



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

**TRABAJO DE TITULACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE
INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA**

**TEMA: MULTIPLICACIÓN DE PROEMBRIONES Y OBTENCIÓN DE EMBRIONES
SOMÁTICOS PRIMARIOS DE CINCO CLONES CERTIFICADOS DE CACAO FINO
DE AROMA (*Theobroma cacao* L.)**

AUTOR: CRIOLLO DELGADO, LUISA MARÍA

DIRECTOR: JADÁN GUERRERO, MÓNICA BEATRIZ PhD.

SANGOLQUÍ

2019



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERIA EN BIOTECNOLOGÍA

CERTIFICACIÓN

Certifico que el trabajo de titulación, “**MULTIPLICACIÓN DE PROEMBRIONES Y OBTENCIÓN DE EMBRIONES SOMÁTICOS PRIMARIOS DE CINCO CLONES CERTIFICADOS DE CACAO FINO DE AROMA (*Theobroma cacao L.*)**” fue realizado por la Srta. **Criollo Delgado, Luisa María** el mismo que ha sido revisado en su totalidad, analizado por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto cumple con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de Fuerzas Armadas ESPE, razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que lo sustente públicamente.

Sangolquí, 26 de junio del 2019

Firma:



Jadán Guerrero, Mónica Beatriz Ph.D.

C.C.1802278562



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD

Yo, *Criollo Delgado, Luisa María*, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: *“Multiplicación de proembriones y obtención de embriones somáticos primarios de cinco clones certificados de Cacao fino de Aroma (Theobroma cacao L.)”* es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Consecuentemente el contenido de la investigación mencionada es veraz.

Sangolquí, 26 de junio del 2019

Firma:

Luisa María Criollo Delgado

C.C.: 1313071878



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERIA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORIZACIÓN

Yo, Criollo Delgado Luisa María autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación: *“Multiplicación de proembriones y obtención de embriones somáticos primarios de cinco clones certificados de Cacao fino de Aroma (Theobroma cacao L.)”* en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Sangolquí, 26 de junio del 2019

Firma:

Luisa María Criollo Delgado

C.C.: 1313071878

DEDICATORIA

A Dios por llenar mi vida de bendiciones y brindarme cada día una nueva oportunidad para mejorar.

A mis padres, Dalton y Mirelly por su amor, apoyo y guía en cada uno de los objetivos que me he trazado a lo largo de mi vida.

A mis hermanas, Daniela y Madelyne por siempre estar a mi lado impulsándome a ser mejor persona, hermana y amiga.

A mi tía Amarilis, por siempre estar dispuesta a compartirme sus enseñanzas y guiarme en cada etapa de mi vida.

A mi mamita Gollita, por ser mi ángel, que desde el cielo me acompaña e ilumina mi camino.

AGRADECIMIENTO

A toda mi familia porque han estado siempre a mi lado apoyándome y guiándome en cada momento de mi vida. A mi mamá por darme palabras de aliento cada vez que me desanimaba, ser paciente conmigo, corregirme cuando lo necesitaba y más que nada ser esa persona que constantemente me repetía ten Fé y me recordaba que Dios siempre está conmigo.

A mi directora de Tesis Ph.D. Mónica Jadán por darme la oportunidad de ser parte del Laboratorio de cultivo de tejidos vegetales, compartirme su conocimiento y experiencia en el ámbito académico y humano, aconsejándome y orientándome a lo largo de la investigación.

A la Doctora Claudia Segovia por su confianza, apoyo y múltiples enseñanzas a nivel académico y personal.

A mis amigos Susy, Pris, Gaby, Andrés y Alex por brindarme su amistad y ser parte importante de mi vida universitaria.

A mis compañeros de laboratorio por los momentos compartidos y sus sabios consejos.

Gracias

Luisa Criollo

INDICE DE CONTENIDOS

CERTIFICACIÓN.....	i
AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD	ii
AUTORIZACIÓN.....	iii
DEDICATORIA.....	iv
AGRADECIMIENTO	v
INDICE DE CONTENIDOS	vi
ÍNDICE DE TABLAS.....	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	xii
RESUMEN	xv
ABSTRACT	xvi
CAPITULO 1	1
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	1
1.1 Antecedentes.....	1
1.2 Justificación e importancia del problema a resolver.....	2
1.3 Objetivos	4
1.3.1 Objetivo general del proyecto.....	4
1.3.2 Objetivos específicos.....	4
1.4 Hipótesis.....	4
1.5 Marco referencial.....	5
1.5.1 Cacao (<i>Theobroma cacao</i> L.).....	5
Origen y Distribución.	5
Clasificación Taxonómica	6
Características	7
Tipos de Cacao.....	7
Cacao criollo	7
Cacao Forastero.....	8
Cacao Trinitario	8

Cacao Nacional o Fino de aroma	9
Clon EET-95	11
Clon EET-96	11
Clon EET-103	12
Clon EET-575	12
Clon EET-576	13
Enfermedades que afectan al cultivo de cacao.....	13
Escoba de bruja	13
Moniliasis.....	15
Mal de machete	15
1.5.2 Cultivo <i>in vitro</i>	17
Generalidades.....	17
Embriogénesis somática	18
Suspensiones celulares	19
Métodos para medir el crecimiento celular.....	20
CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS	22
2.1 Fase de Campo	22
2.2 Fase de Laboratorio.....	24
Instrumental	24
Medios de cultivo	25
2.2.1 Desinfección de explantes florales de <i>Theobroma cacao</i> L.....	25
2.2.2 Inducción de callo primario.....	28
2.2.3 Multiplicación de callo secundario.....	31
2.2.4 Desarrollo de proembriones y embriones somáticos	32
2.2.5 Multiplicación de proembriones	35
CAPÍTULO 3: RESULTADOS	38
3.2 Inducción de callo.....	42
3.3 Obtención Proembriones y embriones somáticos primarios.....	49
3.4 Multiplicación de proembriones.....	61
CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN	67
4.1 Desinfección de explantes florales de <i>Theobroma cacao</i> L.	67
4.2 Inducción de callo	68
4.3 Obtención Proembriones y embriones somáticos primarios.....	70

4.4 Multiplicación de proembriones	74
CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES.....	77
CAPÍTULO 6: RECOMENDACIONES.....	79
CAPÍTULO 7: BIBLIOGRAFÍA.....	80

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. <i>Clasificación taxonómica del cacao fino de aroma.....</i>	6
Tabla 2. <i>Clones e Híbridos de Sabor Nacional Arriba recomendados por el INIAP para el Ecuador.</i>	9
Tabla 3. <i>Tratamientos para la fase de desinfección de botones florares de Theobroma cacao L.</i>	26
Tabla 4 <i>Medio de cultivo para la inducción a callo de Theobroma cacao</i>	29
Tabla 5. <i>Tratamientos para la fase de inducción de callo (Theobroma cacao L.).</i>	30
Tabla 6. <i>Evaluación de la variable porcentaje de formación de callo.....</i>	30
Tabla 7. <i>Medio de cultivo para la multiplicación de callo de Theobroma cacao L.</i>	32
Tabla 8.. <i>Medio de cultivo para el desarrollo de proembriones y embriones somáticos primarios de Theobroma cacao L.</i>	33
Tabla 9. <i>Tratamientos para la fase de desarrollo de proembriones y embriones somáticos primarios (Theobroma cacao L.).</i>	33
Tabla 10. <i>Evaluación de la variable porcentaje de formación de proembriones</i>	34
Tabla 11. <i>Tratamientos para la fase de multiplicación de proembriones de Theobroma cacao L.</i>	35
Tabla 12. <i>Resultados de las variables analizadas en la etapa de desinfección de los clones de cacao fino de aroma EET-95, EET-96, EET-103, EET-575 y EET-576.</i>	38
Tabla 13. <i>Pruebas estadísticas realizadas a los resultados obtenidos en la etapa de desinfección de los clones de cacao EET-95, EET-96, EET-103, EET-575 Y EET-576.</i>	41

Tabla 14. <i>Pruebas de Kruskal Wallis realizada a los resultados obtenidos de la variable contaminación fúngica de los clones de cacao EET-95, EET-96, EET-103, EET-575 Y EET-576.</i>	42
Tabla 15. <i>Resultados de las variables analizadas en la etapa de inducción de callo de los clones de cacao fino de aroma EET-95, EET-96, EET-103, EET-575 y EET-576.</i>	44
Tabla 16. <i>Tabla de contingencia para la variable porcentaje de formación de callo de los clones de cacao fino de aroma EET-95, EET-96, EET-103, EET-575 y EET-576.</i>	46
Tabla 17. <i>Pruebas estadísticas realizadas a los resultados obtenidos en la etapa de inducción de callo de los clones de cacao EET-95, EET-96, EET-103, EET-575 Y EET-576.</i>	47
Tabla 18. <i>Pruebas de Kruskal Wallis realizada a los resultados obtenidos de las variables presencia de callo y porcentaje de formación de callo de los clones de cacao EET-95, EET-96, EET-103, EET-575 Y EET-576.</i>	48
Tabla 19. <i>Resultados de las variables analizadas en la etapa de inducción de los clones de cacao fino de aroma EET-95, EET-96, EET-103, EET-575 y EET-576.</i>	50
Tabla 20. <i>Tabla de contingencia para la variable porcentaje de formación de proembriones de los clones de cacao fino de aroma EET-95, EET-96, EET-103, EET-575 y EET-576</i>	52
Tabla 21. <i>Pruebas estadísticas realizadas a los resultados obtenidos en la etapa de obtención de proembriones de los clones de cacao EET-95, EET-96, EET-103, EET-575 y EET-576.</i>	54
Tabla 22. <i>Pruebas de Kruskal Wallis realizada a los resultados obtenidos de las variables presencia de proembriones y porcentaje de formación de proembriones de los clones de cacao EET-95, EET-96, EET-103, EET-575 Y EET-576.</i>	55

Tabla 23. <i>Resultados de las variables analizadas en la etapa de inducción de los clones de cacao fino de aroma EET-95, EET-96, EET-103, EET-575 y EET-576.</i>	57
Tabla 24. <i>Resumen de medidas estadísticas para la variable número de embriones somáticos respecto a los clones de cacao fino de aroma EET-95, EET-96, EET-103, EET-575 y EET-576.</i>	59
Tabla 25. <i>Pruebas estadísticas realizadas a los resultados obtenidos en la etapa de obtención de embriones de los clones de cacao EET-95, EET-96, EET-103, EET-575 y EET-576.</i>	60
Tabla 26. <i>Pruebas de Kruskal Wallis realizada a los resultados obtenidos de la variable número de callos con embriones de los clones de cacao EET-95, EET-96, EET-103, EET-575 Y EET-576.</i>	61
Tabla 27. <i>Datos de volumen de células de sedimentadas (%) de los clones de cacao fino de aroma EET-95, EET-96, EET-103, EET-575 y EET-576.</i>	62
Tabla 28. <i>Pruebas estadísticas realizadas a los resultados obtenidos en la etapa de multiplicación de proembriones de los clones de cacao EET-95, EET-96, EET-103, EET-575 Y EET-576.</i>	65
Tabla 29. <i>Prueba medias de Turkey para la variable volumen de sedimentación celular de los clones de cacao EET-95, EET-96, EET-103, EET-575 Y EET-576.</i>	66

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Sitios arqueológicos en México, América central y Sur América donde se ha encontrado la evidencia más temprana del uso de <i>Theobroma cacao</i> (Zarrillo et al., 2018). ..5	5
Figura 2. (A) Árbol infectado con síntomas de WBD de escobas secas, frutos partenocárpicos y una vaina infectada. Los óvalos con las líneas discontinuas blancas representan escobas secas. Los óvalos con las líneas blancas sólidas muestran frutos partenocárpicos. (B) Árbol infectado con síntomas de WBD con una sola escoba seca. El óvalo con la línea blanca discontinua rodea la escoba seca. (Meinhardt, et al., 2008) 14	14
Figura 3. Síntomas de la infección por Moniliasis. A: Fruto antes de los 2,5 meses de edad. B: Fruto entre 2.5 y 3.5 meses de edad; C: Fruto de 3.5 meses de edad o más; D: Fruto en etapa de esporulación. (Cubillos, 2016) 15	15
Figura 4. Planta muerta por Mal de machete, con hojas dobladas hacia abajo y que permanecen largo tiempo adheridas a la planta (Phillips-Mora & Cerda, 2009) 16	16
Figura 5. Etapas de embriogénesis somática 18	18
Figura 6. Etapas de crecimiento en una suspensión celular (NPTEL, 2016)..... 19	19
Figura 7. Fase de campo. A) Lugar de recolección. B) Explantes florales de cacao fino de aroma..... 22	22
Figura 8. Proceso de pre desinfección. A) Lavados con agua estéril. B) Almacenamiento para transporte al laboratorio de cultivo de tejidos vegetales. 23	23
Figura 9: Proceso de desinfección. A) Detergente al 3% (p/v). B) Cloro al 2% (v/v). C) Alcohol al 70%. 26	26

- Figura 10:** Estructura interna de la flor de cacao, la flecha azul indica la ubicación de los estaminoides y la línea roja señala el corte transversal que se realizó en la base de la flor. .28
- Figura 11.** Multiplicación de proembriones. A) Suspensiones de proembriones. B) Cultivos de proembriones en orbital rotatorio..... 36
- Figura 12.** Medición de volumen de células sedimentadas 37
- Figura 13.** Gráfico de porcentajes de contaminación fúngica, contaminación bacteriana y oxidación encontrados en los clones de cacao fino de aroma EET-95, EET-96, EET-103, EET-575 y EET-576. 40
- Figura 14.** Desarrollo de callo en los estaminoides a los 15 días. A. Callo con coloración amarilla. B. Callo con coloración blanquecina..... 43
- Figura 15.** Porcentaje de formación de callo en los estaminoides. A) Estaminoides sin presencia de callo. B) Estaminoides con 25% de callo. C) Estaminoides con 50% de callo. D) Estaminoides con 75% de callo. E) Estaminoides con 100% de callo 43
- Figura 16.** Gráfico de porcentaje de presencia de callo y porcentaje promedio de formación de callo encontrados en los clones de cacao fino de aroma EET-95, EET-96, EET-103, EET-575 y EET-576. 45
- Figura 17.** Número de explantes con los porcentajes de callo del 0%, 25%, 50%, 75% y 100% encontrados en los clones de cacao fino de aroma EET-95, EET-96, EET-103, EET-575 y EET-576. 46
- Figura 18.** Desarrollo de proembriones en los callos a los 30 días de permanencia en el medio ED. A) Callo con proembriones. B) Masas proembriogénicas..... 49

Figura 19. Gráfico de porcentaje de presencia de proembriones y porcentaje promedio de formación de proembriones encontrados en los clones de cacao fino de aroma EET-95, EET-96, EET-103, EET-575 y EET-576.....	51
Figura 20. Número de explantes con los porcentajes de formación de proembriones del 0%, 25%, 50%, 75% y 100% encontrados en los clones de cacao fino de aroma EET-95, EET-96, EET-103, EET-575 y EET-576.	53
Figura 21. Callo con presencia de embriones somáticos en estadio globular a los 60 días de cultivo en el medio ED.	55
Figura 22. Estadios de embriones somáticos .A) Embriones somáticos del clon EET-103 en estado globular. B) Embriones somáticos del clon EET-103 en estado globular (g), estado torpedo (to) y estado corazón (co). C) Embriones somáticos del clon EET-103 en estado cotiledonar (c). D) Embriones somáticos de Clon EET-95 en estado globular (g). E,F) Embriones somáticos de clon EET-575 en estados torpedo (to) y corazón (co) a los 60 días de cultivo ene le medio ED.....	56
Figura 23. Gráfico de número de callos con embriones somáticos y número de embriones somáticos primarios obtenidos en los clones de cacao fino de aroma EET-95, EET-96, EET-103, EET-575 y EET-576.	58
Figura 24. Morfología de las células en suspensión. A) Observación a las 2 semanas (40X). B) Observación al mes (40X) C) Observación a los 2 meses (40X).	62
Figura 25. Curva de cinética celular de los clones de cacao fino de aroma EET-95, EET-96, EET-103, EET-575 y EET-576.	63

RESUMEN

El cacao fino de aroma (*Theobroma cacao L.*) es uno de los principales productos agrícolas del Ecuador. Su propagación actual se da por métodos vegetativos que permiten generar clones de alto rendimiento con la desventaja de ser de tipo plagiotrópico, lo conlleva a la búsqueda de nuevas técnicas de producción clonal de plantas con características ortotrópicas, como la embriogénesis somática que permite producir plantas ortotrópicas con rasgos genéticos altamente valorados. El objetivo de esta investigación es obtener proembriones y embriones somáticos primarios de cacao fino de aroma para la multiplicación de los proembriones en medio líquido y posterior estandarización de la técnica de embriogénesis somática secundaria. En esta investigación se utilizaron explantes florares de los clones de cacao EET-95, EET-96, EET-103, EET-575 y EET-576 en los cuales se evaluó la producción de callo, proembriones, embriones somáticos primarios y por último la cinética celular. Los clones de cacao EET-95, EET-96 presentaron la mayor producción de callo y proembriones, sin embargo en la etapa de desarrollo de embriones la variedad EET-103 presentó la mayor media de embriones por explante (6.83) seguida de las variedades EET-575 (3.66) y EET-95 (3.5). Al evaluar las curvas de cinética celular de las suspensiones de proembriones se observaron diferencias significativas entre los clones, destacando en esta etapa los genotipos EET-575 y EET-576. Este estudio demuestra que la influencia del genotipo en las distintas fases de la embriogénesis somática, además aporta nuevos datos para la posterior generación de un sistema de multiplicación masiva de clones de cacao mediante embriogénesis somática.

PALABRAS CLAVE:

- **CLON**
- **ORTOTRÓPICO**
- **EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA**
- **EMBRIÓN.**

ABSTRACT

Fine aroma cocoa (*Theobroma cacao* L.) is one of the main agricultural products of Ecuador. Its current propagation is given by vegetative methods that allow the generation of high yield clones with the disadvantage of being plagiotropic, leading to the search for new clonal production techniques of plants with orthotropic characteristics such as somatic embryogenesis that allows the production of orthotropic plants with highly valued genetic traits. The objective of this research is to obtain pro-embryos and primary somatic embryos of fine aroma cacao for the multiplication of the proembryos in liquid medium and later standardization of the technique of secondary somatic embryogenesis. In this investigation, floral explants of the EET-95, EET-96, EET-103, EET-575 and EET-576 cocoa clones were used in which the production of callus, proembryos, primary somatic embryos and, finally, the cellular kinetics. EET-95, EET-96 cocoa clones had the highest production of callus and proembryos, however in the stage of embryo development the EET-103 variety had the highest average of embryos per explant (6.83) followed by the varieties EET -575 (3.66) and EET-95 (3.5). In the evaluation of the cell kinetic curves of proembryo suspensions, significant differences were observed among the clones, highlighting at this stage the genotypes EET-575 and EET-576. This study shows that the influence of the genotype in the different phases of somatic embryogenesis also provides new data for the subsequent generation of a system of massive multiplication of cocoa clones by somatic embryogenesis.

KEYWORDS:

- CLONE

- ORTHOTROPIC

- SOMATIC EMBRYOGENESIS

- EMBRYO.

CAPITULO 1

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

MULTIPLICACIÓN DE PROEMBRIONES Y OBTENCIÓN DE EMBRIONES SOMÁTICOS PRIMARIOS DE CINCO CLONES CERTIFICADOS DE CACAO FINO DE AROMA (*Theobroma cacao* L.)

