa que tales raíces no dependen de ninguna auxina para producirla en el sistema aéreo. Esto puede significar que, las raíces se adaptan tanto para formar la o las auxinas que necesitan. También puede significar que, las raíces siempre tienen la capacidad de sintetizar auxinas suficientes para su crecimiento.

La eliminación de yemas y hojas jóvenes, ambos ricos en auxinas, inhiben el número de raíces laterales formadas. La sustitución de auxinas por estos órganos con frecuencia resiste la capacidad de la planta para formar raíces. Así, hay una diferencia importante en los efectos de las auxinas exógenas sobre la elongación de la raíz en donde lo usual es observar una promoción. La auxina sintética ANA por lo común es más eficaz que el IIA, al

parecer debido a que no es destruida por la IIA oxidasa u otras enzimas y, por consiguiente, persiste por mayor tiempo. (Salisbury, Rossi 1978).

#### **3.7.1.9 Mecanismos de acción de las auxinas**

El crecimiento inducido por las auxinas, el potencial hídrico se mantiene no solo más negativo que el de la solución circundante, sino también más negativa que las secciones de control. Esto se debe a que las paredes celulares de células tratadas con auxinas ceden con mayor facilidad, de modo que el potencial de presión que requiere para forzar la expansión celular de estas células nunca tiene que volverse tan elevado como células no tratadas. La conclusión que se obtiene de muchas investigaciones que se han realizado es que las auxinas provocan un ablandamiento o aflojamiento de la pared, término que describe la naturaleza más rápidamente extensible o plástica de las paredes de células tratadas con auxinas (Salisbury, Rossi 1978).

#### **3.7.1.10 Citocininas (5 bencil aminopurina)**

Hacia 1913, Gottieg Haberlandt, en Austria, descubrió que un compuesto desconocido presente en los tejidos vasculares de diversas plantas estimulaban la división celular que causa la formación del cambium del corcho y la cicatrización de las heridas en tubérculos cortados.

Son sustancias que se caracterizan por su capacidad para interactuar con el AIA, promoviendo división en células que crecen en un medio artificial. Otra característica de este grupo de sustancias es su propiedad de afectar los patrones de diferenciación.

La citocinina más conocida es la cinetina, que es un regulador de crecimiento. Un ejemplo de citocinina natural es la zeatina que se encuentra en el endosperma de granos inmaduros de maíz.

Las citocininas producen una variedad de efectos en el crecimiento y desarrollo de las plantas. Además de promover división celular, interactúan con las auxinas para inducir desarrollo de raíces y de tallos en un cultivo *in vitro* de tejido de tabaco.

Las citocininas también influyen en la estimulación de la germinación, el crecimiento de algunos frutos y el retardo de la senescencia de diferentes órganos. También interactúan con las auxinas y giberelinas para regular el crecimiento y diferenciación de plantas.

Diversos antecedentes sugieren que las citocininas se sintetizan en la raíz y son transportadas hacia las hojas en la corriente transpiratoria.

#### **3.7.1.11 Metabolismo de las citocininas**

Las concentraciones celulares de citocininas también son influidas por su degradación y por su conversión en derivados probablemente inactivos, diferentes de los nucleótidos.

La degradación es efectuada principalmente por la citocinasa oxidasa, un sistema enzimático que extrae la cadena lateral de cinco carbonos y libera adenina (o bien adenosina libre, cuando se oxida el ribósido de zeatina).

La formación de los derivados de citocinina es más compleja debido a que se pueden formar muchos conjugados. Los conjugados más comunes contienen ya sea glucosa o alamina; a los que contienen glucosa se les llama glucósidos de citocinina (Salisbury, Rossi 1978).

### **3.7.1.12 Sitios de síntesis y transporte de citocininas**

En general, los niveles de citocininas son máximos en órganos jóvenes (semillas, frutos y hojas) y en la puntas de las raíces. Parece lógico que se sinteticen en esos órganos, pero en la mayoría de los casos no podemos desechar la posibilidad de su transporte desde otro lugar. Para las puntas de las raíces, casi con seguridad interviene la síntesis; por lo que si las raíces se cortan en forma horizontal, exudan citocininas (debido a la presión de raíz), desde el xilema de las partes inferiores restantes por periodos hasta de cuatro días.

El transporte de varios tipos de citocininas ciertamente se realiza en el xilema, pero los tubos cribosos también contiene citocininas ciertamente se realiza en el xilema, pero los tubos cribosos también contienen citocininas, como lo demuestra la presencia de éstas en la mielecilla de los áfidos. Los experimentos con hojas desprendidas de dicotiledóneas son más evidencia del transporte en el floema (Salisbury, Rossi 1978).

### **3.7.1.13 División celular y formación de órganos promovidos por citocininas.**

Skoog y sus colegas encontraron también que, si se mantiene una relación alta de citocininas – auxinas, se producen células meristemáticas en el callo; estas células se dividen y generan otras que se desarrollan para formar yemas, tallos y hojas. Pero, si se reduce la relación de citocininas a auxinas, se favorece la formación de raíces, seleccionando la relación adecuada, se puede hacer que los callos de muchas especies, sobre todo dicotiledóneas, se desarrollen hasta formar una nueva planta completa. La capacidad de los callos de generar plantas con resistencia a sequía, esteres salinos, patógenos y determinados herbicidas o con otras características útiles.

El modo en que un callo forma una planta nueva es variable. A menudo, con relaciones de citocininas a auxinas variablemente altas, se desarrolla solo un sistema aéreo al principio; después se forman raíces adventicias espontáneamente de los tallos, mientras todavía están en el callo. Mediante técnicas hortícolas comunes también es posible inducir a las

raíces a formar callos a partir de partes aérea o raíces adventicias o ambas, a partir del callo llamado organogénesis. A veces, los callos se hacen embriogénesis y forman un embrión que se transforma en una raíz y un sistema aéreo, esto se conoce como embriogénesis. Suele ser necesario agregar tanto citocininas como auxinas, al medio para que se presente la embriogénesis (Salisbury, Rossi 1978).

#### **3.7.1.14 Efecto de las citocininas en la inducción de tallos y raíces**

Si piensa que para el crecimiento de tallo y raíces se necesitan citocininas y auxinas, pero las cantidades endógenas rara vez son limitantes. Como resultado, la aplicación de citocininas exógenas no contribuye al crecimiento de la hoja a partir de plantas sin raíz.

El método para determinar la importancia de las citocininas normal de tallos y raíces es cortar secciones y hacerla crecer *in vitro*; en tales experimentos, la hipótesis es que las citocininas de las secciones cortadas se agotaran cuando estas se separen de las puntas del tallo o de la raíz, que se supone representan fuentes de hormonas. Sin embargo, nadie ha podido demostrar todavía, mediante mediciones reales, que en las secciones cortadas se agotarán las citocininas. Cuando se hacen crecer secciones de raíz o tallo *in vitro*

Una citocinina exógena, casi siempre se retarda en la elongación respecto a las secciones de testigo.

Es interesante el hecho de que, si bien inhiben el alargamiento, las secciones de tallo en general se hacen más gruesas por expansión radial de las células, de modo que el peso fresco global de las secciones tratadas no es muy diferente del de las secciones del testigo. ¿Que podemos concluir de resultados que solo muestran inhibición del alargamiento? Podríamos decir que los tallos y raíces en elongación no necesitan citocininas. O que también, aunque esos órganos podrían necesitar las hormonas para el alargamiento, pueden ya contener en cantidades suficientes (Salisbury, Rossi 1978).

### **3.7.1.15 Mecanismos de acción de las citocininas**

La variabilidad de los efectos de las citocininas, sugiere que ésta puede tener distintos mecanismos de acción en distintos tejidos; sin embargo, lo más sencillo sería que un efecto primario común fuera seguido por numerosos secundarios que dependieran del estado fisiológico de las células blanco. Como en el caso de otras hormonas, debe ocurrir amplificación del efecto inicial, porque las citocininas están presentes en bajísimas concentraciones (0.01 a 1.0 uM). Desde hace mucho se sospechaba un efecto promotor de las citocininas sobre la información de RNA y enzimas, en parte porque los efectos de las citocininas normalmente son bloqueados por inhibidores de las síntesis de RNA o proteínas. No se han observado efectos específicos sobre la síntesis de DNA, aunque citocininas exógenas con frecuencia incrementa la división celular y podrían necesitar normalmente para ese proceso.

La promoción de la citocinesis es una de las respuestas más importante de la citocininas por que permite la micropropagación comercial de varias cosechas de cultivos de tejidos (Salisbury, Rossi 1978).

## **3.8 Compuestos orgánicos naturales**

Existe una larga lista de compuestos naturales que se han adicionado ocasionalmente a los medios de cultivo, como Fuentes de nitrógeno reducido, reguladores de crecimiento, carbohidratos y otros. Entre estos compuestos se encuentran: el agua de coco, el jugo de tomate, el extracto de levadura, extracto de tubérculos de papa y otros.

### **3.8.1 Agentes gelificantes.**

Comúnmente se ha empleado el agar como un sistema de soporte para la preparación de medios de cultivo, en concentraciones de 0.6 a 1%. Otros gelificantes de uso reciente son: el gelrite y el phytigel, los cuales se utilizan en concentraciones menores (0.2%), son más económicos pero tienen una menor durabilidad.

### **3.8.2 Preparación del medio de cultivo**

Es necesario preparar el medio de cultivo utilizando agua bidestilada o agua desmineralizada destilada. Se debe evitar el almacenamiento prolongado del medio para evitar la acumulación de contaminantes; todas las sustancias químicas para su preparación deben ser de un alto grado de pureza.

El procedimiento para la preparación de los medios dependerá del tipo de medio, de su consistencia de la presencia de componentes termolábiles. En general, se pueden distinguir los siguientes tipos.

### **3.8.3 Medios semisólidos sin sustancias termolábiles**

La preparación de medios semisólidos sin sustancias termolábiles consta de los siguientes pasos:

- Incorporación de los macronutrientes, micronutrientes y vitaminas
- Ajuste de pH
- Adición y solidificación del agente gelificante (agar, gelrite o phytigel)
- Distribución del medio de cultivo en los recipientes

- Esterilización en el autoclave

#### **3.8.4 Medios líquidos con o sin sustancias termolábiles**

Para su preparación se sigue el procedimiento anterior, pero sin adicionar el agar y sin esterilizar al autoclave. La esterilización se realiza por filtración en el caso de sustancias termolábiles.

#### **3.8.5 Medios semisólidos con una o más sustancias termolábiles**

Para la preparación de medios semisólidos con una o más sustancias termolábiles se sugieren los siguientes pasos:

- Incorporación de los compuestos que pueden ser esterilizados en el autoclave (macronutrientes, micronutrientes, vitaminas y otros).
- Ajuste de pH
- Adición y solidificación del agente gelificante
- Esterilización en el autoclave
- Incorporación de las sustancias termolábiles, previamente esterilizadas por filtración, en la cámara de transferencia (los componentes esterilizados en el autoclave se deben de mantener a una temperatura entre 40 y 50 °C para evitar su gelatificación).
- Distribución del medio de cultivo en los recipientes, previamente esterilizados al autoclave.