1.1 Antecedentes

El auge cacaotero en el Ecuador tuvo lugar entre 1840 y 1925 (Maiguashca, 2012), debido al mismo se creó el Programa de Cacao de la Estación Experimental Tropical (EET) Pichilingue del INIAP, que desde su inicio, se planteó como meta generar árboles de cacao con un alto nivel productivo. Para lo cual entre 1942 y 1952, trabajó en conjunto con el Servicio Cooperativo Interamericano de Agricultura, para recolectar material vegetal de la población de cacao Nacional del Litoral ecuatoriano, de esta investigación se seleccionaron clones a los que se asignó la sigla EET, y se procedió a usarlos en procesos de mejoramiento, que consistieron en cruzar artificialmente los clones productores con aquellos considerados, en aquella época, como tolerantes o resistentes a la enfermedad denominada escoba de bruja causada por el hongo *Moniliophthora perniciosa*, iniciando de esta forma las primeras investigaciones sobre cacao a nivel nacional (Vera, Suarez, & Mogrovejo, 1984).

A partir de estos estudios se generó la primera generación de clones recomendados por INIAP entre los cuales se encuentran los genotipos EET-19, EET-48, EET-62, EET-95, EET-96 y EET-103 (Rosero, 2013; Vera, Suarez, & Mogrovejo, 1984). Mediante las

investigaciones posteriores se dio origen a los genotipos recomendados más recientes, entre los que se encuentran los clones denominados EET-544, EET-558, EET-575 y EET-576 (INIAP, 1995).

La identidad genética de estos genotipos comerciales de cacao Nacional, se logró determinar en el 2013 mediante el empleo de 17 marcadores moleculares micro satélites, que permitieron diferenciar al grupo de genotipos EET recomendados de otros genotipos. Además a través de este estudio se determinó la combinación de marcadores moleculares que diferencian entre genotipos EET recomendados (Rosero, 2013). A nivel de cultivo *in vitro* Castillo (2004) realizó los primeros ensayos de embriogénesis somática en el país, obteniendo resultados a partir del uso de pétalos de genotipos de cacao Nacional “Sabor arriba”. Contrariamente a lo observado en investigaciones a nivel internacional realizadas por Alemanno (1996) y Maxinova et al. (2002) cuyos resultados indicaron la presencia de embriones usando como explante estaminoides de los tipos de cacao Criollo, Forastero y Trinitario.

Esta investigación pretende realizar la multiplicación de proembriones y la obtención de embriones somáticos de cacao fino de aroma a partir de explantes florales, para el posterior desarrollo de investigaciones orientadas al mejoramiento genético mediante el uso de proembriones o sistemas multiplicación masiva usando embriogénesis somática secundaria.

1.2 Justificación e importancia del problema a resolver

El cacao fino de aroma (*Theobroma cacao* L.) es una planta de gran relevancia económica en el Ecuador. Actualmente el país es el segundo mayor productor de cacao en

Latinoamérica y séptimo a nivel mundial. La propagación de esta planta se puede dar de forma sexual a través de semillas, sin embargo este método no se recomienda ya que se generan plantas altamente heterocigotas (Li, Traore, Maximova, & Guiltinan, 1998). En la actualidad se producen distintos clones de cacao fino y de aroma por medio de métodos vegetativos como el enraizamiento de ramilla o injertos en un patrón (Agrocalidad, 2016). Sin embargo, estos métodos presentan la desventaja de producir plantas de tipo plagiotrópico que se caracterizan por presentar gran cantidad de ramas secundarias por lo que estas plantas requieren constante poda, que si no se realiza adecuadamente puede contribuir a la propagación de enfermedades (Rosero, 2013). La embriogénesis somática es una alternativa a los métodos tradicionales de propagación vegetativa, ya que permite la obtención de plantas ortotrópicas con características valoradas a nivel agrícola y comercial (Li, Traore, Maximova, & Guiltinan, 1998).

El cacao fino de aroma (*Theobroma cacao* L.) es un producto agrícola de gran importancia económica en Ecuador, ya que se encuentra cultivado en aproximadamente 600 mil hectáreas. Durante el 2017 se exportaron 308 mil toneladas de este producto generando un ingreso económico al país de \$ 588,4 millones de dólares (Ruiz, 2018). Esto se debe a la calidad, aroma floral y sabor excepcional que posee cacao Nacional, características que le han otorgado el reconocimiento en los mercados internacionales y le han permitido posicionarse al Ecuador como el séptimo productor a nivel mundial (Anecacao, 2015).

En la actualidad, debido al bajo nivel de productividad de las plantaciones actuales por el envejecimiento de las mismas se está trabajando en la rehabilitación y renovación de 354 mil hectáreas de cacao (MAG, 2017). Mediante la multiplicación masiva de clones

certificados de cacao Nacional a través de la técnica de cultivo de tejidos vegetales, como es la embriogénesis somática se puede ayudar a la reactivación del Cacao Nacional fino y de aroma. La finalidad de este proyecto de tesis es multiplicar proembriones de *Theobroma cacao* L. mediante suspensiones celulares y obtener embriones somáticos primarios.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo general del proyecto

Multiplicar proembriones y obtener embriones somáticos primarios de explantes florales de los clones certificados EET-95, EET-96, EET-103, EET-575 y EET-576 de Cacao fino de Aroma (*Theobroma Cacao* L.) de la Provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas.

1.3.2 Objetivos específicos

- Inducir y evaluar la formación de callo en explantes florales de Cacao fino de aroma (*Theobroma cacao* L.).
- Obtener proembriones y embriones somáticos primarios de Cacao fino de aroma (*Theobroma cacao* L.) en medio sólido.
- Realizar la multiplicación de proembriones de Cacao fino de aroma (*Theobroma cacao* L.) en medio líquido para establecer la cinética celular.

1.4 Hipótesis

Existe variación en la capacidad que presentan los clones certificados de Cacao fino de Aroma (*Theobroma cacao* L.) para generar proembriones y embriones somáticos primarios.

1.5 Marco referencial

1.5.1 Cacao (*Theobroma cacao* L.)

Origen y Distribución.

Diversa evidencia arqueológica del uso precolombino de *Theobroma cacao* L. que data de 3,900 años ha generado la creencia que el cacao se originó en Mesoamérica. Sin embargo la investigación genómica muestra que la mayor diversidad de *T. cacao* se encuentra en la región superior del Amazonas en el noroeste de Sudamérica, apuntando a esta región como su centro de origen. Además ADN antiguo que data de hace aproximadamente 5,300 años, recuperado del sitio de Santa Ana-La Florida (SALF) en el sureste de Ecuador evidencia que *Theobroma cacao* L. fue domesticado en Sudamérica al menos 1,500 años antes de su distribución en Centroamérica y Mesoamérica. La figura 1 muestra los cuatro sitios arqueológicos donde se ha encontrado la evidencia más temprana del uso de *Theobroma cacao* L. (Zarrillo et al., 2018)

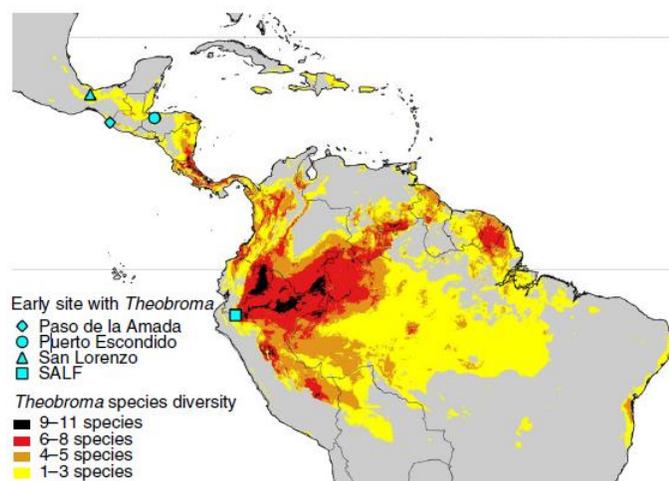


Figura 1. Sitios arqueológicos en México, América central y Sur América donde se ha encontrado la evidencia más temprana del uso de *Theobroma cacao* (Zarrillo et al., 2018).

El estudio llevado a cabo por Zarrillo et al. (2018), permite comprobar las teorías formuladas por Cuatrecasas (1964) y Cheesman, (1944) quienes mencionan que el cacao es originario de Sur América, de un área al este de la cordillera de los Andes compuesta por las cuenca hidrográfica del Alto Amazonas. Actualmente hay 22 especies del género *Theobroma*. La mayoría de ellas son nativas del Amazonas superior, región de afluentes donde *T. cacao* muestra su mayor diversidad genética.

Clasificación Taxonómica

La clasificación taxonómica del cacao fue establecida por primera vez por Linneo en 1737. Sin embargo la clasificación definitiva (Tabla 1) fue instaurada por Benthán & Hooker en 1862.

Tabla 1.

Clasificación taxonómica del cacao fino de aroma

Taxonomía del Cacao	
Reino	Plantae
Sub-reino	Tracheobionta
Superdivisión	Spermatophyta
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Sub-clase	Dilleniidae
Orden	Malvales
Familia	Sterculiaceae
Genero	<i>Theobroma</i>
Especie	<i>T. cacao</i> L.

Fuente: (United States department of Agriculture, 2012; Benthán & Hooker, 1862)

Características

El cacao es una planta perenne diploide ($2n=20$) (Quiróz, 2002), cuya propagación sexual se puede dar por medio de semilla, o vegetativamente por medio de enraizamiento de ramillas o injertos. Entre las particularidades de las plantas producidas por semilla se puede destacar su sistema radical compuesto por una raíz principal o pivotante, estas plantas desarrollan un tallo principal cuyo tamaño puede ser de 1 a 2 metros de altura y poseen ramas, dimórficas, cuyo crecimiento puede ser ortotrópico (crecimiento vertical) o plagiotrópico (crecimiento oblicuo hacia fuera) (Adu et al., 2011).

Entre las principales diferencias con las plantas producidas de forma asexual tenemos que el material vegetal generado por este método no desarrolla raíz pivotante, sin embargo posee varias raíces secundarias, cuyo crecimiento es horizontal. Además en estos árboles predomina el crecimiento de ramas laterales o plagiotrópicas. (Adriazola, 2003)

Tipos de Cacao

El cacao se clasifica en tres grupos: Cacao Criollos, Forasteros, y Trinitarios (Hardy, 1961). A continuación se presenta la descripción de estos grupos.

Cacao criollo

Este tipo de cacao se denomina Criollo debido a los conquistadores españoles que realizaban su cultivo Criollo en Venezuela, durante la época de la Colonia (Quiróz, 2002). Este tipo de cacao se caracteriza por presentar flores con estaminoides de color rosado pálido, mazorcas con una forma alargada, cuya corteza posee un pericarpio rugoso, un mesocarpio poco lignificado, además el color de la mazorca puede variar entre o amarillo dependiendo del estado de madurez (Bhattacharjee, 2018).

Cacao Forastero

Este tipo de cacao tienen su origen en las estribaciones de la cordillera oriental de los Andes en la Amazonía de Venezuela, Brasil, Colombia, Ecuador, Perú, y Bolivia (Enríquez, 2010). Su cultivo representa alrededor del 80% del área en producción mundial, debido a su relativa resistencia a ciertas enfermedades y su alta productividad. El cacao forastero se caracteriza porque sus mazorcas pueden presentar surcos y rugosidad notable, la cáscara es un poco gruesa y posee el mesocarpio lignificado; además el color varía dependiendo del estado en que se encuentren, pasando de verde en estado inmaduro a un color amarillo una vez maduras (Paredes, 2009).

Cacao Trinitario

Este grupo se originó en Trinidad, actualmente ocupa del 10 al 15% de la producción mundial. El cacao trinitario está formado por una población híbrida obtenida mediante el cruce del cacao Criollo de Trinidad y una variedad forastera introducida de la cuenca del Orinoco. Debido a esto sus características morfológicas, genéticas y de calidad son difíciles de definir, al ser intermedias entre los dos grupos previamente mencionados (Quiroz, 2002). En este tipo de cacao se encuentra el clon CCN51, cuyo desarrollo se dio en Ecuador a través de la investigación realizada por el agrónomo Homero Castro en la zona de Naranjal, entre las características más destacadas de este clon se encuentran su alta producción y tolerancia a las enfermedades, sin embargo el mismo carece del aroma que posee el cacao nacional (Enríquez, 2010).

Cacao Nacional o Fino de aroma

El cacao Nacional es de tipo “forastero”, generalmente se lo conoce como “Cacao Arriba”, debido a que su cultivo se encontraba en la zona superior del río Guayas (río arriba). Gran parte del material vegetal sembrado en Ecuador corresponde a un genotipo de Nacional x Trinitario (Enríquez, 2010). Algunas características del cacao Nacional son el cotiledón castaño claro y un fuerte y agradable perfume floral conocido como aroma Arriba (Amores et al., 2009).

INIAP dispone de diversos jardines clónales para la propagación de plantas, entre los que se encuentran EET – Pichilingue, EE – Litoral Sur, EE Central de la Amazonía y EE. Santo Domingo. Sin embargo, la mayor colección se encuentra en la EET – Pichilingue del INIAP, donde se dispone de clones o cultivares de alta producción con tolerancia a las enfermedades y con características propias de la variedad Sabor Nacional Arriba (Tabla 2).

Tabla 2.

Clones e Híbridos de Sabor Nacional Arriba recomendados por el INIAP para el Ecuador.

Material Recomendado por el INIAP			
Clones		Híbridos	
Código	Lugar	Código	Lugar
EET-19	Santo Domingo de los Tsáchilas, Los Ríos, Bolívar, y Cotopaxi	EET-19 x EET-110	Manabí
EET-48	Zamora Chinchipe, Morona Santiago y Pastaza	EET-48 x EET-110	Manabí
EET-62	Esmeraldas, Guayas, El Oro, Loja, Zamora Chinchipe, Azuay, Cañar.	EET-48 x EET-332	Manabí

Continúa →

EET-95	Chimborazo, Los Ríos, Bolívar, Tungurahua, Cotopaxi, Santo Domingo de los Tsáchilas, Pichincha, Napo, Sucumbíos, Orellana y Morona Santiago	EET-95 x EET-332	Manabí
EET-96	Esmeraldas, Guayas, El Oro, Loja, Zamora Chinchiipe, Azuay, Cañar, Chimborazo, Los Ríos, Tungurahua, Cotopaxi, Pichincha, Imbabura, Carchi, Napo, Sucumbíos, Orellana, Pastaza y Morona Santiago	EET-103 x EET-378	Manabí
EET-103	Esmeraldas, Manabí, Guayas, El Oro, Loja, Zamora Chinchiipe, Azuay, Cañar, Chimborazo, Los Ríos, Bolívar, Tungurahua, Cotopaxi, Santo Domingo de los Tsachilas, Pichincha, Imbabura, Carchi, Napo, Sucumbíos, Orellana, Pastaza y Morona Santiago		
EET-575	Esmeraldas y Manabí		
EET-576	Manabí		
EET-544	Santa Elena y Guayas		
EET-558	Santa Elena y Guayas		

Clon EET-95

Este clon fue recolectado por la Estación experimental Tropical Pichilingue en 1944 en la Hacienda Tenguel ubicada en la Provincia de Guayas (Vera, Suarez, & Mogrovejo, 1984). Los arboles presentan un crecimiento erecto y hojas elípticas, además sus ramillas presentan un 48% de enraizamiento. Sus pedúnculos florales se encuentran pigmentados y poseen una longitud promedio de 15.50 mm. Este clon florece en mayor cantidad durante los meses de diciembre, enero y febrero. Su rendimiento promedio fluctúa entre 1563 a 1908 kilogramos de cacao seco por hectárea, además es tolerante a la enfermedad escoba de bruja causada por el patógeno *Moniliophthora perniciosa* (Quiroz J. , 2000; Vera, Suarez, & Mogrovejo, 1984).

Clon EET-96

El clon EET-96 también denominado Porvenir-10, se originó en la Hacienda Porvenir de la Provincia de los Ríos y fue seleccionado por la estación Experimental Tropical Pichilingue entre 1944 y 1948 (Vera, Suarez, & Mogrovejo, 1984). Sus ramas laterales presentan una tendencia de crecimiento erecto, posee hojas elípticas y sus nuevos brotes están levemente pigmentados de rojo. Este clon presenta un 38% de enraizamiento, su floración se da con mayor intensidad durante la época lluviosa. Sus flores presentan lígulas y estambres poco pigmentados, con estaminoides color purpura (Quiroz J. , 2000). El rendimiento promedio del clon EET-96 varía entre 1190 a 1264 kilogramos de cacao seco por hectárea. El clon EET-96 es tolerante a escoba de bruja, pero susceptible a las enfermedades monilia y mal de machete (Vera, Suarez, & Mogrovejo, 1984).

Clon EET-103

El clon EET-103 fue colectado en la Hacienda Tenguel de la Provincia del Guayas por la Estación experimental Tropical Pichilingue en 1944. Se caracteriza por ser homocigoto para el color de fruto verde (rr), sus ramas presentan un crecimiento erecto, hojas elípticas, además el este clon posee un bajo nivel de enraizamiento (35%) (Vera, Suarez, & Mogrovejo, 1984; Rodríguez, Alarcón, Zambrano, & Carvajal, 2010). Sus flores presentan pedúnculos largos, ligeramente pigmentados con un color rojo claro y su floración aumenta durante la época lluviosa (Mera & Ruiz, 2014). El rendimiento de este clon fluctúa a nivel experimental entre 1529 a 1475 kilogramos de cacao seco por hectárea. Este clon es tolerante a la enfermedad escoba de bruja y resistente a mal de machete pero susceptible a monilia (Quiroz J. , 2000; Vera, Suarez, & Mogrovejo, 1984).

Clon EET-575

El clon EET-575 se originó como parte del proyecto “Obtención de un policlon de cacao mejorado a partir de la evaluación de clones de élite”, desarrollado en la zona de Calceta en la provincia de Manabí durante el periodo del 2002 hasta el 2007 (Amores, Agama, Suarez, Quiroz, & Motato, 2009). Los arboles presentan un crecimiento semi-erecto con picos de floración durante el primer y tercer trimestre del año, sus flores son autocompatibles e intercompatibles con otros clones de cacao Nacional. Este clon posee un rendimiento promedio de 1512, 2 kilogramos de cacao seco por hectárea, los contenidos promedio de grasa, cafeína, teobromina son de 48.31%, 0.26% y 1.46% respectivamente.

Presenta tolerancia a escoba de bruja, mal de machete y monilia (Rodríguez, Alarcón, Zambrano, & Carvajal, 2010).

Clon EET-576

El clon EET-576 se originó en la provincia de Manabí, en el marco del proyecto “Obtención de un policlon de cacao mejorado a partir de la evaluación de clones de élite”, desarrollado en la zona de Calceta (Amores, Agama, Suarez, Quiroz, & Motato, 2009). Presenta características morfológicas semejantes al clon EET-575, sin embargo su rendimiento promedio es menor (1203,2 kilogramos de cacao seco por hectárea), además los contenidos de grasa, cafeína, teobromina y la relación teobromina/cafeína son de 51.14, 0.24, 1.56 y 6.50 respectivamente. Este clon es tolerante a escoba de bruja, mal de machete y monilia (Amores et al., 2009; Rodríguez et al., 2010).

Enfermedades que afectan al cultivo de cacao

Escoba de bruja

Moniliophthora perniciosa (= *Crinipellis perniciosa*) es el patógeno causante de la enfermedad escoba de bruja (WBD), la cual ha provocado graves pérdidas económicas en todas las regiones productoras de cacao a las que se ha propagado con reducciones de rendimiento que van del 50 al 90% (Meinhardt et al., 2008). Este patógeno está presente en América del Sur, algunos países el Caribe y áreas al sur de El Canal de Panamá (Phillips-Mora & Cerda, 2009).