### 3.9 Antecedentes en la micropropagación del cacao.

Todos los medios de cultivo preparados para este tipo de explantes contienen las sales de MS completos, tiamina (1 mg/lit), mio-inositol (100 mg/lit), ácido nicotínico (0.5 mg/lit), piridoxina (0.5 mg/lit), glicina (2 mg/lit) y sacarosa (40 g/lit), diferenciándose entre sí en las concentraciones de BAP y ANA utilizadas (García 1997)

Se apreció que los ápices caulinares regeneraron en el medio de establecimiento entre 2 y 25% de plantas y los segmentos nodales entre el 10 y 25 % de plantas. Para ambos explantes, el mejor medio para la inducción de plantas en una sola etapa fue el compuesto por MS + ANA 3 mg/L. Además, los dos tipos de explantes brindaron entre un 25 y 90 % de vástagos mayores a 5 mm en diferentes medios de cultivo, y al ser subcultivados a medios frescos conteniendo MS + ANA 0.1 mg/lit o bien MS + CA 2 gr/lit posibilitaron entre el 50 y 70% de plantas, se recomienda para el cultivo de segmentos nodales MS + 1 mg/lit de ANA como único regulador de crecimiento.

Con el propósito de desarrollar una metodología apropiada para la propagación de cacao (*Theobroma cacao L.*) por cultivo de tejidos, se indujo la brotación de microesquejes y la formación de embriones somáticos. Para la siembra de microesquejes se evaluaron 18 tratamientos, obteniéndose el mayor porcentaje de estacas con hojas desarrolladas en uno que contenía 0% de agua de coco, 3 mg/lit de auxina y 1 mg/lit de bencilaminopurina (BAP). Se observó que el porcentaje de estacas con hojas aumentó a medida que se incrementaban los niveles de la citocinina. Con una concentración de 1 mg/lit de BAP se alcanzó el mayor número de hojas y la máxima elongación de las mismas. Se logró la obtención de brotes adventicios a partir de callos, en un medio constituido por las sales de Nisch a concentración completa, suplementado con las vitaminas de Murashige y Skoog, tiamina (1 mg/lit), inositol (100 mg/lit), caseína hidrolizada (2 g/lit), sacarosa (30 g/lit), benlate (50 mg/lit), cisteína (50 mg/lit), gelrite (3 g/lit), ajustando el pH a 5.8 e incorporando kinetina como regulador de crecimiento. Estos brotes adventicios se multiplicaron y enraizaron en el mismo medio (Navas 1999)

### 3.10 Potencialidades del cacao en Guatemala

Los países industrializados son los principales consumidores de cacao donde se encuentran las plantas procesadoras y fabricantes de chocolate más importantes a nivel mundial. Entre ellos destacan, Europa, Norteamérica, Japón y Singapur.

Los precios internacionales del grano escalaron al nivel más alto en 28 años a mediados de marzo 2008, acercándose a los 3,000 dólares por toneladas en el mercado de futuros de Nueva York (SAGARPA 2008).

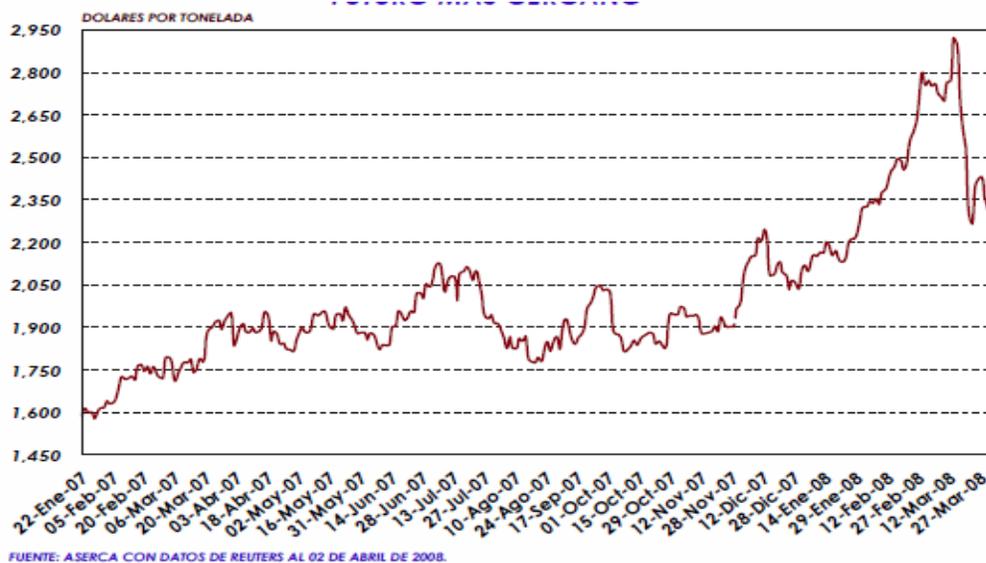


**Figura 3.** Comportamiento histórico futuro más cercano de cacao en nueva york.

Fuente: Reuters.

Según estimaciones de la Organización Internacional del Cacao, la producción mundial del año agrícola 2007/08 será de 3.71 millones de toneladas, cifra superior a los 3.38 millones registrados en el año 2006/07.

El futuro más cercano en Nueva York se ubicó alrededor de 2,240 dólares por tonelada al cierre del día 3 de abril 2008, pero sigue siendo el precio más alto desde 1984. (SAGARPA 2008).



**Figura 4.**Cacao futuro más cercano

### 3.10.1 Demanda mundial del cacao

Se estima que la demanda mundial de cacao crecerá 2.7% entre 2007 y 2010 para superar 4 millones de toneladas, en tanto que la producción seguirá concentrada en un solo continente, África.

Europa encabeza la lista de consumidores con una participación del 42% en el mercado internacional, seguido por los países de América que representan el 35% de la demanda y Asia con un 13%.

Los países consumidores más representativos son Estados Unidos, Alemania, Francia, Reino Unido, Japón, Italia y Brasil (SAGARPA 2008)

### **3.11 Marco Referencial.**

#### **3.11.1 Localización del experimento.**

El trabajo de investigación se realizó en el laboratorio de cultivos de tejidos vegetales que se encuentra ubicado en el salón C-16, tercer nivel del edificio T8, en la Facultad de Agronomía, de la Universidad de San Carlos de Guatemala. El mismo está equipado con condiciones controladas de luz, temperatura, humedad y se tienen los requerimientos adecuados para que se ejecuten investigaciones.

#### **3.11.2 Localización de la obtención del material vegetal original**

Las yemas utilizadas fueron de plantas de cacao del jardín de clonal del Centro de Agricultura Tropical BULBUXYA (CATBUL), ubicado en el municipio de San Miguel Panán, Suchitepéquez, con una altitud de 325 msnm y se localiza en las coordenadas 14°39'39" latitud norte y a 91°22'00" longitud oeste.

#### **3.11.3 Descripción de los clones**

Para el estudio se utilizaron los clones EET 48, UF 668. ETT 95, UF 667, SPA 9, que fueron recomendados, según estudio de su bioecología y seleccionados como clones élite por sus características agronómicas y calidad del grano (Monterroso *et. al.* 2009). A continuación se describe cada clon.

| Caracterización morfoagronómica   |   |   |
|---|---|---|
| Identificación:   | EET 48  |   |
| Tipo:   | Clon  |   |
| Procedencia:  | El CATIE, Turrialba, Costa Rica   |   |
| Origen:   | Ecuador, estación experimental tropical Pichilingue                                 |   |
| Tipo genético:  | Forastero del alto amazona  |   |
| Referencia genética:  | Engels, J.M. (1981)   |   |
| <b>Características cuantitativas y cualitativas del fruto</b>                         |   |   |
| Peso fruto:   | 753.37 gramos   |   |
| Peso cáscara+raquis:  | 596.71 gramos   |   |
| Peso semillas+mucílago:   | 156.66 gramos   |   |
| Largo fruto:  | 20.0 cm   |   |
| Diámetro fruto:   | 9.6 cm  |   |
| Grosor cáscara:   | 1.9 cm  |   |
|   |   |   |
| <b>Características cuantitativas y cualitativas de la semilla</b>                     |   |   |
| Peso semilla  | 1.81 gramos   |   |
| Porcentaje de peso de cotiledón   | 87 %  |   |
| Longitud semilla:   | 2.51 cm   |   |
| Ancho semilla:  | 1.44 cm   |   |
| Grosor semilla  | 0.95 cm   |   |
|  |   |   |
| <b>Características agronómicas del clon</b>   |   |   |
| Número promedio de frutos/árbol/año:  | 42  |   |
| Índice de fruto:  | 13  |   |
| Índice semilla:   | 1.81  |   |
|    |  |  |
| Monterroso, D; García, E; Enriquez, M. 2008.  |   |   |

| Caracterización morfoagronómica   |  |   |
|---|--|---|
| Identificación:   | UF 668   |   |
| Tipo:   | Clon   |   |
| Procedencia:  | El CATIE, Turrialba, Costa Rica  |   |
| Origen:   | Desconocido  |   |
| Tipo genético:  | Trinitario (hibrido desconocido) o acriollado  |   |
| Referencia genética:  | Enríquez, Gustavo (1967)   |   |
| <b>Características cuantitativas y cualitativas del fruto</b>                         |  |   |
| Peso fruto:   | 613.10 gramos  |   |
| Peso cáscara+raquis:  | 437.81 gramos  |   |
| Peso semillas+mucílago:   | 175.28 gramos  |   |
| Largo fruto:  | 19.9 cm  |   |
| Diámetro fruto:   | 8.9 cm   |   |
| Grosor cáscara:   | 1.4 cm   |   |
|   |  |   |
| <b>Características cuantitativas y cualitativas de la semilla</b>                     |  |   |
| Peso semilla:   | 2.02 gramos  |   |
| Porcentaje de peso de cotiledón:  | 92   |   |
| Longitud semilla:   | 2.74 cm  |   |
| Ancho semilla:  | 1.48 cm  |   |
| Grosor semilla:   | 0.94 cm  |   |
|  |  |   |
| <b>Características agronómicas del clon</b>   |  |   |
| Número promedio de frutos/árbol/año:  | 47   |   |
| Índice de fruto:  | 12.7   |   |
| Índice semilla:   | 2.02   |   |
|    |  |  |
| Monterroso, D; García, E; Enríquez, M. 2008.  |  |   |

| Caracterización morfoagronómica  |   |   |
|--|---|---|
| Identificación:  | EET 95  |   |
| Tipo:  | Clon  |   |
| Procedencia:   | El CATIE, Turrialba, Costa Rica   |   |
| Origen:  | Ecuador, estación experimental tropical Pichilingue                                 |   |
| Tipo genético:   | Forastero del alto amazona  |   |
| Referencia genética:   | Enríquez, Gustavo A.  |   |
| Características cuantitativas y cualitativas del fruto                               |   |   |
| Peso fruto:  | 656.55 gramos   |   |
| Peso cáscara+raquis:   | 480.70 gramos   |   |
| Peso semillas+mucílago:  | 175.96 gramos   |   |
| Largo fruto:   | 19.4 cm   |   |
| Diámetro fruto:  | 9.3 cm  |   |
| Grosor cáscara:  | 1.6 cm  |   |
|   |   |   |
|  |   | Características cuantitativas y cualitativas de la semilla                            |
| Peso semilla:  | 1.54 gramos   |   |
| Porcentaje de peso de cotiledón:   | 87  |   |
| Longitud semilla:  | 2.54 cm   |   |
| Ancho semilla:   | 1.30 cm   |   |
| Grosor semilla:  | 0.94 cm   |   |
|  |   |   |
|  |   | Características agronómicas del clon  |
| Número promedio de frutos/árbol/año:   | 47  |   |
| Índice de fruto:   | 15.7  |   |
| Índice semilla:  | 1.54  |   |
|   |  |  |
| Monterroso, D; García, E; Enriquez, M. 2008.   |   |   |