Los síntomas de esta enfermedad son hipertrofia e hiperplasia de los tejidos distales al sitio de infección, pérdida de dominancia apical, proliferación de brotes auxiliares y formación de tallos anormales dando como resultado una estructura similar a una escoba (Griffith, 2004). En las flores y frutos la infección causa la formación de estructuras con forma de escoba o pequeños frutos partenocárpicos (Cueva, Jaramillo, & Ramírez, 2015) (Fig. 2A). Luego de un periodo de 1 a 2 meses de alteraciones en el desarrollo se produce la necrosis y la muerte de los tejidos infectados, formando así la estructura llamada escoba seca (Meinhardt et al., 2008) (Fig. 2B).

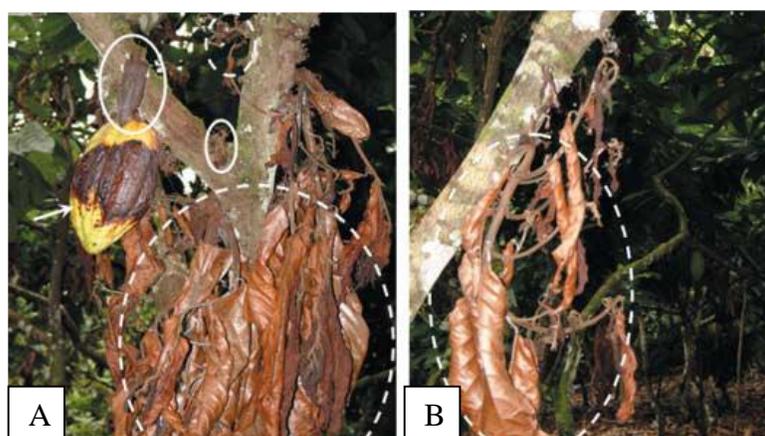


Figura 2. (A) Árbol infectado con síntomas de WBD de escobas secas, frutos partenocárpicos y una vaina infectada. Los óvalos con las líneas discontinuas blancas representan escobas secas. Los óvalos con las líneas blancas sólidas muestran frutos partenocárpicos. (B) Árbol infectado con síntomas de WBD con una sola escoba seca. El óvalo con la línea blanca discontinua rodea la escoba seca. (Meinhardt, et al., 2008)

Moniliasis

La monilia es causada por el hongo *Moniliophthora roreri*, esta enfermedad que afecta a los cultivos de cacao se considera la causa más importante de los bajos niveles de producción en los países de América Central y del Sur (Saenz, 2007). El primer síntoma de la infección en los frutos de 2,5 meses es la presencia de deformaciones con apariencia de gibas o jorobas (Fig. 2A). En las vainas de 2,5-3,5 meses se pueden observar manchas color marrón con bordes irregulares que pueden llegar a cubrir completamente el fruto (Fig. 2B). Después de 3.5 meses, los síntomas consisten en la presencia de puntos subepidérmicos aceitosos (Fig. 2C) y por último se da la esporulación en la cual aparece una estructura de hongo blanco o blanco cremoso que indica una alta presencia de esporas listas para ser liberadas, esta etapa es crítica dado que en la misma la capacidad de propagación de la enfermedad es óptima (Fig. 2D) (Cubillos, 2016; Cueva, Jaramillo, & Ramírez, 2015).

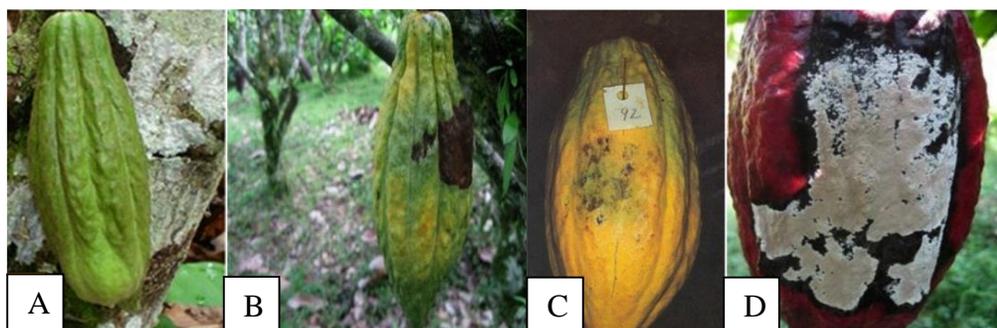


Figura 3. Síntomas de la infección por Moniliasis. A: Fruto antes de los 2,5 meses de edad. B: Fruto entre 2.5 y 3.5 meses de edad; C: Fruto de 3.5 meses de edad o más; D: Fruto en etapa de esporulación. (Cubillos, 2016)

Mal de machete

El mal de machete es una enfermedad que causa marchitez y muerte tanto al cacao (*Theobroma cacao L.*) como a otras especies del género *Herrania*. Es causada por el hongo *Ceratocystis cacaofunesta*, el cual ingresa a las plantas de cacao a través de heridas frescas causadas comúnmente por la poda, la cosecha de frutos, y por el ataque de insectos taladradores del género *Xyleborus* (Sanches, Pinto, Silva, & Loguercio., 2008).

Los primeros síntomas que presentan los árboles son marchitez y clorosis de las hojas, luego de un periodo de 2 a 4 semanas, la copa entera se seca, permaneciendo las hojas muertas adheridas al árbol por un tiempo (Figura 4). Es frecuente observar, en árboles afectados, aserrín que sale de pequeños orificios ocasionados por insectos taladradores en la parte baja del árbol (Cueva, Jaramillo, & Ramírez, 2015).



Figura 4. Planta muerta por Mal de machete, con hojas dobladas hacia abajo y que permanecen largo tiempo adheridas a la planta (Phillips-Mora & Cerda, 2009)

1.5.2 Cultivo *in vitro*.

Generalidades

El cultivo de tejidos vegetales, es el compendio de técnicas biotecnológicas que favorecen el crecimiento de células *in vitro*, con la ayuda de un medio de cultivo que intenta recrear artificialmente las condiciones óptimas para el crecimiento y desarrollo del tejido vegetal, denominado explante (Wampash, Nieves, & Barriga, 2011).

Un medio de cultivo es una solución acuosa en la cual se encuentran disueltas sales minerales que aportan elementos esenciales: macronutrientes como N, P, K, S, Ca y Mg, así como micronutrientes como Fe, B, Mn, Zn, Cu, Mo, y Co; necesarios para el crecimiento y desarrollo de los tejidos vegetales que se van a cultivar *in vitro* (Thorpe, 2007).

Debido a que los explantes *in vitro* no tienen gran actividad fotosintética, es imprescindible una fuente de carbono, generalmente sacarosa (2-5%), la cual se puede remplazar por glucosa y fructuosa. La composición del medio, particularmente las hormonas vegetales y la fuente de nitrógeno, tiene efectos profundos en la respuesta del explante inicial. Los reguladores del crecimiento de las plantas (PGR) desempeñan un papel esencial en la determinación de la vía de desarrollo de las células y tejidos vegetales en el medio de cultivo. Las auxinas, citoquininas y giberelinas son los reguladores del crecimiento de las plantas más comúnmente utilizados. La alta concentración de auxinas generalmente favorece la formación de raíces, mientras que la alta concentración de citoquininas promueve la regeneración de brotes. Un equilibrio tanto de auxina como de citoquinina conduce al desarrollo de masa de células indiferenciadas conocidas como callos (Oseni, 2018).

Embriogénesis somática

La técnica de embriogénesis somática consiste en obtener embriones sin la intervención de células gaméticas. Los embriones somáticos se caracterizan por presentar una morfología y un desarrollo semejante a los embriones sexuales obtenidos por la fecundación, sin embargo se diferencian de los mismos debido a que su constitución genética es idéntica a la planta de origen (Mendez-Hernandez et al.,2019).

Los embriones somáticos no poseen conexión vascular con el tejido parental y pueden diferenciarse de forma directa a partir del explante sin una fase de formación de callo (embriogénesis somática directa) o indirectamente después de transcurrir por un período de calogénesis (embriogénesis somática indirecta) (Loyola-Vargas & Ochoa-Alejo, 2016).

El proceso de embriogénesis somática se da en tres etapas: Durante la primera etapa se da la formación de callo primario. Luego de esto se da la formación de callo secundario en el cual se debe generar la expresión embriogénica para que en la tercera etapa se formen los embriones somáticos globulares, que al desarrollarse pasan por los estados de corazón y torpedo (Figura 5) (Yang & Zhang, 2010; Maximova, 2002).

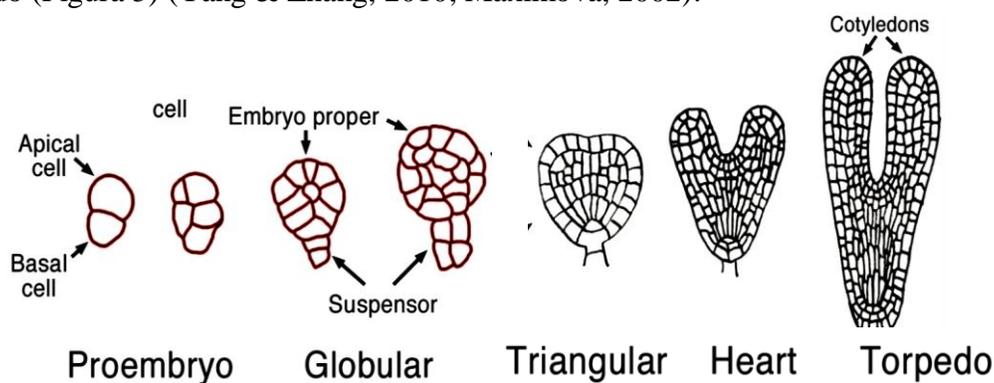


Figura 5. Etapas de embriogénesis somática

Suspensiones celulares

Las suspensiones celulares consisten en un conjunto de células individuales y agregados celulares cuyo tamaño es variado, las mismas crecen y se desarrollan en un medio líquido en el cual están dispersas e incubadas con agitación constante. Cuando las células están en suspensión siguen un patrón de crecimiento típico, basado en los cambios que ocurren en la tasa de división celular (George, Hall, & Klerk., 2008). La primera fase se la denomina latencia, se caracteriza por la lenta división celular; la segunda fase es la etapa exponencial, en la cual se da una rápida división celular; la tercera fase se llama fase lineal, durante esta etapa cesa el crecimiento; la cuarta fase se caracteriza por una tasa decreciente del crecimiento y se conoce con el nombre de fase de desaceleración progresiva; hasta que alcanza la última fase llamada estacionaria (Hartmann, Kester, Davies, & Geneve, 2002) (Figura 6).

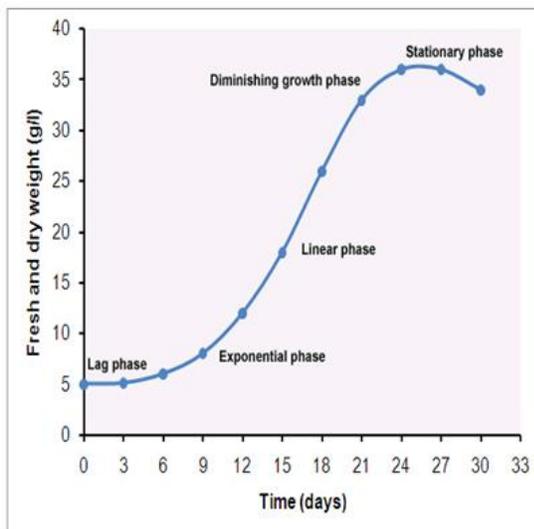


Figura 6. Etapas de crecimiento en una suspensión celular (NPTEL, 2016)

Métodos para medir el crecimiento celular

Los métodos más comunes para medir el crecimiento celular son los siguientes:

- El número de células. Este parámetro se puede usar para medir el crecimiento del cultivo en suspensión celular a lo largo del tiempo ya que la división celular aumenta el número de células. En el caso de cultivos de suspensión de células finas el conteo celular por volumen de suspensión se puede hacer con un hemocitómetro. Sin embargo, los cultivos de suspensión celular los agregados celulares más grandes requieren algunos tratamientos para dividir los agregados antes de contar las células (Mustafa, Winter, Ward, & Verpoorte, 2011).
- Peso fresco (FW) y peso seco (DW) de las células. Es un método de tipo invasivo ya que requiere la recolección de células para determinar el DW o FW de las células por volumen de cultivo de suspensión celular (Blom, Kreis, Iren, & Libbenga, 1992; Schripsema & Verpoorte, 1995).
- Volumen de células sedimentadas (VCS). El VCS se mide después de dejar que las células se asienten en un tubo cónico estéril, se basa en el concepto de que un mayor número de células eleva el volumen de células ocupadas por ml de cultivo de suspensión celular para lo cual se mide el volumen del pellet en función del volumen de cultivo normalmente expresado como porcentaje (Mustafa, Winter, Ward, & Verpoorte, 2011).

- Conductividad media / osmolalidad. En una suspensión celular el crecimiento de las células conlleva una disminución en la concentración de iones, lo que disminuye la conductividad del medio (Hahlbrock, Ebel, & Oaks, 1974). Por lo tanto, la conductividad del medio de cultivo es inversamente proporcional al FW de las células. Los cambios en la conductividad media son causados principalmente por nitrato (Hahlbrock, 1975).
- Contenido de proteínas. El contenido de proteína se puede medir por gramo de células FW o por VCS. Esta técnica requiere la recolección de células y posterior extracción de proteínas. La proteína total en el extracto se puede determinar por el ensayo de Bradford, que utiliza BSA como estándar. En la fase de retraso, el contenido de proteína en las células aumenta lentamente, posteriormente aumenta exponencialmente y muestra una disminución cuando la biomasa celular entra en la fase estacionaria (Mustafa, Winter, Ward, & Verpoorte, 2011; David, Laigneau, & David, 1989).
- Viabilidad celular. Los números de células vivas por volumen de cultivo de suspensión celular se pueden usar como un parámetro para medir el crecimiento. Puede evaluarse tiñendo las células con diacetato de fluoresceína (FDA) o el azul de Evan, luego contando las células viables y muertas bajo un microscopio o midiendo la absorbancia con un espectrofotómetro (Baker & Mock, 1994).

CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS

El proyecto se inició con una búsqueda bibliográfica sobre los distintos tipos de cacao fino de aroma que se cultivan en la provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas, luego se determinó los clones a introducir, multiplicar y preservar la especie *in vitro*.

2.1 Fase de Campo

Se recolectaron explantes florales de Cacao provenientes del vivero Garyth ubicado en la provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas, en la vía Santo Domingo - Quinindé kilómetro 21, parroquia Valle Hermoso, a una altura de 655 msnm (Figura 7A). Las muestras se recolectaron durante el día (10-12 am) con una temperatura de 23°C y humedad de 24% en promedio.

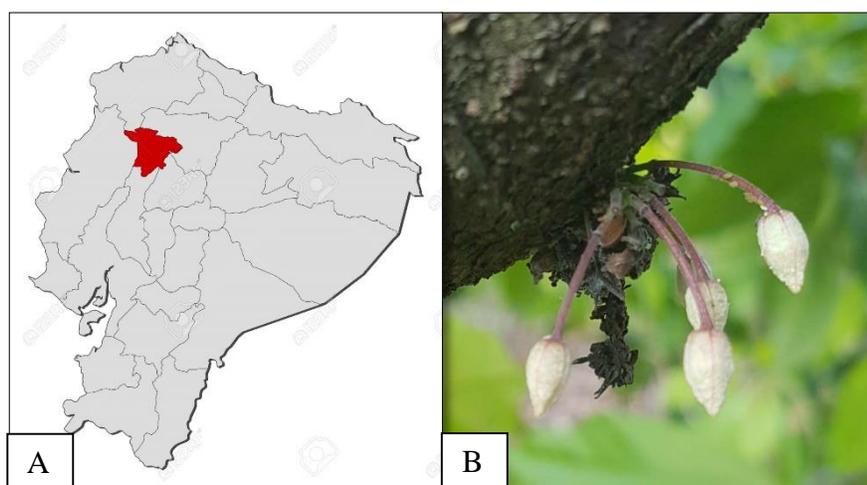


Figura 7. Fase de campo. A) Lugar de recolección. B)

Explantes florales de cacao fino de aroma.

Para el ensayo se utilizaron plantas sanas visualmente, en producción de más dos años de edad, de las cuales se tomaron botones florales cerrados de aproximadamente 0,6 a 0,8 cm de longitud (Figura 7B). Los explantes se recolectaron con ayuda de pinzas en un número de 30 explantes en un frasco estéril. Una vez completado el muestreo se realizó una pre desinfección la cual consistió en sumergir los explantes en cloro al 1% durante 30s y posteriormente realizar 3 lavados con agua estéril (Figura 8A). Los frascos con las muestra se depositaron dentro de una caja de espuma flex junto con 1000g de hielo para mantener la humedad para su posterior transporte al laboratorio de cultivo de tejidos vegetales (Figura 8B).

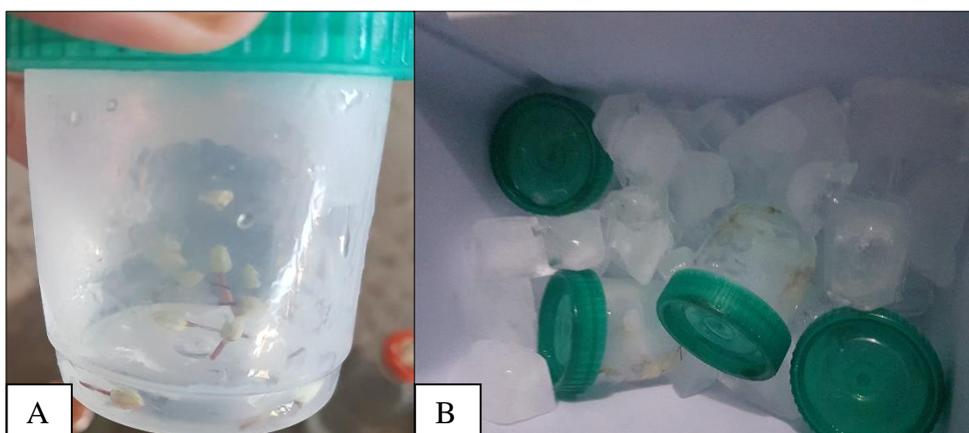


Figura 8. Proceso de pre desinfección. A) Lavados con agua estéril. B) Almacenamiento para transporte al laboratorio de cultivo de tejidos vegetales.

2.2 Fase de Laboratorio.

Esta fase se llevó a cabo en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales perteneciente al Departamento de Ciencias de la Vida de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, Sangolquí –Ecuador .Dirección: Av. General Rumiñahui, coordenadas: Latitud 0° 18'53,891'' (Sur), Longitud 78°26'46,562(Oeste), Altura elipsoidal 2 518,640 m.

Instrumental

Los medios de cultivo e instrumentos a utilizar en la cámara de flujo laminar fueron esterilizados en autoclave horizontal (Marca: Tuttnauer, Procedencia: Estados Unidos) a 121°C y 1,2 kg cm⁻² de presión por un tiempo de 1 hora y 15 minutos aproximadamente. Para manejar el material vegetal en condiciones estériles se utilizó una cámara de flujo laminar horizontal (Marca: Streamline, Procedencia: Estados Unidos), 2 mecheros, alcohol al 70% y 90% v/v, pinzas y bisturí autoclavado, se esterilizó la cámara con luz ultravioleta (UV) durante 40 minutos, antes y después de introducir los materiales necesarios. Los instrumentos dentro de la cámara de flujo laminar se desinfectaron mediante técnicas de flameo con mecheros de alcohol, los cuales permanecieron dentro de la cámara de flujo laminar horizontal lo que permitió un manejo de material vegetal en condiciones estériles.