## Caracterización morfoagronómica

|                      |   |
|----------------------|---|
| Identificación:      | UF 667  |
| Tipo:                | Clon  |
| Procedencia:         | El CATIE, Turrialba, Costa Rica               |
| Origen:              | zona atlántica, Costa Rica                    |
| Tipo genético:       | Trinitario (hibrido desconocido) o acriollado |
| Referencia genética: | Enríquez, Gustavo A. (1967)                   |

### Características cuantitativas y cualitativas del fruto

|                         |               |
|-------------------------|---------------|
| Peso fruto:             | 630.09 gramos |
| Peso cáscara+raquis:    | 458.29 gramos |
| Peso semillas+mucílago: | 171.81 gramos |
| Largo fruto:            | 18.9 cm       |
| Diámetro fruto:         | 9.1 cm        |
| Grosor cáscara:         | 1.5 cm        |



### Características cuantitativas v cualitativas de la semilla

|                                 |             |
|---------------------------------|-------------|
| Peso semilla                    | 1.85 gramos |
| Porcentaje de peso de cotiledón | 88          |
| Longitud semilla:               | 2.62 cm     |
| Ancho semilla:                  | 1.47 cm     |
| Grosor semilla                  | 1.17 cm     |



### Características agronómicas del clon

|                                      |      |
|--------------------------------------|------|
| Número promedio de frutos/árbol/año: | 33   |
| Índice de fruto:                     | 14.8 |
| Índice semilla:                      | 1.85 |



## Caracterización morfoagronómica

|                      |                                 |
|----------------------|---------------------------------|
| Identificación:      | SPA 9                           |
| Tipo:                | clon                            |
| Procedencia:         | El CATIE, Turrialba, Costa Rica |
| Origen:              | Colombiano                      |
| Tipo genético:       | forastero Amazónico             |
| Referencia genética: | no tiene                        |

### Características cuantitativas y cualitativas del fruto

|                         |               |
|-------------------------|---------------|
| Peso fruto:             | 565.69 gramos |
| Peso cáscara+raquis:    | 418.33 gramos |
| Peso semillas+mucílago: | 147.36 gramos |
| Largo fruto:            | 20.1 cm       |
| Diámetro fruto:         | 8.4 cm        |
| Grosor cáscara:         | 1.4 cm        |



### Características cuantitativas y cualitativas de la semilla

|                              |             |
|------------------------------|-------------|
| Peso semilla                 | 1.59 gramos |
| Porcentaje de peso cotiledón | 83          |
| Longitud semilla:            | 2.57 cm     |
| Ancho semilla:               | 1.22 cm     |
| Grosor semilla               | 0.86 cm     |



### Características agronómicas del clon

|                          |      |
|--------------------------|------|
| Numero frutos/árbol/año: | 74   |
| Índice de fruto          | 19.4 |
| Índice semilla           | 1.59 |



## 4 OBJETIVOS

### 4.1 General:

- Lograr la propagación y multiplicación del cacao (*Theobroma cacao L.*) a partir de explantes de yemas axilares, hojas y meristemos apicales por medio del técnica de cultivo *in vitro*.

### 4.2 Específico:

- Determinar la combinación de diferentes concentraciones de ANA + BAP en el medio de cultivo MS.
- Determinar la acción y efectividad del carbón activo para evitar la oxidación de explantes de cacao (*Theobroma cacao L.*).

## 5 HIPOTESIS.

Ho: La combinación de las concentraciones de 3 mg/lit de ANA + 1 mg/lit de BAP en medio de cultivo MS utilizando como antioxidante al carbón activo propiciará una mejor inducción de brotes y desarrollo radical en los explantes de cacao en la propagación *in vitro*.

Ha: Ninguna de las diferentes concentraciones de medios de cultivos propiciará inducción de brotes y desarrollo radical en los explantes de cacao en la propagación *in vitro* utilizando carbón activo como antioxidante.

## **6 MATERIALES Y MÉTODOS.**

### **6.1 Métodos**

#### **6.1.1 Tejido utilizado.**

De los clones de cacao (*Theobroma cacao L.*) EET 48, UF 668, ETT 95, UF 667, SPA 9, se utilizaron segmentos como yemas axilares o laterales, explantes de hojas, meristemo apical, a fin de obtener brote y posteriormente el enraizamiento del explante.

### **6.2 Preparación del material experimental en el campo.**

#### **6.2.1 Preparación de la planta donante de varetas**

Para la selección de plantas donantes se evaluaron las características agronómicas de cada clon, para posteriormente seleccionar las varetas porta yemas y realizar aplicaciones de fungicidas, bactericidas y acaricidas, con la finalidad de disminuir la incidencia de enfermedades, las aplicaciones se hicieron tres veces por semana durante un mes, para posteriormente hacer el corte de varetas porta yemas.

#### **6.2.2 Colecta del material**

La planta debe de ser vigorosa, con características agronómicas deseables (robusta, número de semillas por fruto (pocha), calidad del grano), se selecciona la rama bandera de la planta donadora del material vegetal, la cual es la primera rama en crecimiento del año, el material (vareta porta yemas) debe tener una edad media y estas son utilizadas en

el laboratorio como explantes. Una vez colectada la vareta porta yemas, se realiza una previa desinfección con detergente por el transcurso de tres minutos, posteriormente un lavado con cloro comercial al 30% y un lavado con agua destilada, para depositar las varetas en las soluciones de transporte.

### **6.2.3 Traslado del material**

El material fue trasladado en frascos de vidrio conteniendo soluciones desinfectantes compuestas por 0.3mg/200ml agrimicin, 0.2mg/200ml benomil, 1ml/200ml mitac, 0.4gr/200ml ácido cítrico y 0.3gr/200ml ácido ascórbico. Se depositaron los frascos en una hielera, esto para mantener una temperatura adecuada a las varetas porta yemas, para ser manipuladas en el laboratorio de cultivo de tejidos.

### **6.3 Fase de laboratorio**

Previo al traslado del material se realizó la preparación de los medios de cultivo tres días antes de la colecta del material (varetas por yemas). Teniendo las varetas en el laboratorio se les realizaron dos lavados con agua destilada y posteriormente se prepararon los explantes para realizar las siembras. A efectos de obtener las condiciones de asepsia, se trabajó en campanas de flujo laminar para extraer los explantes a partir de las varetas porta yemas. Luego de realizar la desinfección del material durante 4 minutos con hipoclorito de sodio (agua clorada comercial), y por 5 minutos alcohol al 40 % seguido por 3 a 4 enjuagues en agua esterilizada. Estos explantes se introdujeron en un tubo de ensayo conteniendo 10 ml del medio de cultivo.

#### **6.3.1 Preparación de medio de cultivos para brotes**

Los medios de cultivo preparados para la fase de inducción, se realizó por medio del protocolo del laboratorio de cultivo de tejidos vegetales y se le agregó 1 mg/lit de carbón y las dosis de los reguladores de crecimiento conforme lo demuestra el cuadro 1.

### 6.3.2 Preparación de medio para enraizamiento

Los medios de cultivo que se prepararon para esta fase fueron diferentes porcentajes y con diferentes concentraciones de AIA, ANA con la finalidad de obtener raíces de los brotes obtenidos.

### 6.4 Fase: Inducción de brotes

Los tratamiento evaluados fueron de 12 combinaciones de reguladores de crecimiento; ácido naftalenacético (ANA) y bencil aminopurina (BAP), en un medio de cultivo (MS) También se tuvo 1 testigo, 8 repeticiones de cada tratamiento y un explante de cada clon a utilizar ya que fueron 5, esto dando un total de 520 unidades experimentales.

**Cuadro 1.** Concentración y combinación de los reguladores de crecimiento ANA+BAP en medio de cultivo (MS).

| Medio basal | ANA mg/lt. | BAP mg/lt. | Tratamiento |
|-------------|------------|------------|-------------|
| MS          | 0.0        | 0.0        | Testigo     |
|             | 1.0        | 0.5        | T1          |
|             |            | 1.0        | T2          |
|             |            | 3.0        | T3          |
|             |            | 5.0        | T4          |
|             | 3.0        | 0.5        | T5          |
|             |            | 1.0        | T6          |
|             |            | 3.0        | T7          |
|             |            | 5.0        | T8          |
|             | 5.0        | 0.5        | T9          |
|             |            | 1.0        | T10         |
|             |            | 3.0        | T11         |
| 5.0         |            | T12        |             |

\*MS = Medio nutritivo de Murashige y Skoog.

## 6.5 Fase: Enraizamiento de brotes obtenidos.

Durante esta fase de deben de subcultivar los explantes que sobrevivan la FASE 1 que originen brotes (de procedencia axilar o adventicia) con varias hojas. En la base de cada hoja hay una yema que se desarrollará, luego será puesta en contacto con el medio de cultivo. Periódicamente estos nuevos brotes se deben subcultivar en un nuevo medio, mediante divisiones y resiembras en tubos de cultivo u otros recipientes adecuados. Estas operaciones se realizan en la cámara de flujo laminar o en un lugar aislado que nos permita mantener las condiciones de asepsia. De esta forma aumenta el número de plantas en cada repique o división de las plantas.

### 6.5.1 Medio de enraizamiento del explante.

Los brotes obtenidos durante la fase 1 se transfieren a un medio conteniendo diferentes concentraciones de auxinas. Algunas especies de plantas no necesitan pasar por esta etapa y emiten sus raíces en el mismo medio de cultivo donde desarrollan yemas nuevas, por lo tanto el proceso de multiplicación y enraizamiento transcurren en forma simultánea.

Los explantes que tengan una buena inducción de brotes se transfieren a frascos de vidrio que contengan 20 ml del medio de cultivo gelificado gelrite 2 gr/lt consiste en tres concentraciones de sales MS, 50%, 75%,100% y dos tipos de auxinas ANA 0.1 mg/lt, 0.3 mg/lt, 0.5 mg/lt. y AIA 0.1 mg/lt, 0.3 mg/lt, 0.5.