Medios de cultivo

En la fase de inducción a callo primario el medio de cultivo de crecimiento de callo primario PCG se dosificó a razón de 25 mL por frasco de vidrio de 250 mL de capacidad. El pH se ajustó a 5,8 con NaOH 1 N y HCl 1 N previo a ser esterilizado en autoclave. En la etapa de multiplicación de callo secundario y expresión embriogénica se utilizaron los medios de cultivo de crecimiento de callo secundario SCG y desarrollo de embriones ED respectivamente, se ajustó el pH de los mismos a 5,7 y se procedió a esterilizar en autoclave. Una vez estériles se los transportó a la cámara de flujo laminar donde se dispense los mismos a razón de 25-30 mL en cajas Petri desechables.

En la fase de multiplicación de proembriones el medio de cultivo ED se dosificó a razón de 5 mL en Erlenmeyer de 25 mL de capacidad. El pH se ajustó a 5,7 antes de ser esterilizado en autoclave.

2.2.1 Desinfección de explantes florales de *Theobroma cacao* L.

El objetivo de este experimento fue evaluar la respuesta de los cinco clones de cacao fino de aroma al protocolo de desinfección establecido por Proaño (2015), para lo cual se sumergieron los explantes en detergente 3% (p/v) por 15 minutos, luego se realizaron 3 lavados con agua estéril, después se colocaron las muestras en cloro 2% (v/v) por 10 minutos, posteriormente se efectuaron 3 lavado con agua estéril para finalmente colocar el material vegetal en alcohol 70% (v/v) por 30 segundos y llevarlo a la cámara de flujo donde se realizaron 3 lavados con agua estéril (Figura 9).

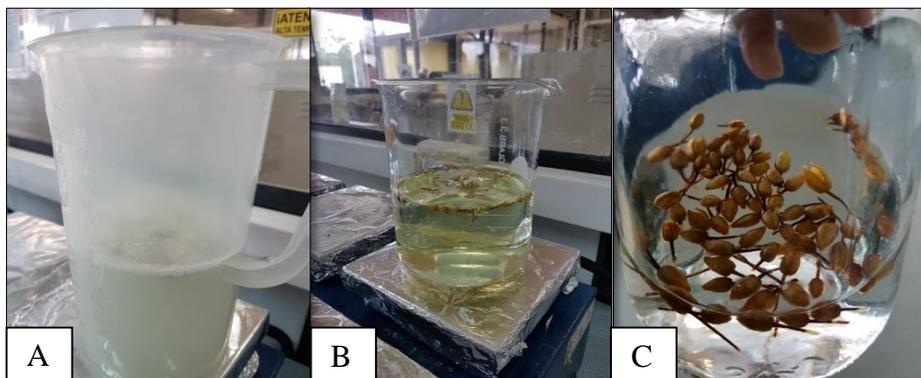


Figura 9: Proceso de desinfección. A) Detergente al 3% (p/v). B) Cloro al 2% (v/v). C) Alcohol al 70%.

En este experimento se aplicó el mismo protocolo de desinfección en los cinco clones de cacao detallados en la Tabla 3.

Tabla 3.

Tratamientos para la fase de desinfección de botones florares de Theobroma cacao L.

Tratamiento	Clon
TD1	EET-95
TD2	EET-96
TD3	EET-103
TD4	EET-575
TD5	EET-576

T: Tratamiento D: Desinfección y #:1-5. Ejem: TD1: Tratamiento desinfección 1.

Las variables de respuesta evaluadas durante la desinfección e introducción de los explantes, fueron las siguientes:

- **Contaminación:** Se observaron los frascos a los 15 días de siembra y se analizó la presencia de hongo, bacteria. Se denotó No contaminado como 0 y Contaminado como 1.
- **Oxidación:** Se evaluó visualmente el necrosamiento y marchitamiento de la unidad experimental. Se asignó el valor de 1 a los explantes que presentaron necrosamiento y 0 a los explantes no necrosados.

La evaluación de las variables se realizó por medio de la observación, después de 15 días de iniciado el ensayo de sembrados los explantes de Cacao (*Theobroma cacao* L.).

Para el análisis estadístico se realizaron cien repeticiones por cada tratamiento de desinfección, según lo indicado en la tabla 3, teniendo como unidad experimental cada explante por frasco de vidrio de 150 mL de capacidad dosificado con 25 mL de medio PCG, suplementado con hormonas. El análisis estadístico consistió en un análisis de varianza ANOVA, la prueba de Shapiro-Wilks para verificar el supuesto de normalidad y la prueba de Kruskal Wallis.

De acuerdo a los niveles de contaminación y oxidación que presentaron los explantes de Cacao (*Theobroma cacao* L.), se determinó que clon responde mejor al tratamiento de desinfección.

2.2.2 Inducción de callo primario.

El objetivo de este ensayo fue inducir la formación de callo primario en los estaminoides provenientes de los botones florales de los cinco clones de cacao fino de aroma examinados. Para esto se usaron botones florales cerrados en los cuales se realizó un corte transversal en la base de flor, separando así los estaminoides del resto de la flor (Figura 10).

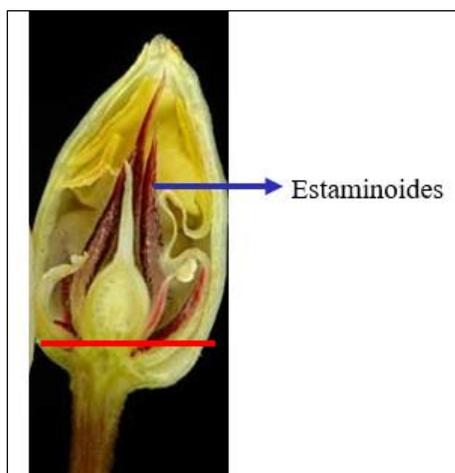


Figura 10: Estructura interna de la flor de cacao, la flecha azul indica la ubicación de los estaminoides y la línea roja señala el corte transversal que se realizó en la base de la flor.

La siembra de los estaminoides se realizó en el medio Primary Callus Growth (PCG) cuya composición se detalla en la tabla 4.

Tabla 4*Medio de cultivo para la inducción a callo de Theobroma cacao*

Compuesto	Medio de Cultivo
	PCG (1 L)
DKW macro A (10X)	100 ml
DKW macro B (10X)	100 ml
DKW micro (100X)	10 ml
DKW vitaminas (1000X)	1ml
Glutamina(mg/l)	250
Myo-inositol(mg/l)	100
Glucosa(g/l)	20
Agar(g/l)	7
pH	5.8
2,4-D(1mg/ml stock)	2ml
TDZ(0.2 mg/l stock)	25ul

Los explantes en los frascos de medio de cultivo se mantuvieron en oscuridad a una temperatura de $27 \pm 1^\circ\text{C}$ por un periodo de 25 días. Se evaluó el efecto que tiene el medio de cultivo PCG en la formación de callo de los distintos clones de cacao fino de aroma, generando cinco tratamientos expuestos en la tabla 5.

Tabla 5.

Tratamientos para la fase de inducción de callo (Theobroma cacao L.).

Tratamiento	Clon
TC1	EET-95
TC2	EET-96
TC3	EET-103
TC4	EET-575
TC5	EET-576

T: Tratamiento, C: Callo y #:1-5. Ejem: TC1: Tratamiento Callo 1

Las variables evaluadas durante la fase de inducción de callo fueron las siguientes:

- **Presencia o ausencia de callo:** Se asignó el valor de 0 si el explante no presenta callo y el valor de 1 si el explante presenta callo.
- **Porcentaje de formación de callo:** Se asignó valores de 0 a 4 de acuerdo al porcentaje de proembriones que presentó el explante, como se indica en la siguiente tabla:

Tabla 6.

Evaluación de la variable porcentaje de formación de callo.

Valor	Porcentaje formación pro embriones (%)
0	0
1	25
2	50
3	75
4	100

Para el análisis estadístico se realizaron cincuenta repeticiones por cada tratamiento de inducción de callo, teniendo como unidad experimental cada explante por frasco de vidrio de 150 mL de capacidad dosificado con 25 mL de medio PCG, suplementado con hormonas.

De acuerdo al porcentaje de formación de callo que presentaron los explantes de Cacao (*Theobroma cacao* L.), se determinó que clon responde mejor al tratamiento de inducción de callo.

El análisis estadístico exploratorio de datos se realizó mediante construcción de gráficas y se empleó un análisis inferencial realizando análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de Shapiro-Wilks modificado.

2.2.3 Multiplicación de callo secundario.

El objetivo de este experimento fue inducir la formación de callo secundario, para lo cual se utilizó el medio de crecimiento de callo secundario (Secondary Callus Growth 1 SCG-1) (Tabla 7). Los callos fueron mantenidos en oscuridad por 15 días a una temperatura aproximada de $27 \pm 1^\circ\text{C}$.

Tabla 7.

Medio de cultivo para la multiplicación de callo de Theobroma cacao L.

Compuesto	Medio de Cultivo
	SCG-1 (1 L)
Sales McCown's	2.3 g
Vitaminas B5 (1000X stock)	1ml
Agua de coco (ml)	50
Glucosa(g/l)	20g
Agar(g/l)	7
pH	5.7
2,4-D (1mg/ml stock)	2ml
Kinetina (1mg/ml stock)	300ul

2.2.4 Desarrollo de proembriones y embriones somáticos

El objetivo de esta etapa fue inducir el desarrollo de proembriones y embriones somáticos primarios, para lo cual se subcultivo los explantes en el medio de cultivo de desarrollo de embriones (Embryo Development ED) detallado en la tabla 8. Los callos se mantuvieron en oscuridad a una temperatura de $27 \pm 1^\circ\text{C}$ y se realizaron cambios de medio cada 14 días siguiendo el protocolo de Li et al. (1998).

Tabla 8.

Medio de cultivo para el desarrollo de proembriones y embriones somáticos primarios de Theobroma cacao L.

Compuesto	Medio de Cultivo
	ED (1 L)
DKW macro A (10X)	100 ml
DKW macro B (10X)	100 ml
DKW micro (100X)	10 ml
DKW vitaminas (1000X)	1ml
Azúcar (g/l)	30
Glucosa (g/l)	1
Agar(g/l)	7
pH	5.7

En este experimento se analizó la formación de proembriones y embriones somáticos en los cinco clones de cacao generando los tratamientos que se presentan en la tabla 9.

Tabla 9.

Tratamientos para la fase de desarrollo de proembriones y embriones somáticos primarios (Theobroma cacao L.).

Tratamiento	Clon
TE1	EET-95
TE2	EET-96
TE3	EET-103
TE4	EET-575
TE5	EET-576

T: Tratamiento, E:Embriones y #:1-5. Ejem: TE1: Tratamiento Embriones 1.

Las variables que se evaluaron fueron las siguientes:

- **Presencia o ausencia de callo con proembriones:** Se asignó el valor de 0 si el callo no presenta proembriones y el valor de 1 si el callo presenta proembriones.
- **Porcentaje de formación de proembriones:** Se asignó valores de 0 a 4 de acuerdo al porcentaje de proembriones que presentó el explante, como se indica en la siguiente tabla:

Tabla 10.

Evaluación de la variable porcentaje de formación de proembriones

Valor	Porcentaje formación pro embriones (%)
0	0
1	25
2	50
3	75
4	100

- **Número de embriones somáticos:** Se contó el número de embriones somáticos formados por explante.
- **Número de callos con embriones somáticos:** Se determinó el número de callos en los cuales se observaron embriones somáticos en los diferentes estadios.

Para el análisis de las variables de porcentaje de formación de proembriones, número de callos con proembriones, se realizó una evaluación al cabo de 30 días de iniciado el ensayo. Mientras que para el análisis de las variables de número de embriones y número de callos con embriones somáticos, se realizó la evaluación al cabo de 60 días de iniciado el

ensayo. La unidad experimental fue cada explante por caja petri dosificada con 25 mL de medio ED y se realizaron 50 repeticiones por cada tratamiento.

El análisis estadístico consistió de un análisis de varianza ANOVA, la prueba de Shapiro-Wilks para verificar el supuesto de normalidad, pruebas de significancia según el método de Turkey para diferenciar subgrupos entre tratamientos, así como un análisis no paramétrico para las variables dicotómicas con la prueba de Kruskal- Wallis. Se utilizó InfoStat y Excel para realizar las pruebas estadísticas

2.2.5 Multiplicación de proembriones

El objetivo de este experimento fue multiplicar los proembriones de los cinco clones de cacao fino de aroma en medio líquido, para lo cual se establecieron suspensiones de proembriones transfiriendo 5 grupos de proembriones en matraces de 25 mL de capacidad, con 5 mL de medio de cultivo líquido . Para las suspensiones se utilizó el medio de cultivo ED y se analizó los cinco clones certificados de cacao fino de aroma, generando los tratamientos detallados en la tabla 11.

Tabla 11.

Tratamientos para la fase de multiplicación de proembriones de Theobroma cacao L.

Tratamiento	Clones de cacao
TM1	EET-95
TM2	EET-96
TM3	EET-103
TM4	EET-575
TM5	EET-576

T: Tratamiento, M:Multiplicación y #:1-15. Ejem: TM1: Tratamiento Multiplicación 1.

Los cultivos celulares se mantuvieron a una temperatura aproximada de 27 ± 1 °C sobre un orbital rotatorio (Marca: VWR, Procedencia: Estados Unidos) a una velocidad de 110 r.p.m. en oscuridad completa. El subcultivo se realizó añadiendo el 30% de medio de cultivo al frasco cada 15 días.

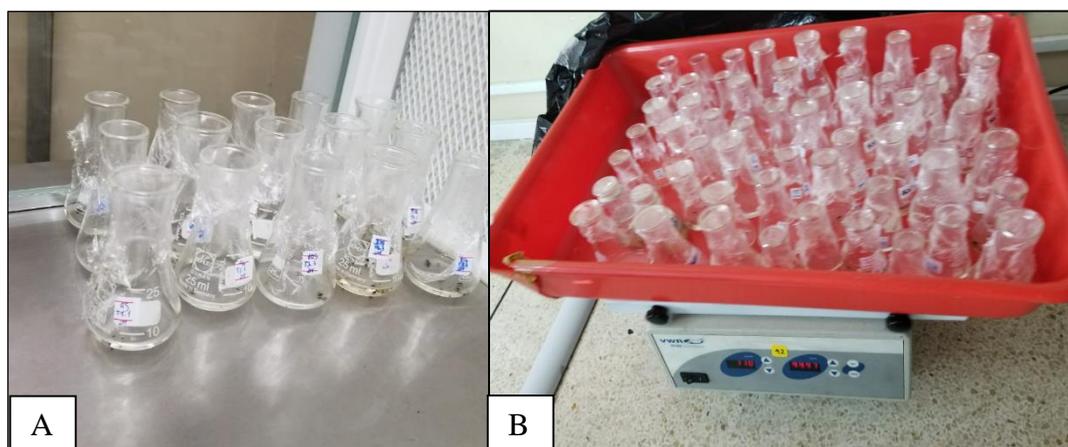


Figura 11. Multiplicación de proembriones. A) Suspensiones de proembriones. B) Cultivos de proembriones en orbital rotatorio.

Cinética celular

Para evaluar la cinética de crecimiento celular se usó volumen de células sedimentadas (VCS), el cual se determinó transfiriendo 5mL de la suspensión celular a un tubo falcon de 15 mL. Luego de 20 minutos de sedimentación, se midió el volumen de la biomasa (Figura 12).



Figura 12. Medición de volumen de células sedimentadas

El volumen de células sedimentadas es expresado así (Mustafa et al., 2011):

$$VCS (\%) = (\text{volumen de biomasa} / \text{volumen total}) \times 100$$

El volumen de células sedimentadas se midió cada 15 días por un periodo de 3 meses. Con estos datos se determinó la curva de crecimiento. Donde el eje (x) es el tiempo en días y el eje (y) es el porcentaje de células sedimentadas. Además se observó las células por microscopía óptica, para analizar su morfología, agrupaciones, así como posible contaminación. Para el desarrollo de la presente etapa se realizaron 3 repeticiones de cada tratamiento. El análisis estadístico consistió de un análisis de varianza ANOVA, la prueba de Shapiro-Wilks para verificar el supuesto de normalidad y el establecimiento de las curvas de crecimiento celular.

CAPÍTULO 3: RESULTADOS

3.1 Desinfección de explantes florales de *Theobroma cacao* L.

En etapa de desinfección de los explantes florales de cacao fino de aroma se analizó la respuesta que presentaron los cinco clones al protocolo de desinfección establecido por Proaño (2015), para lo cual se evaluaron las variables contaminación fúngica, bacteriana y oxidación en los cinco tratamientos. La evaluación de las variables se realizó por medio de la observación a los 15 días de iniciado el ensayo de desinfección e introducción de explantes florales de *Theobroma cacao*, los resultados obtenidos se detallan en la Tabla 12.

Tabla 12.

Resultados de las variables analizadas en la etapa de desinfección de los clones de cacao fino de aroma EET-95, EET-96, EET-103, EET-575 y EET-576.

Clon de cacao	Variables		
	Contaminación fúngica (%)	Contaminación bacteriana (%)	Oxidación (%)
EET-95	20	10	14
EET-96	10	15	11
EET-103	10	9	23
EET-575	0	8	20
EET-576	10	13	9

En el análisis exploratorio de la variable contaminación fúngica, el clon de cacao EET-575 presentó la mejor respuesta al protocolo de desinfección mostrando ausencia de contaminación en el 100% de los explantes. En contraste con la variedad EET-95 que

presentó el 20% de contaminación. A diferencia de los clones EET-95 y EET-575 cuyas tasas de contaminación presentaron notables diferencias, se puede observar que la tasa de contaminación de los clones de cacao fino de aroma EET-96, EET-103 y EET-576 mostraron valores semejantes de contaminación fúngica.

Al evaluar la variable contaminación bacteriana el clon de cacao EET-575 presentó el porcentaje de explantes contaminados más bajo (8%) a diferencia del clon EET-96 cuyo porcentaje de explantes contaminados fue del 15%. Sin embargo las tasas de contaminación bacteriana en los cinco clones de cacao fino de aroma presentan valores semejantes.

Al evaluar la variable oxidación el clon de cacao EET-576 presentó la tasa más baja de oxidación (9%). En contraste con la variedad EET-103 que presentó el 23% de oxidación en los explantes. Los porcentajes de oxidación fueron semejantes entre las variedades EET-103 (23%) y EET-575 (20%); el mismo caso se dio entre los clones de cacao fino de aroma EET-576 (9%), EET-96 (11%) y EET-95 (14%).

Al analizar las tres variables de forma conjunta se observa que el clon que mejor respondió al tratamiento de desinfección fue el clon EET-575 al presentar el menor porcentaje de explantes afectados por el proceso de desinfección. En la figura 16 se puede observar de forma gráfica las variables de respuesta en los cinco clones de cacao fino de aroma.