**Cuadro 2.** Concentración de auxina y concentración de sales MS.

| Tipo de Auxina | Concentración de auxina (mg/lt) | Concentración de sales MS (%) |
|----------------|---------------------------------|-------------------------------|
| AIA            | 0.1 mg/lt                       | 50%                           |
|                |                                 | 75%                           |
|                |                                 | 100%                          |
|                | 0.3 mg/lt                       | 50%                           |
|                |                                 | 75%                           |
|                |                                 | 100%                          |
|                | 0.5 mg/lt                       | 50%                           |
|                |                                 | 75%                           |
|                |                                 | 100%                          |

|     |           |      |
|-----|-----------|------|
| ANA | 0.1 mg/lt | 50%  |
|     |           | 75%  |
|     |           | 100% |
|     | 0.3 mg/lt | 50%  |
|     |           | 75%  |
|     |           | 100% |
|     | 0.5 mg/lt | 50%  |
|     |           | 75%  |
|     |           | 100% |

\*MS = Medio cultivo de Murashige y Skoog.

## 6.6 Diseño experimental

Se utilizó un diseño factorial completamente al azar, para la fase de inducción de brotes y en la fase de enraizamiento.

### 6.6.1 Modelo Factorial.

$$Y_{ijk} = U + A_i + B_j + A_{bij} + \beta_k + \Sigma_{ijk}$$

Donde:

$Y_{ijk}$  = Variable de respuesta asociada a la  $ijk$ -ésima unidad experimental

$U$  = Efecto de la media general

$A_i$  = Efecto del  $i$ -ésimo nivel del factor A

$B_j$  = Efecto del  $j$ -ésimo tratamiento

$A_{bij}$  = Interacción del  $i$ -ésimo nivel del factor A con el  $j$ -ésimo nivel del factor B

$\beta_k$  = Efecto del  $k$ -ésimo bloque

$\Sigma_{ijk}$  = Error experimental asociado a la  $ijk$ -ésima unidad

## **6.6.2 Unidad Experimental.**

1 Tubo de Ensayo

### **6.6.2.1 Variables de inducción de brotes.**

#### 1. No. de explantes vivos

Las yemas axilares se depositaron en rejillas o gradillas, sobre la campana de flujo laminar para realizar el conteo de explantes vivos, esto se realiza a los 8 días después de la siembra.

#### 2. Presencia de callo

Se colocaron los tubos de ensayo en gradillas, sobre la campana de flujo laminar y se realizó el conteo de los explantes con presencia de callo, a los 12 días después de la siembra.

#### 3. No. de brotes obtenidos

Los tubos de ensayo se colocaron en gradillas para realizar el conteo del número de brotes, estos datos se toman a los 15 días después de la siembra.

#### 4. Longitud de brote

Se colocan los brotes en cajas petri, sobre la cámara de flujo laminar y para la medición de la longitud de brotes se utiliza una regla que está pegada en la base de la camp. Se toma la medición desde la parte basal hacia el brote, para trasladarlos a la segunda fase.

### **6.6.2.2 Variables de enraizamiento de brotes**

- Número de raíces

Los ápices o microestacas se colocan en cajas petri, sobre la mesa de trabajo y se realiza el conteo del número de raíces por explante.

- Longitud de raíces

Los ápices o microestacas se colocan en cajas petri, sobre la mesa de trabajo y por medio de una regla se mide la longitud de raíz, desde la base del explante hacia las raíces, posteriormente se realiza un conteo de las raíces para obtener el promedio de las mismas, estas mediciones se hacen en rangos de 20 días.

## **6.7 Manejo del experimento**

El manejo incluyó en forma secuencial: preparación de medios de cultivo, obtención y desinfección de ápices de la planta donante de cacao, posteriormente la siembra de la unidad experimental.

### **6.7.1 Condiciones ambientales para la incubación**

Es conveniente que los cultivos sean incubados en ambientes controlados, por lo menos en lo que se refiere a la luz y a la temperatura. Las respuestas morfogénicas pueden ser alteradas por la temperatura de incubación, así como por la calidad, intensidad y duración de la luz.

Para propósitos generales se sugiere utilizar, en el establecimiento de los cultivos una fuente luminosa compuesta de lámparas fluorescentes (tipo luz de día) y lámparas incandescentes (tipo “bombilla 100 watts”), que brinden entre 1,000 y 4,000 lux de

iluminación. Recientemente se han estado utilizando lámparas especiales tipo “grow-green” y “agrolight”, que proporcionan una longitud de onda de mejor calidad (450-500 nm), para los explantes, pero su uso no es generalizado. Comúnmente se utiliza un ciclo de fotoperiodo de 16 horas de luz por ocho horas de oscuridad, existiendo algunas variantes como 12 hrs. /12 hrs. ó 18 hrs. / 6 hrs.

El fotoperiodo, la longitud de onda y la intensidad lumínica deben ser consideradas cuando se realiza el cultivo de tejidos. Cuando se adiciona al medio azúcar, se trata de suministrar al explante una fuente de carbono, ya que inicialmente tales explantes no están en capacidad de realizar fotosíntesis, inclusive en el caso de los callos, éstos pueden presentar un mejor conocimiento cuando se les coloca en completa oscuridad.

Sin embargo cuando se trata de morfogénesis, debe tenerse en cuenta la importancia de la luz. En varios cultivos como espárragos y tabaco, la ausencia de luz trajo como consecuencia la disminución o supresión total de brotes.

Cada especie requiere un determinado fotoperiodo para su crecimiento, y existe, además, un requisito determinado para el tipo de organogénesis que se pretende lograr.

## 6.8 Materiales.

### 6.8.1 Material de vidrio y de plástico

|            |                             |
|------------|-----------------------------|
| Baguetas   | Placas petri                |
| Beakers    | Pipetas de 1, 5, 10 y 25 ml |
| Erlenmeyer | Micropipeta 100 – 1000 ul   |
| Mecheros   | Frascos de plástico         |
| Probetas   | Plástico "food wrap".       |

### 6.8.2 Equipos

|                         |                                  |
|-------------------------|----------------------------------|
| Agitador magnético      | Estereoscopio                    |
| Autoclave               | Timer (Regulador de fotoperíodo) |
| Balanza analítica       | Termómetro de máxima y mínima    |
| Cámara de flujo laminar | Destilador                       |
| Cámara fotográfica      | Microondas                       |

### 6.8.3 Otros Materiales

|                |                      |
|----------------|----------------------|
| Agua destilada | Alcohol 70% y 96%    |
| Algodón        | Hipoclorito de sodio |
| Bisturí        | Espátula             |

## 7 RESULTADOS Y DISCUSION

### 7.1 Explantes de yemas axilares de cacao

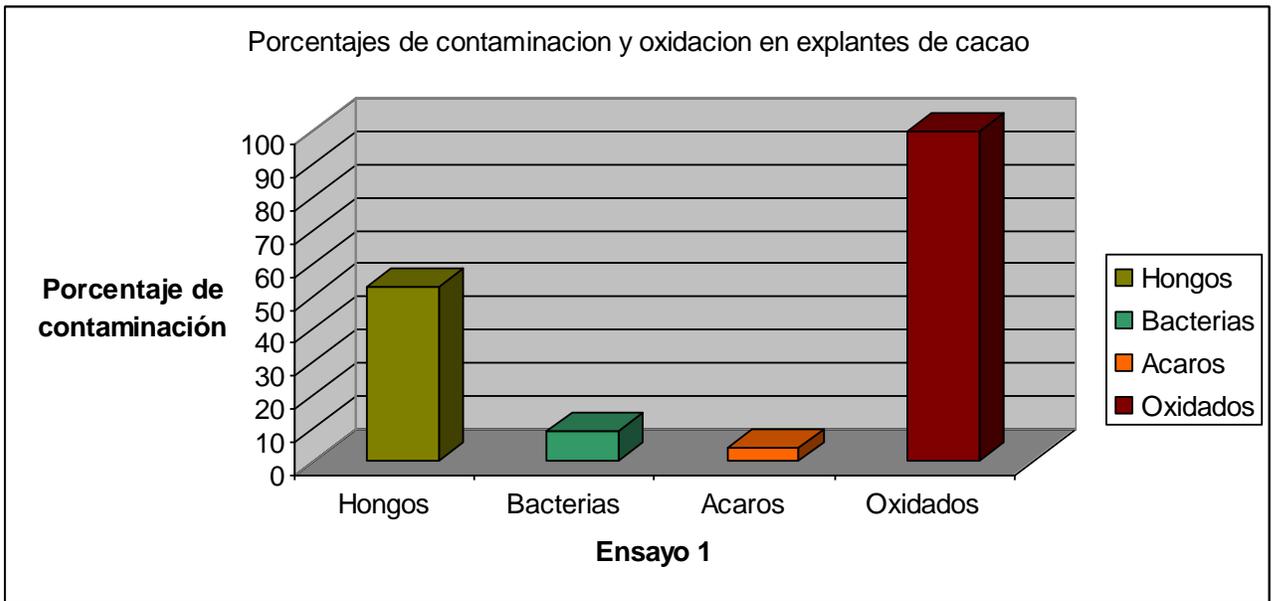
Los resultados del primer ensayo para inducción de brotes en yemas de cacao que se obtuvieron, se presentan en el cuadro 3. En este se puede observar que el medio de cultivo fue invadido por una alta contaminación de microorganismos: bacterias, hongos, ácaros y una severa reacción de oxidación del explante, lo que no permitió que se diera la brotación de nuevo tejido en los explantes de los clones de cacao.

Así mismo se determinó que los contaminantes que invadieron el medio de cultivo se consideraron que fueron trasladados desde el campo al laboratorio, estos microorganismos existen y viven en el jardín clonal por las condiciones ambientales del agrosistema.

**Cuadro 3.** Resultados del comportamiento de los clones de cacao en relación a la contaminación y oxidación (porcentaje) *in vitro* en el primer ensayo de explantes de yemas de cacao (*Theobroma cacao* L).

|                 |            | Unidad experimental (tubos de ensayo) |        |        |        |       |
|-----------------|------------|---------------------------------------|--------|--------|--------|-------|
| contaminación   | clones     | UF 667                                | UF 668 | EET 95 | EET 48 | SPA 9 |
| microorganismos | Bacterias% | 12                                    | 6      | 2      | 17     | 9     |
|                 | Hongos%    | 56                                    | 37     | 45     | 67     | 72    |
|                 | Ácaros%    | 4                                     | 6      | 1      | 3      | 5     |
| Reacción        | Oxidación% | 100                                   | 100    | 100    | 100    | 100   |

El cuadro anterior muestra el porcentaje de cómo fueron afectados los clones de cacao (explantes) inhibiendo el desarrollo de la inducción de brotes de las yemas axilares de cacao.



**Figura 5.** Resultados de contaminaciones y oxidaciones en yemas axilares de cacao expresados en porcentajes.

En la figura anterior se observa el porcentaje de contaminación para los medios de cultivo y los microorganismos que afectaron el ensayo número 1. Se puede notar que la incidencia de hongos fue bastante alta, debido a que los contaminantes se trajeron del jardín clonal.



**Figura 6.** Tubos conteniendo explantes de cacao presentando oxidación y contaminación de hongos y bacterias.

La figura 7 demuestra las contaminaciones que existieron al inicio de los ensayos, pero a medida que se realizaron las aplicaciones de productos químicos a la planta donadoras de varetas porta yemas, decreció en gran medida la incidencia de los microorganismos.

Como medida de prevención antes del proceso de colecta de nuevo material vegetativo (varetas porta yemas) se planificó un mes antes, realizar aplicaciones fitosanitarias, tres veces por semana de fungicida (Propinev - Iprovalicarb) 50cc/16lts, bactericida (estreptomycin - oxitetraciclina) 25 cc/lts y acaricida (Dimethoate) 25cc/16lts. en el área del jardín clonal de cacao.

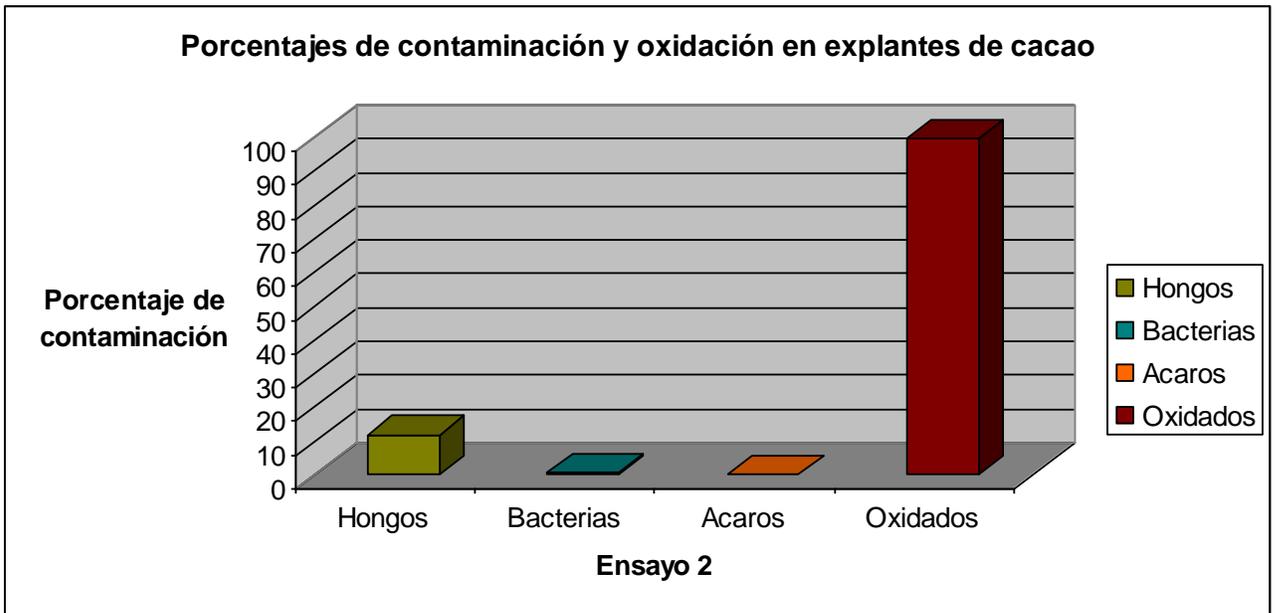
Después de haber controlado los microorganismos contaminantes pudimos observar, en un segundo ensayo, que el nivel de la población decreció en un buen porcentaje, tal como lo demuestra el siguiente cuadro.

**Cuadro 4.** Resultados de la segunda siembra para control de microorganismos que afectaron los explantes de cacao.

| contaminación   | Clones     | Unidad experimental (tubos de ensayo) |        |        |        |       |
|-----------------|------------|---------------------------------------|--------|--------|--------|-------|
|                 |            | UF 667                                | UF 668 | EET 95 | EET 48 | SPA 9 |
| microorganismos | Bacterias% | 2                                     | 3      | 0      | 0      | 0     |
|                 | Hongos%    | 12                                    | 17     | 8      | 19     | 15    |
|                 | Ácaros%    | 0                                     | 0      | 1      | 0      | 0     |
| Reacción        | Oxidación% | 100                                   | 100    | 100    | 100    | 100   |

El cuadro 4 indica los porcentajes de contaminaciones que existieron en el segundo ensayo y como fueron afectados los clones de cacao.

También se puede notar que las aplicaciones de productos químicos ayudaron en gran medida, ya que los porcentajes que se observan, comparados con el cuadro 3, demuestra que bajó la incidencia de los microorganismos presentes en las unidades experimentales que contenían yemas axilares de cacao.

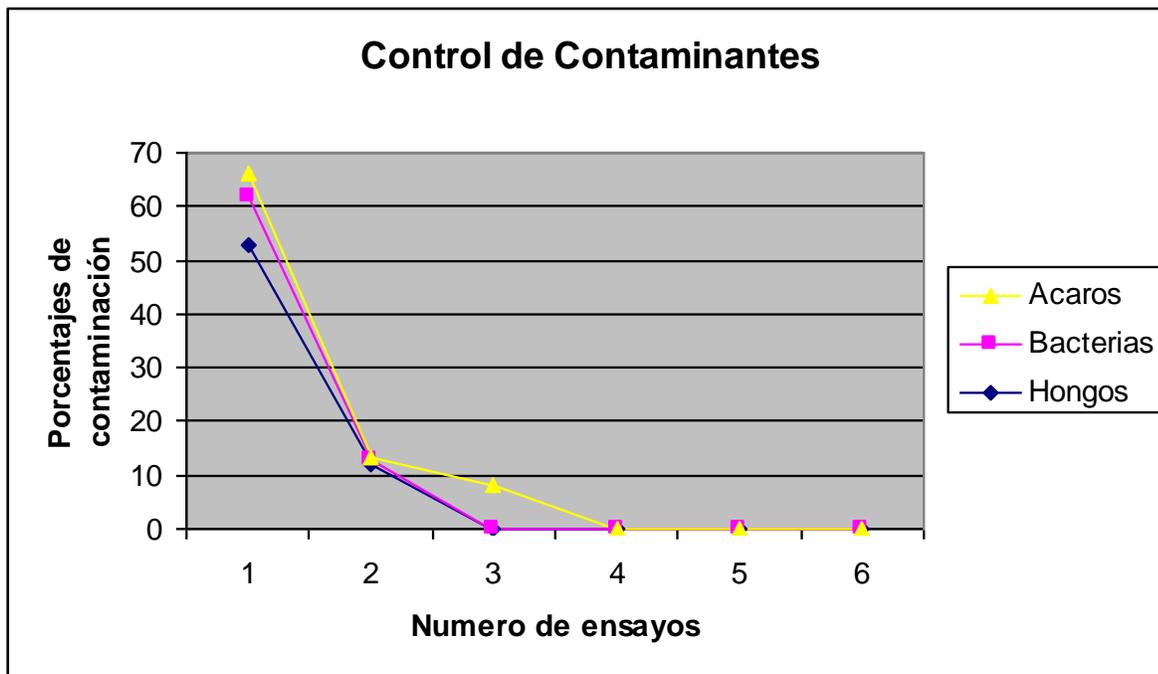


**Figura 7.** Resultado de porcentajes de unidades experimentales contaminadas en explantes de cacao

Se realizaron 6 siembras de explantes de cacao, en los cuales predominó la oxidación, así también existieron contaminaciones en los primeros ensayos. Las contaminaciones fueron controladas con aplicaciones de productos químicos a las plantas donadoras de varetas porta yemas.

Para las primeras se puede observar, en la grafica y figura siguiente, como estuvieron distribuidas las oxidaciones así como los contaminantes y el control que se tuvo para las siembras.

La siguiente figura demuestra como fue el comportamiento de los microorganismos controlados a partir del segundo ensayo.



**Figura 8.** Control de contaminantes en explantes de cacao (*Theobroma cacao* L.).

El control de los microorganismos que afectaron las varetas porta yemas fue satisfactorio debido a las aplicaciones de productos químicos antes de la colecta en el jardín clonal. Esto lo demuestra la figura anterior.



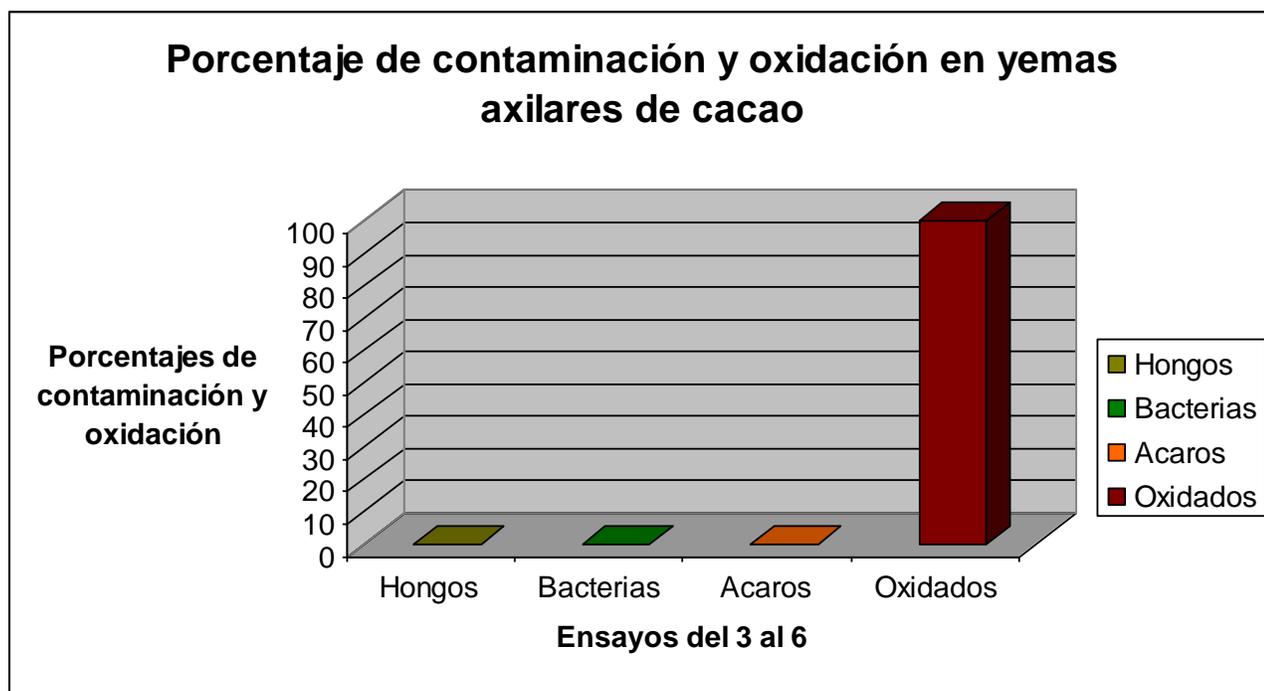
**Figura 9.** Explantes de cacao oxidados 5 días después de la siembra en medio MS sin carbón activo.

En la figura 9 sección A podemos observar el ensayo completo en medio de cultivo MS. En la sección B se observa un explante de yema axilar en medio MS, demostrando oxidación en virtud de que la planta de cacao es demasiado recalcitrante, debemos mencionar que la distancia del traslado del material vegetal de la planta donante fue factor determinante en la cual los explantes no pudieran reaccionar en los medios de cultivo, ya que perdieron lignina y ese pudo ser el problema de la oxidación.