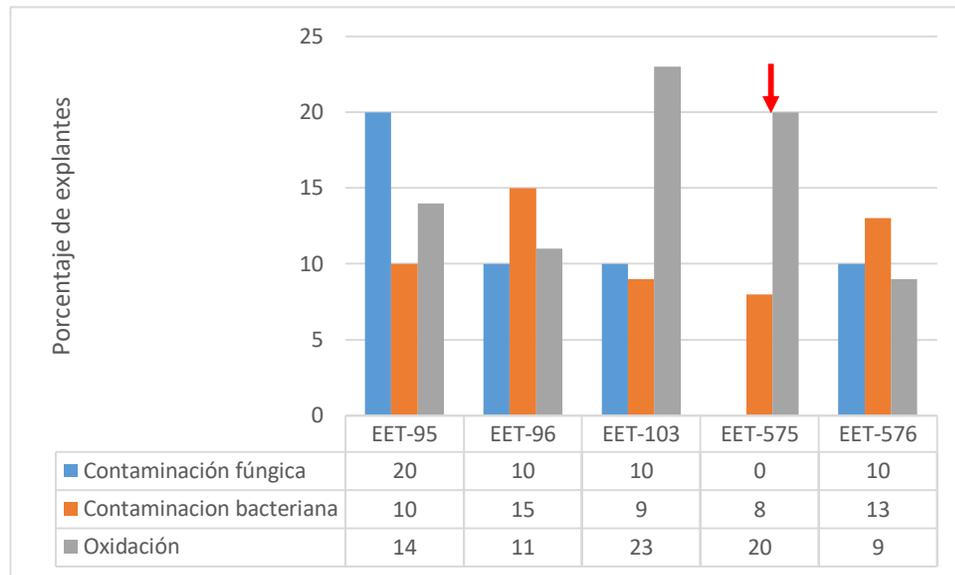


Figura 13. Gráfico de porcentajes de contaminación fúngica, contaminación bacteriana y oxidación encontrados en los clones de cacao fino de aroma EET-95, EET-96, EET-103, EET-575 y EET-576.

Para determinar si existen diferencias significativas entre los distintos clones de cacao fino de aroma con respecto a las variables contaminación fúngica, bacteriana y oxidación se procedió a realizar un análisis de varianza ANOVA (Tabla 13). En el caso de la variable contaminación fúngica el valor de $p= 0,0002$ indica que existen diferencias significativas entre los clones, mientras que en las variables contaminación bacteriana y oxidación no se observaron diferencias significativas.

Tabla 13.

Pruebas estadísticas realizadas a los resultados obtenidos en la etapa de desinfección de los clones de cacao EET-95, EET-96, EET-103, EET-575 Y EET-576.

Variable	ANOVA (p-valor)	Shapiro Wilks (p-valor)	Kruskal Wallis (p-valor)
Contaminación fúngica	0,002	<0,0001	0,002
Contaminación Bacteriana	0,5975	<0,0001	0,5959
Oxidación	0,0434	<0,0001	0,0441

Mediante la prueba de Shapiro Wilks (modificado) se analizó si los datos de desinfección siguen una distribución normal. En el Tabla 13 se puede observar la prueba de Shapiro Wilks (modificado) en la cual se registra un valor de $p < 0,0001$ en las tres variables examinadas, por lo cual se rechaza la hipótesis de que los datos siguen una distribución normal. Debido a que los datos no son normales, se realizó un análisis de varianza no paramétrico mediante la prueba de Kruskal Wallis, cuyo valor de $p = 0,0002$ en la variable contaminación fúngica mostró que existen diferencias significativas entre los tratamientos. Sin embargo en las variables contaminación bacteriana y oxidación no se observaron diferencias significativas entre los cinco genotipos.

En el análisis de rangos de Kruskal Wallis de la variable contaminación fúngica se observa que el clon EET-575 presenta el menor valor de rango ubicándose en el subconjunto A, a diferencia de los otros tratamientos que pertenecen a los subgrupos AB (EET-96, EET-576, EET-103) y al B (EET-95).

Tabla 14.

Pruebas de Kruskal Wallis realizada a los resultados obtenidos de la variable contaminación fúngica de los clones de cacao EET-95, EET-96, EET-103, EET-575 Y EET-576.

Clon	Variable Contaminación fúngica		
	Media	Rango	
EET-575	0,00	225,50	A
EET-96	0,10	250,50	AB
EET-576	0,10	250,50	AB
EET-103	0,10	250,50	AB
EET-95	0,20	275,50	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

3.2 Inducción de callo

A los 15 días de iniciado el ensayo se observaron cambios morfológicos en los estaminoides cuya coloración se tornó rojiza y se empezó a observar callo con una coloración blanquecina o amarilla (Figura 14). Luego del periodo de incubación de 25 días se evaluó la presencia de callo y el porcentaje de formación de callo en los estaminoides de los distintos tratamientos, en los cuales los cambios morfológicos variaron en los diferentes genotipos de cacao mostrando un mayor o menor volumen de callo.

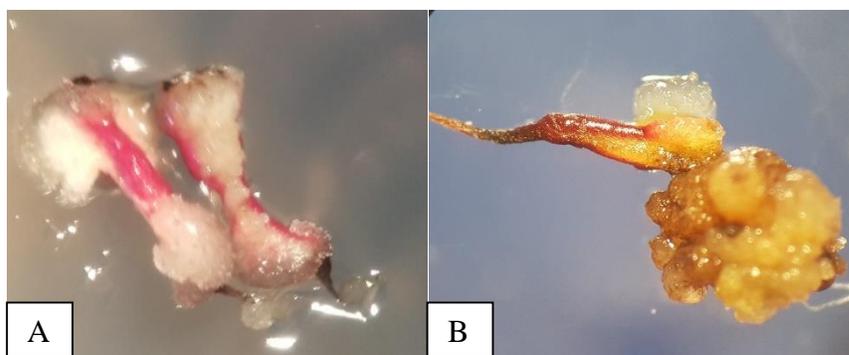


Figura 14. Desarrollo de callo en los estaminoides a los 15 días. A. Callo con coloración amarilla. B. Callo con coloración blanquecina.

El porcentaje de formación de callo se valoró de forma cualitativa tomando como referencia el porcentaje de superficie que se encontraba recubierta por callo a los 25 días de iniciado el ensayo. Para evaluar el porcentaje de callo se asignó el valor de 0 a los explantes sin callo, el valor 1 a los explantes un 25% de recubrimiento de callo, 2 a los explantes con 50% de la superficie cubierta por callo, 3 a los explantes con el 75% de recubrimiento con callo y 4 a los explantes cuya superficie estaba recubierta en un 100% por callo (Figura 15).

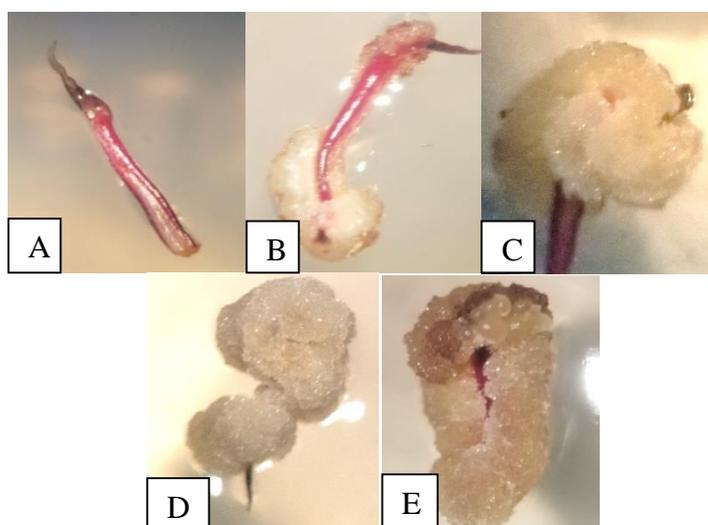


Figura 15. Porcentaje de formación de callo en los estaminoides. A) Estaminoides sin presencia de callo. B) Estaminoides con 25% de callo. C) Estaminoides con 50% de callo. D) Estaminoides con 75% de callo. E) Estaminoides con 100% de callo

Los resultados obtenidos durante la evaluación de las variables presencia de callo y porcentaje promedio de formación de callo se detallan en la Tabla 15.

Tabla 15.

Resultados de las variables analizadas en la etapa de inducción de callo de los clones de cacao fino de aroma EET-95, EET-96, EET-103, EET-575 y EET-576.

Clon de cacao	Variables	
	Presencia de callo (%)	Formación de callo (%)
EET-95	82	56,5
EET-96	88	44,5
EET-103	64	34,5
EET-575	70	40
EET-576	62	25,5

El genotipo de cacao EET-96 presentó el porcentaje de explantes con callo más alto (88%), seguido del clon EET-95 (82%) (Tabla 13). Mientras que los clones EET-576 y EET-575 mostraron los porcentajes de explantes con callo más bajos 62 y 64% respectivamente.

Al analizar la media del porcentaje de formación de callo (Tabla 15) se observó que el clon EET-95 obtuvo el mayor porcentaje de callo, seguido del clon EET-96, mientras que el clon EET-576 presentó la media de porcentaje de callo más baja. En la figura 16 se puede observar de forma gráfica las variables de respuesta en los cinco clones de cacao fino de aroma.

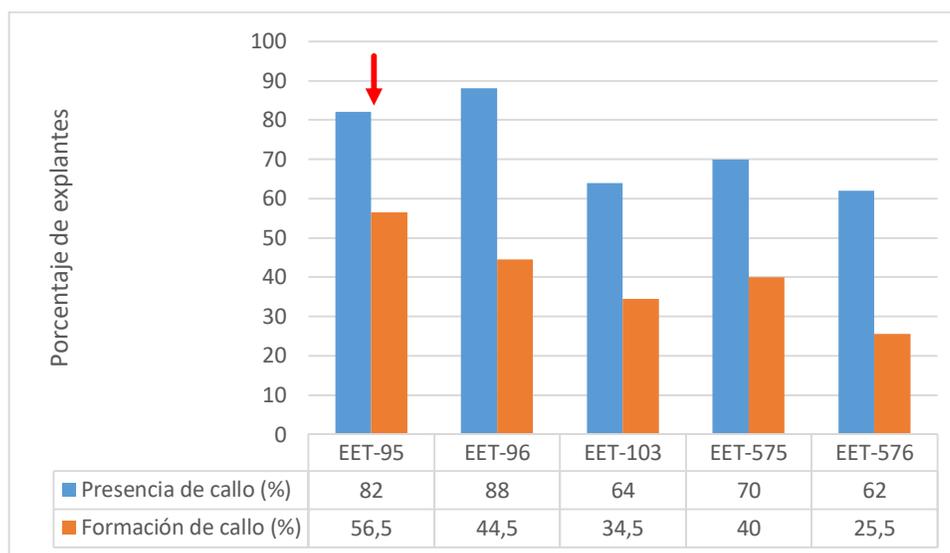


Figura 16. Gráfico de porcentaje de presencia de callo y porcentaje promedio de formación de callo encontrados en los clones de cacao fino de aroma EET-95, EET-96, EET-103, EET-575 y EET-576.

La tabla 16 muestra el análisis de contingencia para la variable porcentaje de formación de callo con respecto a los cinco clones de cacao fino de aroma. El genotipo de cacao EET-95 fue el que presentó el mayor número de explante con un 100% de callo en su superficie, seguido del clon EET-103 mientras que el clon EET-576 presentó el menor número de explantes con un porcentaje de callo del 100%. Al analizar el número de explante con un 75% de callo se observó que las variedades EET-575 y EET-96 presentaron el mayor número de explantes. El clon EET-95 presentó mayor cantidad de explantes con un 50% de callo mientras que el clon EET-96 destacó con el mayor número de explantes con 25% de callo. En contraste el clon EET-576 se caracterizó por poseer el mayor número de explantes sin callo.

Tabla 16.

Tabla de contingencia para la variable porcentaje de formación de callo de los clones de cacao fino de aroma EET-95, EET-96, EET-103, EET-575 y EET-576.

Clon de cacao	Porcentaje de callo					Total
	0%	25%	50%	75%	100%	
EET-103	18	14	8	1	9	50
EET-575	15	12	8	8	7	50
EET-576	19	16	11	3	1	50
EET-95	9	7	14	2	18	50
EET-96	6	21	8	8	7	50
Total	67	70	49	22	42	250

La tabla 16 está representada gráficamente en la figura 17 que muestra el número de explantes con los distintos porcentajes de callo evaluados.

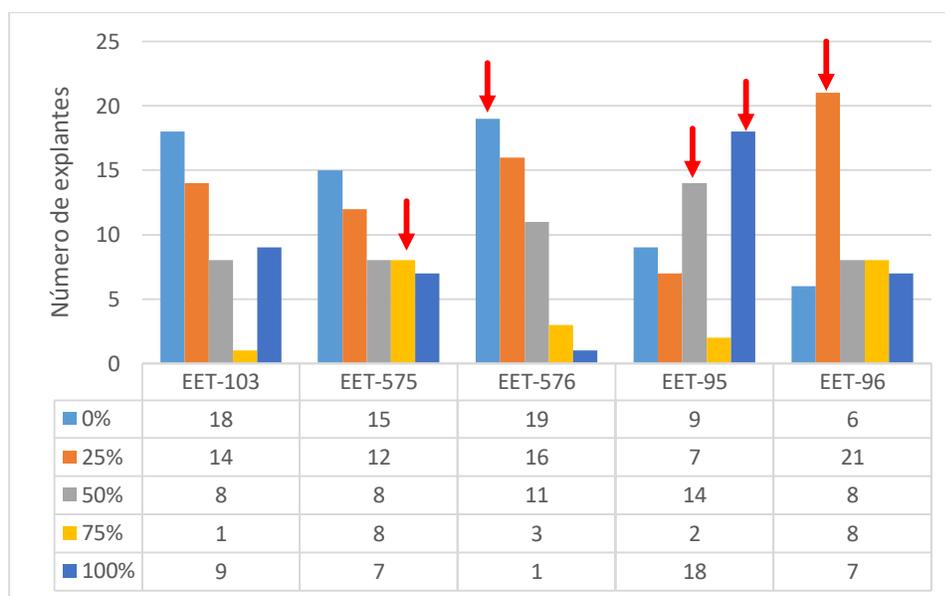


Figura 17. Número de explantes con los porcentajes de callo del 0%, 25%, 50%, 75% y 100% encontrados en los clones de cacao fino de aroma EET-95, EET-96, EET-103, EET-575 y EET-576.

Al analizar las dos variables de forma conjunta se observa que el clon que mejor respondió a la etapa fue el clon EET-95, al presentar los mayores porcentajes de explantes con presencia de callo y porcentaje de formación de callo.

Para determinar si existen diferencias significativas entre los distintos clones de cacao fino de aroma con respecto a las variables presencia de callo y porcentaje de formación de callo se procedió a realizar un análisis de varianza ANOVA (Tabla 17). En ambas variables el valor de p fue menor al nivel de significancia de la prueba ($\alpha=5\%$), lo cual evidencia que existen diferencias significativas entre los clones.

Para verificar si los datos de inducción de callo siguen una distribución normal se utilizó la prueba de Shapiro Wilks (modificado). En la Tabla 17 se observan los resultados de la prueba de Shapiro Wilks (modificado) en la cual se registra un valor de $p < 0,0001$ en las variables examinadas, por lo cual se rechaza la hipótesis de que los datos siguen una distribución normal. Debido a que los datos no son normales, se realizó un análisis de varianza no paramétrico mediante la prueba de Kruskal Wallis, en la cual se obtuvo un valor de p menor al nivel de significancia en ambas variables, comprobando así que existen diferencias significativas entre los cinco genotipos de cacao fino de aroma.

Tabla 17.

Pruebas estadísticas realizadas a los resultados obtenidos en la etapa de inducción de callo de los clones de cacao EET-95, EET-96, EET-103, EET-575 Y EET-576.

Variable	ANOVA (p-valor)	Shapiro Wilks (p-valor)	Kruskal Wallis (p-valor)
Presencia de callo	0,0098	<0,0001	0,0107
Formación de callo	0,0002	<0,0001	0,0004

En la tabla 18 se presenta el análisis de rangos de Kruskal Wallis de las variables presencia de callo y porcentaje de formación de callo, se puede observar que el clon EET-96 presenta una media de 0,88 en porcentaje de explantes con presencia de callo, además posee el mayor valor de rango ubicándose en el subconjunto B, a diferencia de los otros tratamientos que pertenecen a los subgrupos AB (EET-575 y EEE-95) y al A (EET-576 y EET-103), evidenciando así que existe una diferencia significativa entre este y los demás tratamientos.

En el análisis de rangos del porcentaje de formación de callo se observa que el clon EET-95 posee una media de 56,50 en porcentaje de formación de callo y presenta el menor valor de rango ubicándose en el subconjunto C, a diferencia de los otros tratamientos que ubican en los subconjuntos A (EET-576), subconjunto AB (EET-103 y EET-575) y subconjunto BC (EET-96) por lo cual se evidencia que existen diferencias significativas en los tratamientos.

Tabla 18.

Pruebas de Kruskal Wallis realizada a los resultados obtenidos de las variables presencia de callo y porcentaje de formación de callo de los clones de cacao EET-95, EET-96, EET-103, EET-575 Y EET-576.

Clon	Presencia de callo			Formación de callo		
	Media	Rango		Media	Rango	
EET-576	0,62	111,50	A	25,50	97,80	A
EET-103	0,64	114,00	A	34,50	112,12	AB
EET-575	0,70	121,50	AB	40,00	124,45	AB
EET-95	0,82	136,50	AB	56,50	156,35	C
EET-96	0,88	144,00	B	44,50	136,78	BC

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

3.3 Obtención Proembriones y embriones somáticos primarios

Luego del periodo de incubación de 30 días se observaron cambios morfológicos en los callos cuya coloración se tornó café y sobre el mismo se empezaron a observar masas proembriónicas con una coloración lechosa como se puede ver en la Figura 18.

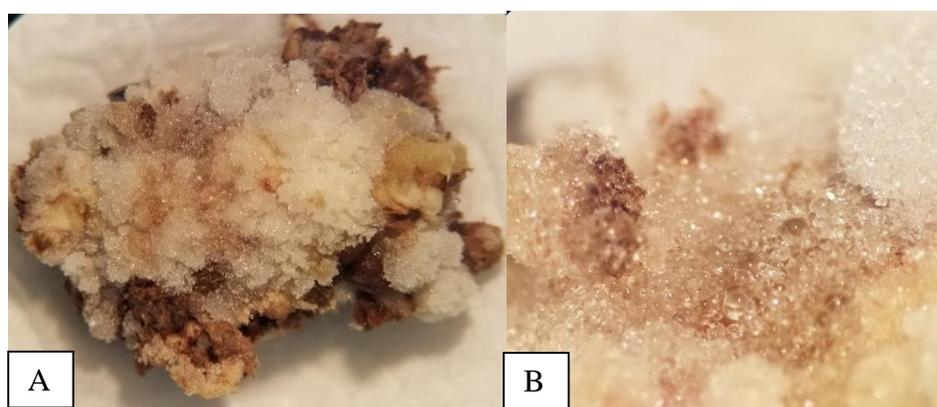


Figura 18. Desarrollo de proembriones en los callos a los 30 días de permanencia en el medio ED. A) Callo con proembriones. B) Masas proembriónicas.

Durante la etapa de obtención de proembriones se evaluó la presencia de proembriones y el porcentaje de formación de proembriones en los callos de los distintos clones de cacao fino de aroma. Para evaluar el porcentaje de formación de proembriones se asignó el valor de 0 a los explantes sin proembriones, el valor 1 a los explantes un 25% de recubrimiento de proembriones, 2 a los explantes con 50% de la superficie cubierta por proembriones, 3 a los explantes con el 75% de recubrimiento con proembriones y 4 a los explantes cuya superficie estaba recubierta en un 100% por proembriones. Los resultados obtenidos en esta etapa se detallan en la tabla 19.

Tabla 19.

Resultados de las variables analizadas en la etapa de inducción de los clones de cacao fino de aroma EET-95, EET-96, EET-103, EET-575 y EET-576.