**Cuadro 5.** Resultados de la última siembra en el ensayo de cacao para el control de microorganismos

|                 |            | Unidad experimental (tubos de ensayo) |        |        |        |       |
|-----------------|------------|---------------------------------------|--------|--------|--------|-------|
| Contaminación   | clones     | UF 667                                | UF 668 | EET 95 | EET 48 | SPA 9 |
| microorganismos | Bacterias% | 0                                     | 0      | 0      | 0      | 0     |
|                 | Hongos%    | 0                                     | 0      | 0      | 0      | 0     |
|                 | Ácaros%    | 0                                     | 0      | 0      | 0      | 0     |
| Reacción        | Oxidación% | 100                                   | 100    | 100    | 100    | 100   |

El cuadro anterior indica como se evitó la presencia de microorganismos que afectaron durante los primeros ensayos y como se anuló la incidencia de los mismos, pero si permaneció el oscurecimiento de los diferentes explantes y este factor fue el que inhibió la brotación de las yemas y otros explantes que se utilizaron a lo largo de la investigación.



**Figura 10.** Control de los microorganismos que afectan a los explantes de cacao (*Theobroma cacao L.*) expresados en porcentaje.

La figura 10 demuestra cómo fueron controlados los microorganismos desde el campo, hasta el manejo de los explantes en el laboratorio, tomando en cuenta las condiciones de asepsia con las que se debe manipular todo material vegetal cultivado *in vitro*.



**Figura 11.** Explantes sin respuesta y presentan oxidación, medio MS + Carbón activo.

En la figura 11 podemos observar el último ensayo de la siembra de yemas axilares (explantes) de cacao en medios de cultivo MS conteniendo carbón, se puede observar el necrosamiento de los explantes debido a la pérdida de lignina, lo que provoca que no se mantengan vigorosos los explantes.



**Figura 12.** Explante en medio de cultivo conteniendo carbón activo, sin evitar oxidación.

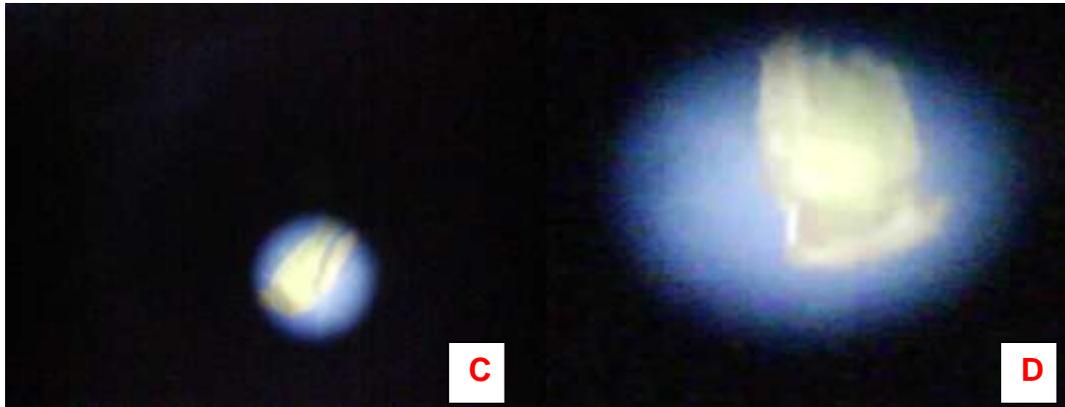
En la figura 12 se observa un explante con un grado de oxidación de 7 días después de ser cultivados en medios MS con carbón activo. Se percibe el oscurecimiento de los bordes y en gran parte el necrosamiento de la yema axilar.

## **7.2 Explantes de hoja de cacao**

En el ensayo de explantes de hojas de cacao no se obtuvieron resultados satisfactorios debido a que en las plantas cultivadas en medios de cultivo el tejido regenerativo de los bordes presentó necrosis, y esta fue una de las limitantes principales a lo largo de los ensayos realizados.

### 7.3 Explantes de meristemos apicales de cacao

En las figuras 12 C y 12 D, se observa el aislamiento de meristemos de cacao a través del estereoscopio, a observándolos a 45x y la utilizando ácido cítrico en la campana de flujo laminar antes de ser cultivados dentro de los tubos de ensayo conteniendo carbón activo.



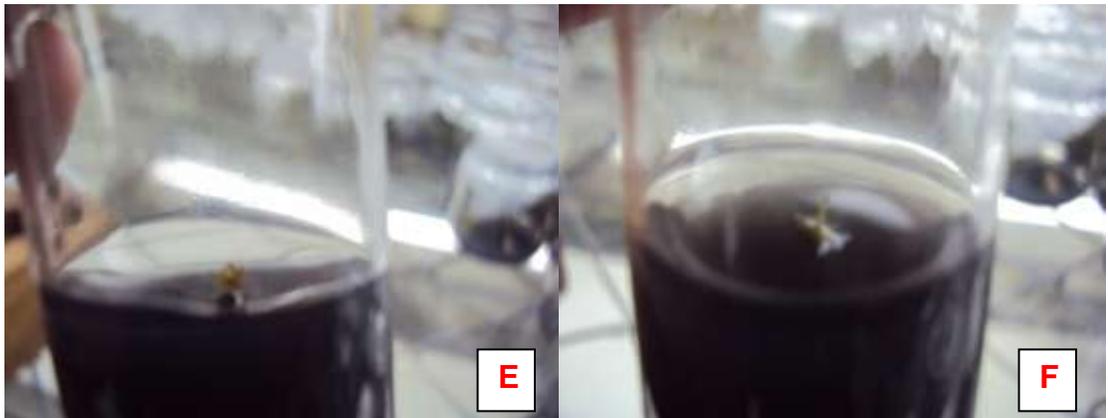
**Figura 13.** C. Meristemo de cacao (*Theobroma cacao* L.). D. Meristemos que fueron depositados dentro de los tubos de ensayo conteniendo medios de cultivo más carbón activo.

En las figuras anteriores se puede observar dos meristemos los cuales antes de ser cultivados en los tubos de ensayo, presentaban un leve necrosamiento en las partes basales.



**Figura 14.** Meristemo cultivado en medio MS + carbón activo.

La figura 14 demuestra un meristemo apical cultivado en un medio de cultivo MS conteniendo carbón activo, y presentando en el borde superior un leve oscurecimiento indicando la oxidación que se presentó a lo largo de la investigación.



**Figura 15.** Demostrando la oxidación de los meristemos de cacao, se observan partes necróticas en la figura E así como en la figura F.

En las figuras 15 E y F se puede observar unas leves necrosis en los bordes de los meristemos de cacao, esto ocurrió 2 días después de haber sido sembrados.



**Figura 16.** Meristemo totalmente oxidado después de 25 días de sembrado.

Los resultados obtenidos a lo largo de los ensayos no fueron satisfactorios, debido a que el tejido de plantas de cacao, es considerado recalcitrante para la brotación de nuevo tejido, asociado a esto por el periodo de transportación del material vegetal, llega al laboratorio deshidratado y con poco vigor, independiente del tipo de tejido que se utilice.

El establecimiento del cultivo *in vitro* de tejidos vegetales de algunas plantas leñosas está en gran medida limitado por el oscurecimiento en los explantes y en el medio de cultivo. Esto constituye uno de los problemas más serios y frecuentes, desde el inicio y durante el mantenimiento de un tejido cultivado *in vitro*.

#### **7.4 Fase de enraizamiento**

No se logró llegar a la fase de enraizamiento debido a que nunca se pudo superar la fase de inducción de brotes, ya que siempre predominó la oxidación. Este fue el factor determinante para que el material se desarrollara en los medios de cultivo.

## 8 CONCLUSIONES

Se acepta la hipótesis alterna planteada, ya que al realizar ensayos con diferentes combinaciones de reguladores de crecimiento en medio de cultivo MS + carbón activo no permitió tener una inducción de brotes y enraizamiento de los explantes de cacao.

Se trabajó en propagar y reproducir el cultivo de cacao por medio de la técnica de cultivo *in vitro*, pero existieron limitantes como: (a) contaminaciones de microorganismos, (b) oxidación del material vegetal. (c) tiempo de traslado del material vegetal

En el control de contaminaciones se realizó un proceso de protección vegetal (aspersiones de productos químicos) a las plantas donadoras del material vegetal para reducir la incidencia de microorganismos.

Para la oxidación se utilizó 1 y 1.5 mg/lit de carbón activo en el medio de cultivo para la inhibición del oscurecimiento de los explantes de cacao dando esto resultados insatisfactorios debido al alto grado de oxidación que el explante presentó durante el desarrollo de la investigación.

Otro factor importante en el proceso de oxidación fue el periodo de colecta, traslado y siembra, debido a que transcurrió un lapso de 36 horas para realizar la primera siembra y se redujo a un periodo mínimo de 6 horas, se considera que este fue el factor fundamental para que no brotaran los explantes por que se obtuvo el 100% de los explantes oxidados.

Los clones del jardín clonal están en una fase de senescencia, por lo que el tejido vegetal no responde a la totipotencia.

## 9 RECOMENDACIONES

Para lograr resultados satisfactorios en cuanto a la formación de brotes e inducción de raíces en cultivo *in vitro* a partir de los materiales del jardín clonal, se recomienda: Reducir el tiempo de corte de las varetas porta yemas y el tiempo de siembra de los explantes a utilizar. La renovación de la plantación del jardín clonal para garantizar la viabilidad y vigorosidad de este material.

Establecer un laboratorio de cultivo de tejidos con las condiciones mínimas, en el Centro de Agricultura Tropical Bulbuxyá (CATBUL), con el fin de evitar la oxidación que pueda sufrir el material vegetal con el traslado de la finca hacia el laboratorio de cultivo de tejidos vegetales de la Facultad de Agronomía, situado en ciudad de Guatemala.

Dentro del programa de protección vegetal del CATBUL se recomienda implementar un programa de protección eficiente en cacao sobre la base de los estudios realizados en 20 años de la plantación con el propósito de garantizar que el material vegetal este exento de microorganismos. Cuando se realicen investigaciones de biotecnología en cacao, se recomienda, antes de iniciar el proceso de recolección del material vegetal que se realicen aplicaciones puntuales de fungicidas, bactericidas y acaricidas.

Será necesario hacer aplicaciones de productos químicos para reducir la incidencia de patógenos realizando aplicaciones 3 veces por semana durante un mes para garantizar que el material vegetal este exento de microorganismos.

## 10 BIBLIOGRAFÍA

1. Adriazola, DJ. 2003. Producción del alimento de los dioses (*Theobroma cacao* L.) Perú, Universidad Nacional Agraria de la Selva Tingo María. 81 p.
2. 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.
3. Astorga, C. 2001. Mejoramiento genético. *In* Semana Científica CATIE: mejoramiento genético y conservación de cultivos agrícolas y especies forestales (201, CR). Memorias. Costa Rica, CATIE. p. 51–59.
4. Baker, W. 1891. The chocolate plant (*Theobroma cacao*) and its products. Cambridge, England, Jhon Wilson. 164 p.
5. Barahona, J. 1987. Manual del cultivo del cacao. Quevedo, Ecuador, INIAP. 109 p.
6. Bowers, JH; Baule, BA. 2001. The impact of plant diseases on world chocolate production. US, American Phytopathological Society. p. 1–28.
7. Braudeau, J. 1970. El cacao. Barcelona, España, Blume. 297 p. (Colección Agricultura Tropical).
8. Crisci, JV. 1983. Introducción a la teoría y práctica de la taxonomía numérica. Estados Unidos, OEA. p. 10-45. (Serie Biología, Monografía 26).
9. Elhag, H; Whipkey, A; Janick, J. 1988. Factors affecting asexual embryogenesis via callus in *Theobroma cacao* L. *Agril. Biol. Sci.* 6(1):31-43.
10. Eskes, B. 2001. Introductory notes. *In* International Workshop on New Technologies and Cocoa Breeding (2001, MY). Proceedings. Malaysia, Ingenic. 190 p.
11. FONCACAO (Fondo Nacional del Cacao, VE). 1994. Situación actual y perspectivas del sector cacaotero nacional. Venezuela. 29 p.