Clon de cacao	Variables	
	Presencia de proembriones (%)	Formación de proembriones (%)
EET-95	92	52
EET-96	96	62
EET-103	66	35,5
EET-575	78	54
EET-576	86	56

El genotipo de cacao EET-96 presentó el porcentaje de presencia de callos con proembriones más alto (96%), seguido del clon EET-95 (92%), mientras que el clon EET-103 mostró el porcentaje más bajo 66%. Al analizar la media del porcentaje de formación de proembriones se observa que el clon EET-96 posee el mayor porcentaje de proembriones, seguido del clon EET-576, mientras que el clon EET-103 tiene la media de porcentaje de proembriones más baja. En la figura 19 se pueden observar gráficamente estos resultados.

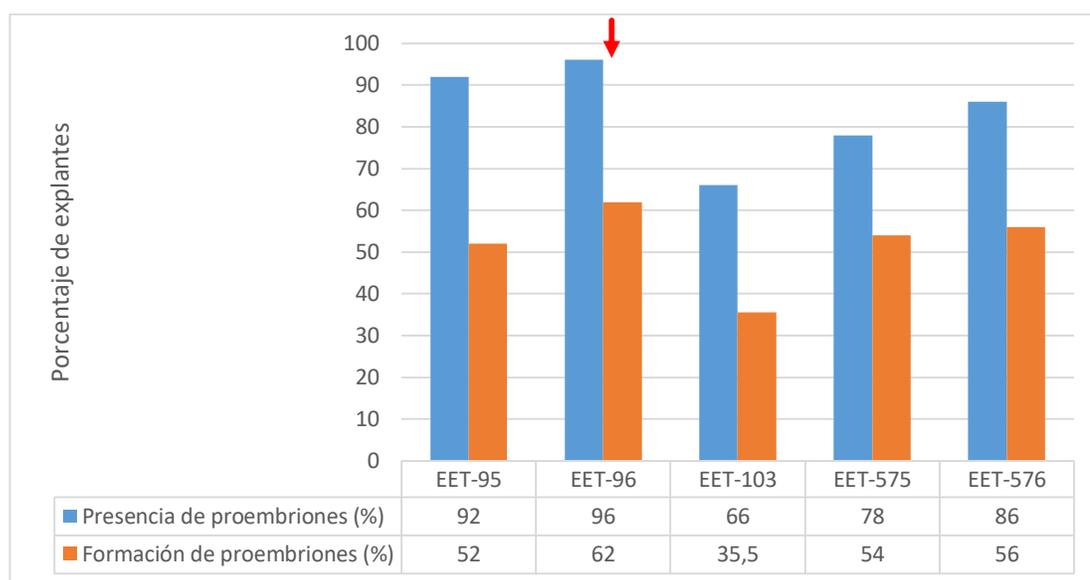


Figura 19. Gráfico de porcentaje de presencia de proembriones y porcentaje promedio de formación de proembriones encontrados en los clones de cacao fino de aroma EET-95, EET-96, EET-103, EET-575 y EET-576.

La tabla 20 muestra el análisis de contingencia para la variable porcentaje de formación de proembriones con respecto a los cinco clones de cacao fino de aroma. El genotipo de cacao EET-96 fue el que presentó el mayor número de explante con un 100% de proembriones en su superficie, seguido del clon EET-575 mientras que el clon EET-103 presentó el menor número de explantes con un porcentaje de proembriones del 100%. Al analizar el número de explante con un 75% de proembriones se observó que las variedades EET-575 y EET-576 presentaron el mayor número de explantes. El clon EET-96 presentó mayor cantidad de explantes con un 50% de proembriones mientras que el clon EET-95

destacó con el mayor número de explantes con 25% de proembriones. En contraste el clon EET-103 se caracterizó por poseer el mayor número de explantes sin proembriones.

Tabla 20.

Tabla de contingencia para la variable porcentaje de formación de proembriones de los clones de cacao fino de aroma EET-95, EET-96, EET-103, EET-575 y EET-576

Clon de cacao	Porcentaje de formación de proembriones					Total
	0%	25%	50%	75%	100%	
EET-103	17	13	9	4	7	50
EET-575	11	7	7	13	12	50
EET-576	7	9	10	13	11	50
EET-95	4	15	15	5	11	50
EET-96	2	9	16	9	14	50
Total	41	53	57	44	55	250

La tabla 20 está representada gráficamente en la figura 20 que muestra el número de explantes con los distintos porcentajes de proembriones evaluados.

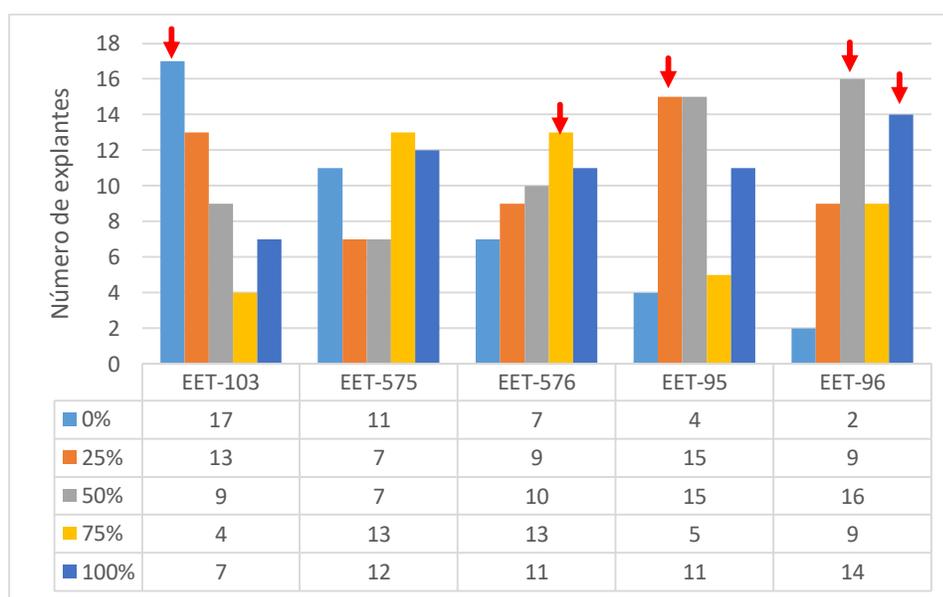


Figura 20. Número de explantes con los porcentajes de formación de proembriones del 0%, 25%, 50%, 75% y 100% encontrados en los clones de cacao fino de aroma EET-95, EET-96, EET-103, EET-575 y EET-576.

Al analizar las dos variables de forma conjunta se observa que el clon que mejor respondió a la etapa fue el clon EET-96 al presentar los mayores porcentajes de explantes con presencia de proembriones y porcentaje de formación de proembriones.

Para determinar si existen diferencias significativas entre los distintos clones de cacao fino de aroma con respecto a las variables analizadas se efectuó un análisis de varianza ANOVA (Tabla 21), como resultado del análisis se evidenció que existen diferencias significativas entre los genotipos.

Mediante la prueba de Shapiro Wilks (modificado) se verificó si los datos de obtención de proembriones siguen una distribución normal. En la Tabla 21 se observan los resultados de la prueba de Shapiro Wilks (modificado) en la cual se registra un valor de $p < 0,0001$ en las variables examinadas, por lo cual se rechaza la hipótesis de que los datos siguen una distribución normal. Debido a que los datos no son normales, se realizó un análisis de varianza no paramétrico mediante la prueba de Kruskal Wallis, en la cual se obtuvo un valor de p menor al nivel de significancia en ambas variables, comprobando así que existen diferencias significativas entre los cinco genotipos de cacao fino de aroma.

Tabla 21.

Pruebas estadísticas realizadas a los resultados obtenidos en la etapa de obtención de proembriones de los clones de cacao EET-95, EET-96, EET-103, EET-575 Y EET-576.

Variable	ANOVA (p-valor)	Shapiro Wilks (p-valor)	Kruskal Wallis (p-valor)
Presencia de proembriones	0,0003	<0,0001	0,0004
Formación de proembriones	0,0023	<0,0001	0,0026

En el análisis de rangos de Kruskal Wallis de la variable presencia de proembriones se observa que el clon EET-96 posee una media de 0,96 y presenta el mayor valor de rango ubicándose en el subconjunto B al igual que el clon EET-95, a diferencia de los otros tratamientos que pertenecen a los subgrupos AB (EET-575 y EET-576) y al A (EET-103), comprobando así que existe una diferencia significativa entre este y los demás tratamientos (Tabla 22).

Al examinar el porcentaje de formación de proembriones se observa que el clon EET-96 presenta el menor valor de rango ubicándose en el subconjunto B, sin embargo no se presentaron diferencias significativas entre este clon y los genotipos EET-95, EET-575 y EET-576 ya que pertenecen al mismo subconjunto, en contraste con el genotipo EET-103 que se ubica en el subconjunto A.

Tabla 22.

Pruebas de Kruskal Wallis realizada a los resultados obtenidos de las variables presencia de proembriones y porcentaje de formación de proembriones de los clones de cacao EET-95, EET-96, EET-103, EET-575 Y EET-576.

Clon	Presencia de proembriones			Formación de proembriones		
	Media	Rango		Media	Rango	
EET-103	0,66	103,50	A	35,50	92,06	A
EET-575	0,78	118,50	AB	54,00	125,39	B
EET-576	0,86	128,50	AB	56,00	129,99	B
EET-95	0,92	136,00	B	52,00	133,95	B
EET-96	0,96	141,00	B	62,00	146,11	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

En fase de obtención de embriones somáticos primarios se evaluó el número de callos con embriones somáticos y el número de embriones somáticos. Los callos con embriones somáticos se caracterizaron por la coloración café en todo el callo o en el área circundante a los embriones somáticos cambios como se puede ver en la Figura 21.

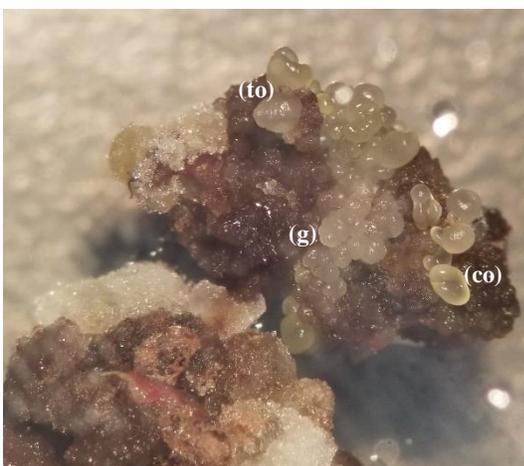


Figura 21. Callo con presencia de embriones somáticos en estadio globular (g),

torpedo (to) y corazón (co) a los 60 días de cultivo en el medio ED.

En el ensayo de embriogénesis somática se observaron embriones somáticos primarios en los estadios globular (g), torpedo (to), corazón (co) y cotiledonar (c) de los clones de cacao fino de aroma EET-103,EET-575 y EET-95, como se observa en la figura 22.

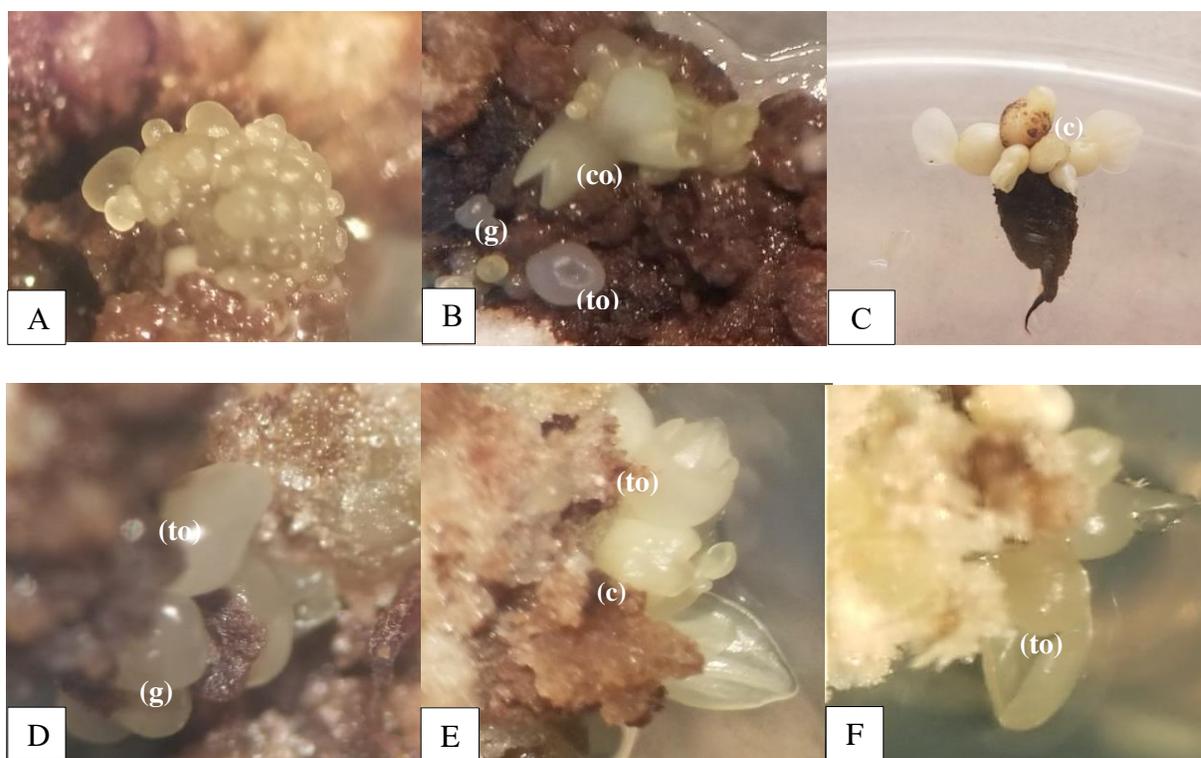


Figura 22. Estadios de embriones somáticos .A) Embriones somáticos del clon EET-103 en estado globular. B) Embriones somáticos del clon EET-103 en estado globular (g), estado torpedo (to) y estado corazón (co). C) Embriones somáticos del clon EET-103 en estado cotiledonar (c). D) Embriones somáticos de Clon EET-95 en estado globular (g). E,F) Embriones somáticos de clon EET-575 en estados torpedo (to) y corazón (co) a los 60 días de cultivo en el medio ED.

El genotipo de cacao EET-103 presentó el mayor número de callos embriogénicos, seguido del clon EET-575 (Tabla 23). Mientras que los clones EET-96 y EET-576 no mostraron presencia de callos con embriones somáticos primarios. Al evaluar el número de embriones somáticos se observó que el genotipo de cacao EET-103 presentó el mayor número de embriones somáticos primarios (41), seguido del clon EET-575 que presentó 11 embriones somáticos, mientras que en el clon EET-95 solo se produjeron 7 embriones somáticos primarios. En la figura 23 se observa gráficamente el número de embriones que se obtuvo en cada genotipo de cacao fino de aroma.

Tabla 23.

Resultados de las variables analizadas en la etapa de inducción de los clones de cacao fino de aroma EET-95, EET-96, EET-103, EET-575 y EET-576.

Clon de cacao	Variables	
	Número de callos con embriones somáticos	Número de embriones somáticos
EET-95	2	7
EET-96	0	0
EET-103	6	41
EET-575	3	11
EET-576	0	0

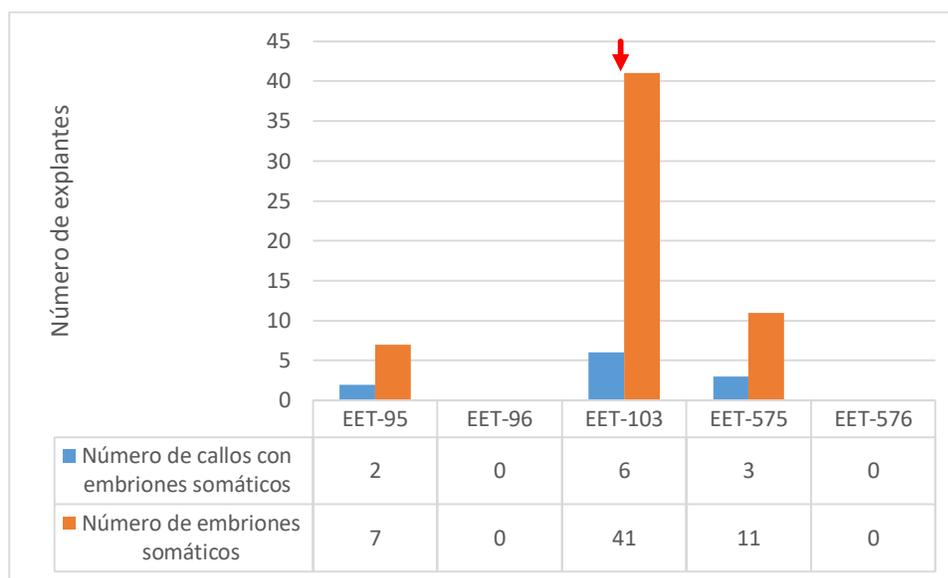


Figura 23. Gráfico de número de callos con embriones somáticos y número de embriones somáticos primarios obtenidos en los clones de cacao fino de aroma EET-95, EET-96, EET-103, EET-575 y EET-576.

Al analizar la media de embriones por explante se observó que el clon EET-103 obtuvo una media de 6,83, la media del clon EET-575 fue de 3,66 y la del clon EET-95 fue de 3,5. Por lo cual el clon EET-103 destacó al presentar la mayor media por explante además del mayor número de embriones en un explante (14) (Tabla 24).

Tabla 24.

Resumen de medidas estadísticas para la variable número de embriones somáticos respecto a los clones de cacao fino de aroma EET-95, EET-96, EET-103, EET-575 y EET-576.

Clon de cacao	Número de explantes	Media	D.E.	Mín	Máx	Total de embriones
EET-103	6	6,8333	5,0365	1	14	41
EET-575	3	3,6666	2,0816	2	6	11
EET-95	2	3,5	2,1213	2	5	7

Al analizar las dos variables de forma conjunta se observa que el clon que mejor respondió a la etapa de embriogénesis fue el clon EET-103 ya que presentó el mayor número de callos con embriones y el mayor número de embriones somáticos primarios (Figura 26).

Para determinar si existen diferencias significativas entre los distintos clones de cacao fino de aroma con respecto a las variables analizadas se realizó un análisis de varianza ANOVA (Tabla 24). Como resultado del análisis se obtuvo que en la variable número de callos con embriones existen diferencias significativas entre los genotipos, sin embargo en la variable número de embriones se obtuvo un valor de $p = 0,4760$ que indica que no existen diferencias significativas entre los clones de cacao fino de aroma examinados.

Para comprobar el supuesto de normalidad en los datos de obtención de embriones se utilizó la prueba de Shapiro Wilks (modificado). En la Tabla 25 se observan los resultados de la prueba de Shapiro Wilks (modificado) en la cual se registra un valor de $p < 0,0001$ en la variable número de callos con embriones, sin embargo el valor de p para la variable número de embriones somáticos primarios fue de $0,4760$, por lo cual en el primer caso se rechaza la

hipótesis de que los datos siguen una distribución normal mientras que en la variable número de embriones se acepta el supuesto de normalidad. Debido a que los datos de número de callos con embriones no son normales, se realizó un análisis de varianza no paramétrico mediante la prueba de Kruskal Wallis, en la cual se obtuvo un valor de p menor al nivel de significancia en ambas variables, comprobando así que existen diferencias significativas entre los cinco genotipos de cacao fino de aroma con respecto a la variable número de callos con embriones.

Tabla 25.