12. García, EG. 1997. Propagación clonal de plantas de cacao (*Theobroma cacao*) a partir de microesquejes cultivados *in vitro*. Venezuela, Universidad Central de Venezuela, Facultad de Ciencias. 54 p.
13. García Paiz, HA. 1984. Caracterización agronómica de las selecciones guatemaltecas de cacao (*Theobroma cacao*). Tesis Ing. Agr. Guatemala, USAC, Facultad de Agronomía. 85 p.
14. Gatica, MB. 1994. Caracterización agromorfológica de 13 híbridos y 7 clones de cacao (*Theobroma cacao* L.) en el Centro de Agricultura Tropical "Bulbuxya", San Miguel Panán, Suchitepéquez, Guatemala. Tesis Ing. Agr. Guatemala, USAC. 77 p.
15. González, A; Raisman, J; Aguirre, MA. 1999. Hormonas de plantas (en línea). Córdoba, Argentina, Universidad de Córdoba, Facultad de Ciencias Exactas. Consultado 14 ago 2008. Disponible en <http://www.efn.uncor.edu/dep/biologia/intrbiol/auxinas.htm>
16. Gray, D. 2000. Nonzygotic embryogenesis. In Trigiano, R; Gray, D. eds. Plant tissue culture concepts and laboratory exercises. US, CRC Press. p. 175–190.
17. Hardy, F. 1961. Manual de cacao. Turrialba, Costa Rica, IICA. 380 p.
18. Hess, O. 1990. Cocoa production technology. US, The Pan American Development Foundation Cocoa Rehabilitation & Development Project. 176 p.
19. INGENIC, MY. 2001. Proceedings of the international workshop on new technologies and cocoa breeding. Malasia. 190 p.
20. ITC (International Trade Centre, GV). 2001. Cocoa: a guide to trade practices. Geneva. 180 p.
21. Krikorian, A. 1991. Propagación clonal *in vitro*. In Roca, W; Mroginski, LA eds. Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones. Colombia, CIAT. p. 91-125.

22. Lanaud, C; Montemayor, JC; Risterucci, AM. 2000. Implications of new insight into the genetic structure of *Theobroma cacao* L. for breeding strategies. *In* International workshop on new technologies and cocoa breeding (2000, MY). Proceedings. Kota Kinabalu, Malaysia, Ingenen. p.115.
23. Lass, R. 1985. Diseases cocoa. London, Longman. p. 265-365.
24. León, J. 2000. Botánica de los cultivos tropicales. 3 ed. San José, Costa Rica, IICA. 678 p.
25. Litz, R; Jarret, R. 1991. Regeneración de plantas en el cultivo de tejidos: embriogénesis somática y organogénesis. *In* Roca, W; Mroginski, LA eds. Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones. Colombia. CIAT. p. 111-120.
26. López Báez, O; Evans, MH; Esponda Gálvez, M; Ortiz, MA; Hernández, B; Fontanel, A; Fraire G. 2000a Progresos recientes en la propagación vegetativa. *In* Congreso Venezolano del Cacao y su Industria (1, 2000, VE). Resúmenes de Memorias. Venezuela, FundaCITE. p. 124-126.
27. López Báez, O; Moreno, JL; Pacheco Rodas, S. 2000b. Avances en Propagación de cacao *Theobroma cacao* por embriogénesis somática en México. *In* International Workshop on New Technologies and Cocoa Breeding (2000, MY). Proceedings. Kota Kinabalu, Malasia, Ingenic. p. 163-176.
28. Monterroso, D; García, E; Enriquez, M. s.f. Estudio de la bioecología del cacao y selección de clones élite en función de sus características agronómicas y calidad del grano para incrementar la productividad del sistema. Guatemala, Proyecto AGROCYT 02-2005. (en preparación).
29. Moreno, L; Cadavid, S; Cubillos, G; Sánchez, J. 1983. Manual para el cultivo del cacao. Colombia, Compañía Nacional de Chocolates. 151 p.
30. Mossu, G. 1990. Le cacaoyer : le technicien dágriculture tropicale. País, Francia, Institut de Recherches de Cafe et du Cacao 159 p.
31. Navas, H; Petra, B. 1999. Propagación "*in vitro*" del cacao (*Theobroma cacao* L.). Tesis Ing. Agr. Venezuela, Universidad Central de Venezuela, Facultad de Agronomía. 75 p.

32. Reinert, J. 1958. Morphogenese and ihre kontrolle an gewebekulture aus karotten. *Natureswissenschaften* 45:344–345.
33. SAGARPA (Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, MX). 2008. Mercado internacional del cacao. México. 19 diapositivas.
34. Salisbury, F; Rossi, LW. 1978. Fisiología vegetal. Estados Unidos, Universidad de Utha. 421 p.
35. Saunders, J; Hemeida, A; Mischke, S. 2000 USDA DNA fingerprinting programme for identification of *Theobroma cacao* accessions. *In* Internacional Workshop on New Technologies and Cocoa Breeding (2000, MY). Proceedings. Malaysia, Inger. p. 108–114.
36. Simposio nacional sobre cultivo de tejidos vegetales (1, 1996, GT). Memoria. Guatemala, Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícolas / Cuerpo de Voluntarios de Japón. 129 p.
37. Smyth, AJ. 1967. Selección de suelos para cacao. Roma, Italia, FAO. Boletín sobre Suelos no. 5, 77 p.
38. Soberanis, W; Ríos, R; Arévalo, E; Zúñiga, L; Cabezas, O; Krauss, U. 1999. Increased frequency of phytosanitary pod removal in cacao (*Theobroma cacao*) increases yield economically in eastern Perú. *Crop Protection* 18(10):677-685.
39. Steward, F; Mapes, M; Mears, K. 1958. Growth and organized development of cultured cells: II organization in cultures growth from freely suspended cells. *Am. J. Bot.* 45:704-708.
40. Sutton, B. 2002. Commercial delivery of genetic improvement to conifer plantation using somatic embryogenesis. *Annals of Forestry Science* 59:657–661.
41. Toxopeus, H. 1985. Botany, types and population. *In* Wood, GAR; Lass, RA. 1985. *Cocoa*. New York, US, Longman. p. 11-37.

42. Urquhart, D. 1963. Cacao. Turrialba, Costa Rica, IICA. 322 p.
43. Villalobos, V; Aguilar ME. 1990. Plant regeneration of cacao (*Theobroma cacao* L.) by micro-grafting somatic embryos. *In* Int. Congr. Plant Tissue and Cell Culture (7, 1990, NL). Abstracts. Amsterdam, Assoc. for Plant Tissue Culture. 140 p.
44. Vera, J. 1987. Material de siembra y propagación. *In* Suarez, C. ed. Manual del cultivo del cacao. Quevedo, Perú, INIAP, Programa Nacional del Cacao. p. 16-26.
45. Wilkinson, M. 2001. The applications and constraints of new technologies in plant breeding. *In* International Workshop on New Technologies and Cocoa Breeding (2001, MY). Proceedings. Malasia, Ingenic. p. 12-23.
46. Wood, GAR; Lass RA. 1985. Cacao. 4 ed. New York, US, Longman. 620 p.

## 11 ANEXOS.

Composición de algunos medios de cultivo ampliamente utilizados en Cultivo de Tejidos de plantas. (Concentraciones en mg/L)

| COMPONENTES  | MEDIOS |        |      |        |      |      |
|--|--------|--------|------|--------|------|------|
|  | WHITE  | HELLER | MS   | NITSCH | B5   | KM   |
| <b>MACRONUTRIENTES</b>                                 |        |        |      |        |      |      |
| Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 4 H <sub>2</sub> O | 300    | -      | -    | -      | -    | -    |
| NaNO <sub>3</sub>                                      | -      | 600    | -    | -      | -    | -    |
| NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>                        | -      | -      | 1650 | 720    | -    | 600  |
| (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>        | -      | -      | -    | -      | 134  | -    |
| KNO <sub>3</sub>                                       | 80     | -      | 1900 | 950    | 2500 | 1900 |
| CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O                 | -      | 75     | 440  | -      | 150  | 600  |
| CaCl <sub>2</sub>                                      | -      | -      | -    | 166    | -    | -    |
| MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O                 | 720    | 250    | 370  | 185    | 250  | 300  |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                        | -      | -      | 170  | 68     | -    | 170  |
| Kcl  | 65     | 750    | -    | -      | -    | 300  |
| Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>                        | 200    | -      | -    | -      | -    | -    |
| NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O    | 19     | 125    | -    | -      | 150  | -    |
| <b>MICRONUTRIENTES</b>                                 |        |        |      |        |      |      |
| MnSO <sub>4</sub> · 4 H <sub>2</sub> O                 | 7.0    | 0.1    | 22.3 | 25.0   | -    | -    |
| MnSO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O                   | -      | -      | -    | -      | 10.0 | 10.0 |
| ZnSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O                 | 3.0    | 1.0    | 8.6  | 10.0   | 2.0  | 2.0  |
| H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>                         | 1.5    | 1.0    | 6.2  | 10.0   | 3.0  | 3.0  |
| KI   | 0.75   | 0.01   | 0.83 | -      | 0.75 | 0.75 |

|   |     |       |         |       |       |       |
|---|-----|-------|---------|-------|-------|-------|
| Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O | -   | -     | 0.25    | 0.25  | 0.25  | 0.25  |
| CuSO <sub>4</sub>                                     | -   | -     | -       | 0.25  | 0.025 | -     |
| CuSO <sub>4</sub> · 5 H <sub>2</sub> O                | -   | 0.03  | 0.025   | 0.025 | 0.025 | 0.025 |
| CoCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O                | -   | -     | 0.025   | -     | 0.025 | 0.025 |
| AlCl <sub>3</sub>                                     | -   | 0.03  | -       | -     | -     | -     |
| NiCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O                | -   | 0.03  | -       | -     | -     | -     |
| <b>FE – EDTA</b>                                      |     |       |         |       |       |       |
| Na <sub>2</sub> EDTA · 2H <sub>2</sub> O              | -   | -     | 37.3    | 37.3  | -     | -     |
| FeSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O                | -   | -     | 27.8    | 27.8  | -     | -     |
| Fe <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub>       | 2.5 | -     | -       | -     | -     | -     |
| Fe <sub>3</sub> Cl <sub>3</sub> · 6 H <sub>2</sub> O  | -   | 1.0   | -       | -     | -     | -     |
| <b>COMPUESTOS ORGANICOS</b>                           |     |       |         |       |       |       |
| Glicina   | 3.0 | -     | 2.0     | 2.0   | -     | -     |
| Ac. nicotínico  | 0.5 | -     | 0.5     | 0.5   | 1.0   | 1.0   |
| Piridoxina HCl  | 0.1 | -     | 0.5     | 0.5   | 1.0   | 1.0   |
| Tiamina - ClH   | 0.1 | -     | 0.1     | 0.5   | 10.0  | 1.0   |
| Acido Fólico  | -   | -     | -       | 0.5   | -     | -     |
| Mioinositol   | -   | 100.0 | 100.0   | 100.0 | 100.0 | 100.0 |
| Biotina   | -   | -     | -       | 0.5   | -     | 0.01  |
| Sacarosa (g/L)  | -   | -     | 30      | -     | 20    | -     |
| PH  | 5.5 |       | 5.7-5.8 | 5.5   | 5.5   | 5.6   |

White(1943); Heller (1953); MS: Murashige y Skoog(1962); Nitsch y Nitsch(1969); B5: Gambourg et al(1968); Kao y Michayluk(1975).