Pruebas estadísticas realizadas a los resultados obtenidos en la etapa de obtención de embriones de los clones de cacao EET-95, EET-96, EET-103, EET-575 Y EET-576.

Variable	ANOVA (p-valor)	Shapiro Wilks (p-valor)	Kruskal Wallis (p-valor)
Número de callos con embriones	0,0182	<0,0001	0,0194
Número de embriones somáticos	0,4760	<0,0001	-

En la Tabla 26 se puede observar el análisis de rangos del variable número de callos con embriones, en el cual se observa que el clon EET-103 posee una media de 0.12 y presenta el mayor valor de rango, por lo cual este clon es el que mejor responde al medio de desarrollo de embriones ED. Sin embargo los subconjuntos se evidencia que medias de todos los genotipos de cacaos analizados no son significativamente diferentes ya que pertenecen al mismo subconjunto (Tabla 26).

Tabla 26.

Pruebas de Kruskal Wallis realizada a los resultados obtenidos de la variable número de callos con embriones de los clones de cacao EET-95, EET-96, EET-103, EET-575 Y EET-576.

Clon	Número de callos con embriones		
	Media	Rango	
EET-96	0,00	120,00	A
EET-576	0,00	120,00	AB
EET-95	0,04	125,00	AB
EET-575	0,06	127,50	B
EET-103	0,12	135,00	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

3.4 Multiplicación de proembriones

Una vez obtenidos los proembriones de cacao fino de aroma en medio de cultivo semisólido ED se procedió a realizar la multiplicación de los mismos en medio de cultivo líquido, para esto se elaboró el mismo medio ED sin la adición de agar y se establecieron las suspensiones proembriones, colocando 5 grupos de proembriones en matraces de 25 mL de capacidad, con 5 mL de medio de cultivo en agitación constante (110 rpm), realizándose recambio de medio fresco cada 15 días.

Al examinar la morfología de las células en el microscopio óptico a los 15 días se observaron células redondas con citoplasma denso, núcleo grande con formación de agregados celulares los cuales se incrementaron a medida que aumentó el crecimiento celular en la suspensión (Figura 24).

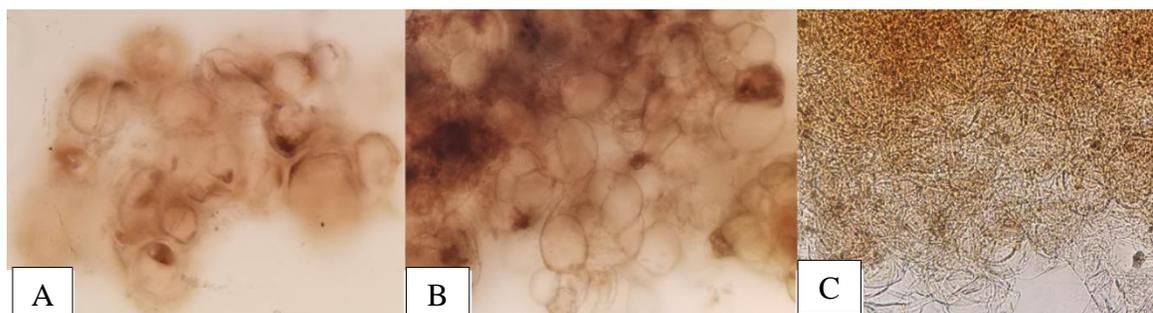


Figura 24. Morfología de las células en suspensión. A) Observación a las 2 semanas (40X) .B) Observación al mes (40X) C) Observación a los 2 meses (40X).

Para determinar la cinética de crecimiento celular de cada genotipo, se midió el volumen de células sedimentadas cada 15 días y se realizó 3 repeticiones por genotipo, obteniendo los datos de la tabla 27. En la figura 25 se puede observar las curvas de cinética celular generadas a partir de los datos de volumen de células sedimentadas.

Tabla 27.

Datos de volumen de células de sedimentadas (%) de los clones de cacao fino de aroma EET-95, EET-96, EET-103, EET-575 y EET-576.

Volumen de células sedimentadas VCS (%)					
Tiempo (días)	EET-95	EET-96	EET-103	EET-575	EET-576
0	0,6	0,6	0,4	0,6	0,6
0	0,4	0,6	0,6	0,6	0,6
0	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6
15	0,6	0,7	0,4	0,9	0,7
15	0,5	0,6	0,6	0,7	0,8
15	0,6	0,6	0,7	0,8	0,7
30	0,8	0,9	0,6	1,2	1
30	0,5	0,8	0,8	0,9	1,2
30	0,7	0,8	0,8	1,2	1
60	1	0,9	0,8	1,6	1,5

Continúa →

60	0,6	0,8	0,8	1,2	1,6
60	0,7	1	0,9	1,6	1,2
75	1	0,9	0,8	1,6	1,7
75	0,7	1	0,8	1,4	2
75	0,7	1	1	1,6	1,4
90	1	0,9	0,9	1,8	1,8
90	0,7	1	0,8	1,4	2
90	0,7	1	1	1,6	1,4

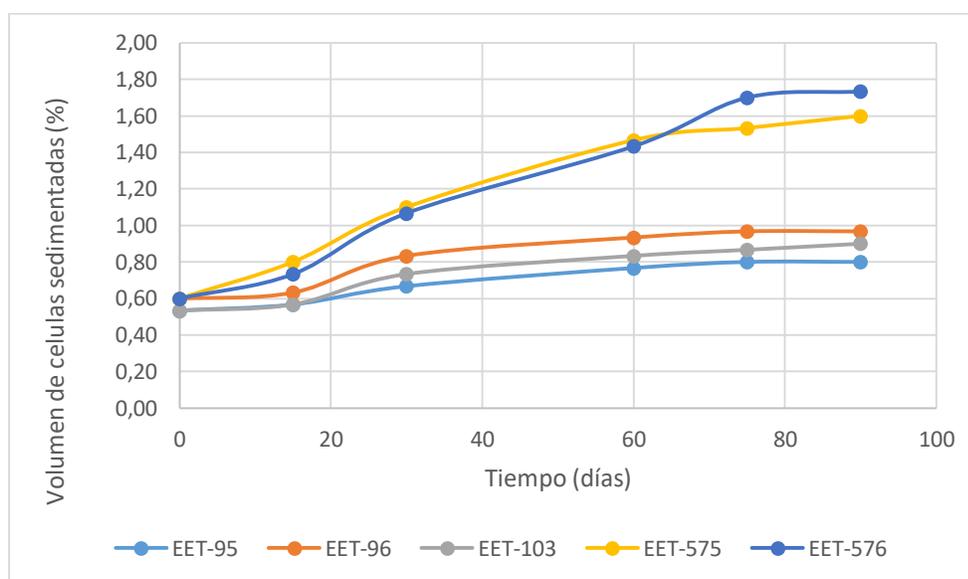


Figura 25: Curva de cinética celular de los clones de cacao fino de aroma EET-95, EET-96, EET-103, EET-575 y EET-576.

Al analizar la curva de la cinética celular para el genotipo EET-95, se observó que existe un retraso en su etapa inicial hasta el día 15. Desde el día 15 hasta el 30, se percibe un crecimiento celular exponencial, durante el segundo mes el crecimiento se torna lineal. A partir del día 61 el crecimiento celular empieza de disminuir hasta llegar una fase estacionaria entre los días 75 y 90.

En el caso de la suspensión del clon EET-96, se observó un crecimiento celular bajo desde el día 0 hasta el día 15. A partir del día 16 el crecimiento celular aumenta alcanzando un máximo crecimiento entre los días 60 y 75. Desde el día 76 se observa que el crecimiento celular se encuentra en fase estacionaria.

En la suspensión de proembriones del clon EET-103 se observa un bajo crecimiento celular durante los primeros 15 días mientras que a partir del día 16 hasta el día 30 el crecimiento se torna exponencial y durante el segundo y tercer mes la suspensión muestra una cinética de crecimiento lineal.

La figura 25 muestra la curva de la cinética celular para el genotipo EET-575, se observó que este clon muestra un rápido crecimiento durante los primeros 2 meses, mientras que durante el tercer mes se evidencia una desaceleración progresiva en el crecimiento. En el caso de la suspensión del clon EET-576, se evidenció un crecimiento celular bajo desde el día 0 hasta el día 15. A partir del día 16 hasta el día 30 se da un crecimiento celular de tipo exponencial. Durante los siguientes 45 días el crecimiento se torna lineal alcanzando un máximo el día 75, a partir del cual crecimiento celular entra en fase estacionaria.

Al comparar la cinética celular entre los distintos genotipos analizados se evidencia un crecimiento celular similar en los tratamientos durante los primeros 15 días. A partir del día 16 el crecimiento celular es similar entre los clones EET-575 y EET-576, sin embargo difiere de los clones EET-95, EET-96 y EET-103 que muestran un crecimiento más lento. Además se observa que la suspensión del clon EET-576 muestra el mayor crecimiento celular al finalizar los 90 días de evaluación.

Para determinar si existen diferencias significativas entre los tratamientos, se realizó un análisis inferencial de los valores de volumen de células sedimentadas obtenidos para cada suspensión (Tabla 28). Tras realizar un análisis de varianza ANOVA, se obtuvo un valor de $p < 0,0001$, menor que el estadístico de prueba, por lo tanto se asevera que existen diferencia significativa entre los genotipos.

Tabla 28.

Pruebas estadísticas realizadas a los resultados obtenidos en la etapa de multiplicación de proembriones de los clones de cacao EET-95, EET-96, EET-103, EET-575 Y EET-576.

Variable	ANOVA (p-valor)	Shapiro Wilks (p-valor)
Número de callos con embriones	$p < 0,0001$	0,1306

Para verificar el supuesto de normalidad en los datos se realizó la prueba de Shapiro Wilks (modificado) cuyo valor de $p = 0,1306$ indicó que los datos siguen una distribución normal. Por lo que se procedió a realizar un análisis de medias de Turkey (Tabla 29), el cual mostró que existen diferencias significativas en la cinética de crecimiento de los cinco genotipos de cacao fino de aroma, ya que los clones EET-576 y EET-575 se encuentran en el subconjunto A al presentar una cinética de crecimiento semejante, mientras que los genotipos EET-96, EET-103 y EET-95 se encuentran en el subconjunto B.

Tabla 29.

Prueba medias de Turkey para la variable volumen de sedimentación celular de los clones de cacao EET-95, EET-96, EET-103, EET-575 Y EET-576.

Clon	Medias	N	E.E.	
EET-576	1,21	18	0,07	A
EET-575	1,18	18	0,07	A
EET-96	0,82	18	0,07	B
EET-103	0,74	18	0,07	B
EET-95	0,69	18	0,07	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN

En esta investigación se obtuvieron datos relacionados con la obtención de proembriones y embriones somáticos primarios de los clones de cacao fino de aroma EET-95, EET-96, EET-103, EET-575 y EET-576, con el objetivo de analizar la incidencia del genotipo en las distintas fases de embriogénesis somática y en la cinética de crecimiento celular.

4.1 Desinfección de explantes florales de *Theobroma cacao* L.

Al examinar la variable contaminación fúngica se observó que los porcentajes de contaminación fueron menores al 20%, sin embargo existieron diferencias significativas en la respuesta de los distintos genotipos al protocolo de desinfección. El genotipo EET-95 presentó el mayor porcentaje de contaminación (20%) mientras que el genotipo EET-575 presentó el 0% de contaminación. Según Freire (2013) el éxito de la etapa de desinfección depende de la selección de la planta madre la cual debe estar sana y libre de patógenos. En el caso de los clones EET-95 y EET-575 la principal diferencia entre los mismos reside en la susceptibilidad a enfermedades dado que el clon EET-95 es susceptible a enfermedades como mal de machete y monilia, ambas de origen fúngico. Mientras que el clon EET-575 al ser parte de la segunda generación de clones recomendados por INIAP es tolerante a las tres enfermedades de mayor incidencia en los cultivos de cacao como son escoba de bruja, mal de machete y monilia (Amores, Agama, Suarez, Quiroz, & Motato, 2009).

En la variable contaminación bacteriana los porcentajes de contaminación variaron del 8% al 15 %, sin embargo no se observaron diferencias significativas en los tratamientos. Resultados similares se observaron en la investigación realizada por Chantásig (2004) que al aplicar el mismo protocolo de desinfección a los clones de cacao PA169, SCA6 y UF273 obtuvo respuestas similares en los tres clones. Al comparar los datos de contaminación con los resultados obtenidos por Proaño (2015) se observa una disminución en los porcentajes de contaminación que alcanzaron el 40% en el ensayo realizado por Proaño, esta diferencia puede deberse a la época del año en la que se realizaron los distintos muestreos ya que según Gonzalez et al. (2005) los porcentajes de contaminación varían de acuerdo al grado de humedad que se presenta en los distintos meses del año.

Al examinar la variable oxidación se observó que los genotipos no presentaron diferencias significativas en los valores de las medias, por lo que en el análisis de rangos los cinco clones se ubicaron en el subconjunto A. En el estudio realizado por González et al. (2005) en tres variedades de café se observaron resultados similares ya que el porcentaje de oxidación no dependió de la variedad analizada sino de la época del año en la se realizó el muestreo.

4.2 Inducción de callo

En la etapa de inducción a callo los cinco genotipos evaluados indujeron callogénesis, sin embargo el análisis estadístico mostró que existieron diferencias significativas entre los tratamientos, dado que la respuesta en la fase de inducción a callo varió de acuerdo al clon, presentando mayor o menor cantidad de explantes con callo.

El genotipo de cacao EET-96 presentó el porcentaje de explantes con callo más alto (88%), mientras que los clones EET-576 y EET-103 mostraron los porcentajes de explantes con callo más bajos 62% y 64% respectivamente. Chanatásig (2004) al evaluar la callogenesis en los clones de cacao PA169, SCA6 y UF273 en el medio de inducción de callo (PCG), reportó que la respuesta al proceso de callogenesis puede variar dependiendo de los clones, el tipo de explante y las condiciones de cultivo. Estas diferencias en la respuesta callogénica se han observado en diversas investigación tanto en cacao (Li, Traore, Maximova, & Guiltinan, 1998; Pence, 1995.; López, Moreno, & Pacheco, 2001) como en café (*Coffea* spp.) (Etienne, Barry-Etienne, Vásquez, & Berthouly, 1999; Sreenath, Shanta, Harinat, & Naidu, 1995).

Durante el período de incubación se observaron cambios morfológicos en los estaminoides, presentando callos de distinta coloración, textura y volumen. Chanatásig (2004) menciona que un tipo de callo no es distintivo de un determinado explante o tratamiento, además pueden presentarse diversos tipos de callo en un explante (Aguilar, 1990). Li et al. (1998) indican que las distintas respuestas en la formación de callo pueden deberse al uso del TDZ en el medio cultivo PCG, ya que se ha observado que el mismo genera respuestas variadas durante el desarrollo de callo, además las mismas varían de acuerdo al genotipo.

Esta variación en el desarrollo del callo dependiente del genotipo se observa al analizar los porcentajes de callo en los explantes. Predominando el clon de cacao EET-95 en la categoría de explantes con 100% de callo, al presentar 18 explantes con este nivel de callo. Mientras que al analizar el número de explantes con un 75% de callo se observó que las

variedades EET-575 y EET-96 presentaron el mayor número de explantes. En la categoría de 50 % de callo destacó el clon EET-95 con 14 explantes con este porcentaje de callo, mientras que el clon EET-96 presentó el mayor número de explantes con 25% de callo. En contraste el clon EET-576 se caracterizó por poseer el mayor número de explantes sin callo.

Al analizar la media del porcentaje de formación de callo se observó que el clon EET-95 posee el mayor porcentaje de callo, seguido del clon EET-96, mientras que el clon EET-576 tiene la media de porcentaje de callo más baja. En la investigación de Adu-Ampomah et al. (1988), también se reportó la existencia de diferencias en la producción de callo las cuales están dadas por el efecto del genotipo y el medio de cultivo.

Los porcentajes de callo se estudiaron con el fin de analizar la relación entre el desarrollo del callo y la respuesta embriogénica en los estaminoide. Por lo cual los resultados obtenidos serán comparados posteriormente con la respuesta embriogénica de los explantes.

4.3 Obtención Proembriones y embriones somáticos primarios

A los 30 días de que los callos fueron transferidos al medio ED se observó que los mismos tomaron una coloración blanca en las áreas con presencia de proembriones, además muchos en los clones EET-103, EET-575 y EET-95 se observó un necrosamiento no sincronizado que ocasionó el cese de crecimiento en el callo. Mientras que en los clones EET-96 y EET-576 el callo continuó creciendo, formando gran cantidad de proembriones pero sin llegar a formar embriones somáticos primarios. Adu-Ampomah (1988) menciona

que el crecimiento excesivo del callo es el mayor cuello de botella en el proceso embriogénesis somática.

Al examinar los porcentajes de explantes con proembriones se observó que existieron diferencias significativas en la respuesta de los clones. El genotipo de cacao EET-96 presentó el porcentaje de callo proembriogénico más alto (96%), seguido del clon EET-95 (92%), mientras que el clon EET-103 mostró el menor porcentaje de callo con proembriones (66%).

En el análisis del porcentaje de formación de proembriones se encontró que el clon EET-96 destacó en la categoría de callo con 100% de proembriones en su superficie mientras que el clon EET-103 tuvo el menor número de explantes con un porcentaje de proembriones del 100%. En la categoría de 75% de proembriones se observó que los genotipos EET-575 y EET-576 presentaron el mayor número de explantes, mientras que el clon EET-96 presentó mayor cantidad de explantes con un 50% de proembriones. En la categoría de 25% de proembriones predominó el genotipo EET-95 a diferencia del clon EET-103 que se caracterizó por poseer el mayor número de explantes sin proembriones.

Al comparar las medias del porcentaje de formación de proembriones se observa que el clon EET-96 posee el mayor porcentaje de proembriones, seguido del clon EET-576, mientras que el clon EET-103 tiene la media de porcentaje de proembriones más baja. Sin embargo los resultados de producción de embriones somáticos primarios mostraron el genotipo EET-103 posee el mayor potencial embriogénico al presentar tanto el mayor número de explantes con embriones como la mayor cantidad de embriones (41), mientras que los clones EET-576 y EET-96 no presentaron embriones somáticos primarios. Estos

resultados difieren de los obtenidos en la investigación realizada por Guillou et al. (2018) quienes lograron obtener embriones somáticos en el clon EET-96, esta diferencia en el potencial embriogénico de este clon puede deberse a la composición del medio de desarrollo de embriones en el cual se cambió los macronutrientes del medio DKW por los macronutrientes del medio MS, se agregó sulfato de adenina al medio lo que pudo ocasionar la variación en la respuesta embriogénica.

Una característica común entre los clones EET-103, EET-575 y EET-95 fue que los embriones somáticos se generaron en los callos color café oscuro que presentaban necrosis, mientras que los callos blancos que a pesar de poseer mayor volumen no desarrollaron embriones somáticos primarios. Quirós (2013) reportó resultados semejantes al evaluar los protocolos Nestlé (NT) y Penn State University (PSU) en los clones de cacao CATIE-R1, CATIE-R4, CATIE-R6, CC-137, ICS-95 T1, PMCT-58 y UF-273 T1.

Alemano et al. (1996) indica que la coloración café en los callos se debe a la acumulación de compuestos fenólicos, los cuales pueden actuar como compuestos inductores o inhibidores del proceso de embriogénesis somática (Quiroz-Figueroa, Mendez-Zeel, Larque-Saavedra, & Layola-Vargas, 2001). Sin embargo las observaciones realizadas por Chantásig (2004) señalan que los compuestos fenólicos en el cacao ejercen la función de inductores indirectos que promueven la formación de embriones somáticos. La acción de compuestos fenólicos en la embriogénesis somática se da gracias a su capacidad antioxidante que los vuelve un sustrato para las enzimas oxidativas que causan la liberación de auxinas cuya acción es primordial para desencadenar las señales que determinan la respuesta embriogénica (Jimenez, 2005; Omokolo et al., 1997).