Principales fitohormonas utilizadas en cultivo de tejidos de plantas y sus pesos moleculares.

| CLASE       | Abreviatura     | Nombre químico   | PM    |
|-------------|-----------------|--|-------|
| AUXINAS     | AIA             | Acido 3 - indolacético                                 | 175.2 |
|             | ANA             | Acido naftalenoacético                                 | 186.2 |
|             | AIB             | Acido indolbutírico                                    | 203.2 |
|             | CPA             | Acido (4-clorofenoxi)acético                           | 208   |
|             | 2,4 D           | Acido 2,4 diclorofenoxiacético                         | 221.0 |
|             | Picloram        | Acido 4 amino 3,5,6, triclóropicolínico                | 241.5 |
|             | NOA             | Acido naftoxiacético                                   | 202.2 |
| CITOCININAS | KIN             | 6 furfúril aminopurina kinetina                        | 215.2 |
|             | BAP             | 5 bencil aminopurina                                   |       |
|             | (BA)            | 6 bencil adenina                                       | 225.2 |
|             | 2iP             | Isopenteniladenina                                     | 203.2 |
|             | Zea             | Zeatina (N6-(4 hidróxi 3 metilbut -2 enil) aminopurina | 219.2 |
|             | PBA             | (( 6 bencilamino) 9,2,tetrahidropiraniil-9,H-purina    | 300.0 |
| GIBERELINAS | AG <sub>3</sub> | Acido giberélico                                       | 364.4 |
| INHIBIDORES | ABA             | Acido Abscísico  | 264.3 |

Fitohormonas utilizadas para el cultivo de células vegetales

| CLASE       | REGULADOR       | CARACTERISTICA |
|-------------|-----------------|----------------|
| Auxinas     | AIA             | N              |
|             | ANA             | S              |
|             | 2,4 D           | S              |
| Citokininas | Zea             | N              |
|             | Zea-ribósido    | N              |
|             | KIN             | S              |
|             | BAP             | N              |
| Giberelinas | AG <sub>3</sub> | N              |

**N: Natural**

**S: Sintética**

Resumen de las principales fitohormonas empleadas en Cultivo de Tejidos y sus mayores efectos

| Fitohormonas  | Mayores efectos en C.T.   |
|---|---|
| <p><b>AUXINAS</b></p> <p>AIA: Ac. 3 – indolacético</p> <p>ANA: Ac naftalenacético</p> <p>AIB: Ac indol 3-butírico</p> <p>APA: Ac fenilacético</p> <p>2,4 D: Ac 2,4 diclorofenoxiacético</p> <p>2,4,5T: Ac 2,4,5 triclofenoxiacético</p> <p>Picloram</p> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Formación de raíces adventicias(a altas conc.)</li> <li>• Formación de brotes adventicios (a bajas conc.)</li> <li>• Inducción de embriones somáticos (embrioides) (en parte 2,4D)</li> <li>• División celular</li> <li>• Formación y crecimiento de callos</li> <li>• Inhibición del desarrollo de yemas axilares.</li> </ul> |

|  |   |
|--|---|
| <p>Dicamba</p> <p>ACP: Ac. clorofenoxiacético</p>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Inhibición del crecimiento de la raíz.</li> </ul>  |
| <p>CITOKININAS</p> <p>Z: Zeatina</p> <p>ZR: Ribosido de la Zeatina</p> <p>IP: isopenteniladenina</p> <p>IPA: isopenteniladenosina</p> <p>BAP: 6 bencilaminopurina</p> <p>KIN: 6 furfurilaminopurina</p> <p>TDZ: Thidiazuron</p> <p>CPPU: N(2-cloro-4piridil)N-fenil urea</p> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Formación de raíces adventicias (a altas conc.)</li> <li>• Inhibición de la formación de raíces.</li> <li>• División celular</li> <li>• Formación y crecimiento del callo.</li> <li>• Estimulación del desarrollo de yemas auxiliares.</li> <li>• Inhibición del alargamiento de los tallos</li> <li>• Inhibición de la senescencia de la hoja.</li> </ul> |
| <p>GIBERELINAS</p> <p>GA<sub>3</sub>: Ac. giberélico</p> <p>GA<sub>1</sub>, GA<sub>4</sub>, GA<sub>7</sub>: (giberelinas)</p>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Alargamiento del tallo</li> <li>• Ruptura de la dormancia de la semilla, embriones somáticos, yemas apicales y bulbos.</li> <li>• Inhibición de la formación de raíces adventicias</li> <li>• Regula la formación de tubérculos, cormos y bulbos.</li> </ul>   |
| <p>ETILENO</p>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Estimula la senescencia de las hojas</li> <li>• Estimula la maduración de los frutos</li> <li>• Promueve o inhibe la regeneración adventicia( en dependencia del tiempo de aplicación o del genotipo)</li> </ul>   |

|  |   |
|--|---|
| ACIDO ABSCISICO  | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Maduración de embriones somáticos</li> <li>• Facilita la aclimatación</li> <li>• Formación de bulbos y tubérculos</li> <li>• Promueve el desarrollo de la dormancia</li> </ul> |
| POLIAMINAS<br><br>Putrescina<br><br>Espermidina<br><br>Espermina | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Promueven la formación de raíces adventicias</li> <li>• Promueven la formación de brotes</li> <li>• Promueven la embriogénesis somática</li> </ul>                             |
| ACIDO JASMONICO (JA)<br><br>MeJa: METILJASMONATO                 | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Promueven la formación de bulbos y tubérculos</li> <li>• Estimula la formación de meristemas.</li> </ul>   |
| BRASINOESTEROIDES<br><br>Análogos Biobras 6<br><br>Biobras 16    | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Estimulan el desarrollo de callos de caña de azúcar</li> <li>• Favorecen recuperación de callos sometidos a estrés</li> </ul>  |
| OLIGOSACARINAS<br><br>Pectimorf: oligogalacturónido DPS (12-14)  | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Estimulan el desarrollo de callos de caña de azúcar</li> <li>• Estimulan el desarrollo de brotes de cítricos.</li> </ul>   |

Anexo PQ. Arreglo y distribución del Jardín clonal de Cacao (*Theobroma cacao* L).

| Pendiente del terreno ↓             | Colindancia, Área Bujilla (Plantación de cacao) |           |           |           |           |          |         |         |         |         |         |          | Pendiente del terreno ↓ |
|-------------------------------------|---|-----------|-----------|-----------|-----------|----------|---------|---------|---------|---------|---------|----------|-------------------------|
|                                     | (116-120)                                       | (121-123) | (111-115) | (106-110) | (101-105) | (96-100) | (91-95) | (86-90) | (81-85) | (76-80) | (71-75) | (66-70)  |                         |
| Plantación comercial                | V V V C   | C X X C   | C C C X   | C X C V   | C X V V   | C V C V  | C V C C | C X C V | V X C V | C V X C | V V V V | V V V C  |                         |
|                                     | C C V C   | C C X C   | X C C C   | X C V V   | V V X V   | V X C V  | C V V C | V C X V | C X V C | C V C V | C V V V | V V V V  |                         |
|                                     | V V V V   | X C X X   | C C X V   | V V X V   | V X C X   | V V X V  | V C V C | V V V V | V C V V | V X V V | C V V V | V C V C  |                         |
|                                     | X V V V   | X C X C   | C X V V   | V V V X   | V X V X   | V X C V  | C C C V | V C C V | C V V V | V V V X | X V V V | C V X V  |                         |
|                                     | X V V V   | C C V C   | C V V V   | V V V V   | V C V V   | V X C C  | X C V V | V V V V | V C V V | V V V V | V V V V | V V V C  |                         |
| V V C X                             | V V X V   | V V X V   | X X V X   | X V V V   | C V V V   | V V C V  | X V V X | V V V X | V V V X | C X V V | V V V C |          |                         |
| EET-96                              | EET-162   | EET-62    | EET-95    | SCA-6     | UF-296    | CC-18    | ICS-6   | UF-676  | UF-654  | EET-48  | Catongo |          |                         |
| V V X V                             | C C X X   | X V V C   | V X V V   | V V V V   | X V V V   | V V V V  | V V V V | X V X V | C V V V | X X V V | X V X V | V V V V  |                         |
| V V V V                             | C C X V   | V V V V   | V V V X   | V V V X   | V V V V   | V V V V  | V V V V | V V V V | V V V V | X V V V | V V V V | X V V V  |                         |
| X V V V                             | V V V V   | V C V V   | V V X V   | V C X V   | V V C C   | V V V V  | V V V V | V V V V | V V V V | V V V V | V V V V | V V V X  |                         |
| X V X V                             | C V V V   | V V V X   | V X X V   | V V V V   | V V V C   | V V X V  | V V V V | V C V V | V X X V | C V V V | V V X X | V V C X  |                         |
| X V V V                             | V V V V   | V V C V   | V V V V   | V V V V   | V V C V   | V V V V  | V V V V | V V V V | V V X C | X X V V | V C X V | V X V X  |                         |
| V V V X                             | V V V V   | V V V V   | V V V V   | C C V V   | C V V X   | V X V V  | V V V V | V V V V | C V X C | C X C V | V V V C | V C V V  |                         |
| (61-65)                             | (56-60)   | (51-55)   | (46-50)   | (41-45)   | (36-40)   | (31-35)  | (26-30) | (21-25) | (16-20) | (11-15) | (6-10)  | (1-5)    |                         |
| SCA-12                              | EET-399   | EET-400   | UF-12     | SPA-9     | UF-29     | UF-677   | UF-668  | POUND-7 | UF-667  | IMC-67  | UF-613  | POUND-12 |                         |
| Colindancia, Calle real de la finca |   |           |           |           |           |          |         |         |         |         |         |          |                         |
| Plantación de cacao                 |   |           |           |           |           |          |         |         |         |         |         |          |                         |

V árbol correspondiente al clon  
 C árbol de genética desconocida  
 X Espacio vacío, sin árbol  
 □ Puntos de muestreo

Fuente. Ing. Sergio García Batz.