En la investigación se observaron embriones somáticos primarios en los estadios globular (g), torpedo (to), corazón (co) y cotiledonar (c) de los clones de cacao fino de aroma EET-103, EET-575 y EET-576. El clon de cacao fino de aroma EET-103 presentó el mayor número de callos embriogénico (6), seguido de los clones EET-575 (3) Y EET-95 (2). Al evaluar el número de embriones por explantes se encontró que el genotipo de cacao EET-103 presentó el mayor número de embriones somáticos primarios (41), seguido del clon EET-575 que presentó 11 embriones somáticos, mientras que en el clon EET-95 solo se produjeron 7 embriones somáticos primarios.

Al comparar estos datos con el porcentaje de formación de callo no se observa una correlación ya que en la etapa de inducción de callo los mayores porcentajes de callo fueron exhibidos por los clones EET-95 y EET-96. En el caso del clon EET-95 se observó un bajo número de embriones somáticos primarios, mientras que con el clon EET-96 no se formaron embriones. El porcentaje más bajo de callo lo evidenció el clon EET-576 sin embargo al igual que en el clon EET-96 no se observaron embriones somáticos. Estos resultados coinciden con la investigación de Chantásig (2004) que no encontró correlación entre la formación de callo y el potencial embriogénico de los explantes. Sin embargo Quirós (2013) reportó que el patrón de comportamiento fue similar en el porcentaje de formación de callo y embriones somáticos, lo cual puede deberse a la presencia de la auxina 2,4-D en los medios de cultivo PCG y SCG-1 que causa un incremento en los niveles endógenos de auxinas estableciendo un gradiente de concentración que determina la respuesta embriogénica en los clones de cacao CATIE-R1, CATIE-R4, CATIE-R6, CC-137, ICS-95 T1, PMCT-58 y UF-273 T1.

4.4 Multiplicación de proembriones

En el medio de cultivo se observaron células redondas con citoplasma denso, núcleo grande y formación de agregados celulares. Según Shoof (1999) la formación de agregados celulares se da por la frecuencia de los subcultivos, ya que la transferencia de medio de cultivo incrementa la división celular. En el cultivo *in vitro* se utilizan plataformas rotatorias para ayudar a la dispersión celular y al intercambio gaseoso, en el ensayo la velocidad de agitación fue de 110rpm, según Merkle (1995) la velocidad puede variar de 60 a 150 dependiendo del cultivo.

Las células mostraron características morfológicas propias de células embriogénicas semejantes a las observadas por Cabrera (2011) en los clones de cacao CCN-51 y Hb, cuya morfología celular a los 28 días consistió en células redondeadas, individuales, de núcleo denso, en una activa división celular y además, la formación de agregados celulares. Freire (2003) menciona las células de las que se originan los embriones somáticos son de tamaño pequeño, poseen citoplasma denso, núcleo grande con nucléolo prominente, vacuola pequeña y profusión de gránulos de almidón.

A partir de los 60 días de cultivo la coloración de las células pasó de blanquecina a una coloración marrón semejante a la coloración que presenta los callos embriogénicos en medio semisólido. Además se observó que el crecimiento disminuyó en las células, al analizar la curva de crecimiento se evidenció que estas entraron en fase estacionaria a los 75 días. Gómez (1998) indica que la disminución en el crecimiento se da por la acumulación de residuos tóxicos, modificación del pH y disminución de la transferencia de energía, lo que causa que las células se obstaculicen mutuamente y la velocidad de división se reduzca hasta

entrar en fase estacionaria. Esta disminución en el crecimiento también se observó en los callos embriogénicos, sin embargo en las suspensiones no se observó la presencia de embriones somáticos. Esto puede deberse a que en la suspensión no se eliminó los residuos de callo ni los agregados celulares, según Evan (1981) luego del tiempo de disgregación de 15 a 35 días es necesario eliminar los residuos de callos y grandes agregados celulares ya que comienzan a aparecer células no embriogénicas que entorpecen el desarrollo de la suspensión. La composición del medio es otro factor que pudo afectar el desarrollo de embriones ya en la investigación realizada por Guillou et al. (2018) logró obtener embriones somáticos en una suspensión celular usando la auxina sintética 2,4,5-T en el medio de multiplicación.

Al analizar la influencia del genotipo en el desarrollo de la suspensión se observaron diferencias significativas entre los diferentes genotipos, resultados similares fueron obtenidos por Cabrera (2011) que al establecer suspensiones de cacao con los clones CCN-51 y Hb observó un mayor crecimiento en el clon CCN-51, por lo que reportó que el crecimiento en la suspensión puede ser dependiente del genotipo utilizado. Según Freire (2003) el crecimiento en una suspensión se puede mantener por intervalos de tiempo que dependen del genotipo estudiado.

En el análisis de medias de Turkey se observó la formación de dos subgrupos, el subgrupo A conformado por los clones de cacao fino de aroma de segunda generación EET-575 y EET-576 y el subgrupo b formado por los clones de primera generación EET-95, EET-96 y EET-103. Al examinar las curvas de cinética celular durante los 60 días de iniciado el ensayo se observa una tendencia general al aumento del volumen de células sedimentadas sin

embargo este aumento es muy leve entre los distintos momentos de evaluación. Resultados similares fueron reportados por Cabrera (2011) al evaluar la variable masa fresca en suspensiones de cacao. Estos resultados pueden deberse a la cantidad de inóculo utilizado, Falco et al. (1996) indica que el patrón de crecimiento celular depende de la densidad celular por mililitros de medio a inocular, con una densidad de inóculo baja el crecimiento es lento o no ocurre. Además De Feria (2001) indica que la baja velocidad de multiplicación en una suspensión celular puede estar dada por la escasez de precursores metabólicos primarios que son incorporados en el medio por las células vegetales.

Como resumen de los resultados de esta investigación no se observaron diferencias significativas entre los clones en la etapa de desinfección, sin embargo el clon EET-575 presentó los valores más bajos de contaminación y oxidación. En las etapas de inducción de callo y obtención de proembriones los clones de cacao EET-95, EET-96 presentaron la mayor producción de callo y proembriones, sin embargo en la fase de desarrollo de embriones destacó la variedad EET-103 con la mayor media de embriones por explante (6.83) seguida de las variedades EET-575 (3.66) y EET-95 (3.5), en contraste con los clones EET-96 y EET-576 que no presentaron embriones somáticos primarios. Al analizar las curvas de cinética celular de las suspensiones de proembriones se observó que los genotipos EET-575 y EET-576 mostraron los valores más altos de volumen células sedimentadas, lo cual indica una mayor velocidad de división celular en estos clones. En este estudio se observó la influencia del genotipo en las distintas fases de la embriogénesis somática y aportó nuevos datos para la posterior generación de un sistema de multiplicación masiva de clones de cacao mediante la técnica de embriogénesis somática.

CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES

- En la etapa de desinfección el clon que mejor respuesta presentó al protocolo de desinfección fue el EET-575 al presentar porcentajes bajos de contaminación y oxidación.
- Al examinar la variable porcentaje de explantes con callo se observaron diferencias significativas en los tratamientos, destacando los clones EET-96 y EET-95 con los mayores porcentajes de explantes con callo 88 y 82% respectivamente. Sin embargo al evaluar el porcentaje promedio de formación de formación de callo a los 25 días de iniciado el ensayo el clon EET-95 presentó los mayores niveles de formación de callo.
- En la fase de desarrollo de proembriones el clon EET-96 presentó un 96% de explantes con proembriones, seguido del clon EET-95 con un 92% de explantes con proembriones, mientras que el clon EET-103 presentó el menor porcentaje de explantes con proembriones. Al examinar la media del porcentaje formación de proembriones se observaron resultados semejantes destacando el clon EET-96 con una media del 62%.
- Se lograron obtener embriones somáticos primarios en los clones EET-103, EET-95 y EET-575, mientras que los clones EET-96 EET-576 no fueron capaces de generar embriones somáticos. El clon EET-103 mostró el mayor potencial embriogénico al generar el mayor número de embriones somáticos (41) y presentar la mayor media de embriones somáticos por explante (6.83).
- Se obtuvo las curvas de cinética celular de los cinco clones identificándose cinco fases: 1) latencia, 2) exponencial, 3) disminución progresiva, 4) lineal y 5) estacionaria. Al examinar la variable volumen de células sedimentadas se observaron diferencias

significativas entre los tratamientos, diferenciándose 2 subgrupos el A conformado por los clones EET-576 y EET-575 que mostraron los valores más altos de células sedimentadas y el B formado por los clones EET-95, EET-96 y EET-103, cuya producción de proembriones fue significativamente menor a la exhibida por los clones EET-575 y EET-576.

CAPÍTULO 6: RECOMENDACIONES

- Se recomienda analizar la influencia de la auxina sintética 2,4,5-Triclorofenoxiacético en ensayos posteriores, dado que la misma es capaz de potenciar la capacidad embriogénica, como en el caso del clon EET-96 que en esta investigación no fue capaz de generar embriones somáticos primarios sin embargo existe el registro que indica que usando 2,4,5-T en el medio de multiplicación de embriones se logra la producción de embriones somáticos primarios y secundarios.
- Establecer las suspensiones de proembriones con una mayor cantidad de inóculo inicial y determinar si existe influencia en su cinética celular.
- Examinar nuevos protocolos que permitan que los proembriones en las suspensiones celulares se desarrollen y permitan obtener mayor cantidad de embriones somáticos, optimizando así el proceso de embriogénesis.
- Se debe continuar con la siguiente etapa de la investigación, estandarizando un protocolo de embriogénesis somática secundaria que permita potenciar el proceso de embriogénesis.

CAPÍTULO 7: BIBLIOGRAFÍA

- United States department of Agriculture. (2012). *Plants Profile*. USDA. Obtenido de <http://plants.usda.gov/java/profile?symbol=thca>
- Adriazola, J. (2003). *Producción del Alimento de los Dioses Theobroma cacao L.* Tingo María: Universidad Nacional Agraria de la Selva Tingo María.
- Adu, A., Novak, J., Afza, M., Van Duren, M., Alonso, R., & Appiah, M. (2011). *Theobroma cacao. Comisión Nacional para el Conocimiento y uso de la Biodiversidad*. Mexico: Conabio. Obtenido de http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/info_especies/arboles/doctos/68sterc03m.pdf
- Adu-Ampomah, Y., Novak, F., Afza, R., Van Duren, M., & Perea-Dallos, M. (1998). *Initiation and Growth of Somatic Embryos of Cocoa (Theobroma cacao)*. Café Cacao Thé.
- Agrocalidad. (2016). *Manual de aplicabilidad de Buenas practicas agricolas para cacao*. Quito: Agrocalidad.
- Aguilar, M. (1990). *Obtención de Plantas de Cacao (Theobroma cacao L.) a partir de Microinjerto de Embriones Somáticos*. Turrialba: CATIE.
- Alemanno, L., Berthouly, M., & Michaux-Ferriere, M. (1996). *Histology of Somatic Embryogenesis From Floral Tissues in Theobroma cacao L.* Plant Cell Tissue and Organ Culture.
- Amores, F., Agama, J., Suarez, C., Quiroz, J., & Motato, N. (2009). *EET-575 y EET-576 Nuevos clones de cacao Nacional para la zona central de Manabí*. Quevedo: INIAP.
- Amores, F., Palacios, A., Jiménez, J., & Zhang, D. (2009). *Entorno ambiental, genética, atributos de calidad y singularización del cacao en el nor oriente de la provincia de Esmeraldas. Boletín Técnico No. 135*. Quevedo: INIAP.
- Anecacao. (2015). *Cacao Nacional*. Quito: Asociación Nacional de exportadores de cacao - Ecuador. Obtenido de <http://www.anecacao.com/es/quienes-somos/cacao-nacional.html>
- Baker, J., & Mock, N. (1994). *An improved method for monitoring cell death in cell suspension and leaf disc assays using evans blue*. . Plant Cell Tiss. Org. Cult.
- Banco Central del Ecuador. (2018). *La economía ecuatoriana creció 1,4% en 2018*. Quito. Obtenido de <https://www.bce.fin.ec/index.php/boletines-de-prensa-archivo/item/1158-la-economia-ecuatoriana-crecio-14-en-2018>
- Bentham, G., & Hooker, J. (1862). *Genera plantarum ad exemplaria imprimis in herbariis kewensibus servata definita*. London: A. Black.

- Bhattacharjee, R. (2018). *Taxonomy and classification of cacao*. International Institute of Tropical Agriculture.
- Blom, Kreis, Iren, & Libbenga. (1992). *A non-invasive method for the routine-estimation of fresh weight of cells grown in batch suspension cultures*. . Plant Cell Rep.
- Buffard-Morel, Verdeil, & Pannetier. (1992). *Embryogenkse somatique du cocotier (Cocos nucifera L.) B partir d'explants foliaires : Etude histologique*. France: Canadian Journal of Botany.
- Cabrera, P. (2011). *Formacion de callos y establecimiento de suspensiones celulares en el cultivo de cacao (Theobroma cacao L.)*. La Maná: Universidad Técnica de Cotopaxi.
- Castillo, B. (2004). *Determinación de la capacidad embriogénica de 22 clones de cacao tipo Nacional multiplicados in vitro vía Embriogénesis somática*. Guayaquil: Univerisdad de Guayaquil.
- Chanatásig, C. (2004). *Inducción de la embriogénesis somática en clones superiores de cacao (Theobroma cacao L.), con resistencia a enfermedades fungosas*. Turrialba: CATIE.
- Cheesman, E. (1944). *Notes on the nomenclature, classification and possible relationships of cacao populations*. Trinidad y Tobago: Tropical Agriculture.
- Cuatrecasas, J. (1964). *Cacao and its allies a taxonomic revision of genus Theobroma*. Washington: United Stated Herbarium - Smithsonian Institution.
- Cubillos. (2016). *Frosty Pod Rot, disease that affects the cocoa (Theobroma cacao) crops*. Medellin: Crop Protection.
- Cueva, Jaramillo, & Ramírez. (2015). *Enfermedades del cacao*. Machala: Universidad Tecnica de Machala.
- David, H., Laigneau, C., & David, A. (1989). *Growth and soluble proteins of cell cultures derived from explants and protoplasts of Pinus pinaster cotyledons*. . Tree Physiol.
- De Fera, M., Jiménez, E., R., B., Capote, A., Chávez, M., & Quiala, E. (2000). *Multiplicación de suspensiones celulares embriogénicas de Coffea arabica cv. Catimor 9722*. Biotecnología Vegetal.
- Enríquez, G. (2010). *Cacao orgánico: Guía para productores ecuatorianos*. Quito.
- Etienne, H., Barry-Etienne, D., Vásquez, N., & Berthouly, M. (1999). *Aportes de la Biotecnología al Mejoramiento Genético del Café: El Ejemplo de la Multiplicación por Embriogénesis Somática de Híbridos F1 en América Central*. . San Jose: Cirad.
- Evans, D., Sharp, W., & Flick, C. (1981). *Growth and behavior of cell cultures, embryogenesis and organogenesis*. En: *Plant Tissue Cultura, methods and applications in agriculture*. . New York: Academic Press. .
- Falco, M., Januzzi, B., & Tulmann, A. (1996). *Cell suspension culture of sugarcane, growth, management and plant regeneration*. . Rev. Bras. Fisiol. Veg.

- Freire, P. (2013). *Establecimiento de suspensiones celulares de Chenopodium ambrosioides para una futura obtención de metabolitos secundarios, empleando la citoquinina thidiazuron (TDZ). Tesis (Ingeniera en Biotecnología)*. Sangolquí: Universidad de las Fuerzas Armadas. ESPE.
- Freire, S. C. (2017). *Selección de genotipos de cacao (Theobroma cacao L.) con resistencia a escoba de bruja (Moniliophthora perniciosa) en Los Ríos, Ecuador*. Los Ríos: Ciencia y Tecnología.
- George, Hall, & Klerk. (2008). *Plant Propagation by Tissue Culture*. . George, Edwin F., Hall, Michael A., De Klerk,.
- Gómez, R. (1998). *Embriogénesis somática. En: Pérez Ponce, JN (Ed) Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología*. . Santa Clara: IBP.
- González, Hernández, Mazorra, Rodríguez, & Cabrera. (2005). *Influencia de la época del año y el genotipo en la respuesta morfogénica y bioquímica de explantes foliares de Coffea canephora P. var. Robusta empleados para la formación de callos*. Cuba: Revis IBP. Obtenido de <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/454>
- Griffith, G. (2004). *Witches' brooms and frosty pods: threats to world cacao production*. Biologist.
- Guillou, C., Fillodeau, A., Brulard, E., Brenton, Simon, M., & Ducos, J. (2018). *Indirect somatic embryogenesis of Theobroma cacao L. in liquid medium and improvement of embryo-to-plantlet conversion rate*. n Vitro Cell.Dev.Biol.-Plant .
- Hahlbrock, K. (1975). *Further studies on the relationship between the rates of nitrate uptake, growth and conductivity changes in the medium of plant cell suspension cultures*. . Planta (Berl.).
- Hahlbrock, K., Ebel, J., & Oaks. (1974). *Determination of specific growth stages of plant cell suspension cultures by monitoring conductivity changes in the medium*. . Planta (Berl.).
- Hardy, F. (1961). *Manual de Cacao*. Turrialba: IICA.
- Hartmann, Kester, Davies, & Geneve. (2002). *Plant propagation principles and practices. 7th edition*. New Jersey: Prentice Hall.
- Hidalgo, C. (2014). *Estudio preliminar para la obtención de explantes de cacao (Theobroma cacao L.) a través de embriogénesis somática*. Guayaquil: Universidad de Guayaquil.
- INIAP. (1995). *Informe anual técnico 1994*. Quevedo: Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias Estación Experimental Tropical Pichilingue.
- Li, Traore, Maximova, & Gultinan. (1998). *Somatic embryogenesis and plant regeneration from floral explants of cacao (Theobroma cacao L.) Using thidiazuron*. Pennsylvania: In Vitro Cell.
- Linneo, C. (1737). *Hortus Cliffortianus*. Obtenido de <http://www.botanicus.org/title/b11957918>

- Loyola-Vargas, V., & Ochoa-Alejo, N. (2016). *Somatic embryogenesis. An overview,*” in *Somatic Embryogenesis. . Fundamental Aspects and Applications.*
- MAG. (2017). *Proyecto de Reactivación del Café y Cacao Nacional Fino de Aroma.* Quito: Ministerio de Agricultura y Ganadería.
- Maiguashca, J. (2012). *La incorporación del cacao ecuatoriano al al mercado mundial entre 1840 y 1925, según los informes consulares.* Quito: PROCESOS- Revista Ecuatoriana de Historia.
- Martinez, W. (2017). *Caracterización morfológica y molecular del Cacao Nacional Boliviano y de selecciones élites del Alto Beni, Bolivia. .* Turrialba: CATIE.
- Mata, A. (2013). *Evaluación de dos protocolos para la inducción de embriogénesis somática en clones de cacao (Theobroma cacao L.) seleccionados por el Programa de Mejoramiento Genético de Cacao del CATIE.* Turrialba: CATIE.
- Maximova, A. Y. (2002). *Efficiency, genotypic variability, and cellular origin of primary and secondary somatic embryogenesis of Theobroma cacao L.* Pennsylvania: *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant.*
- Meinhardt, Rincones, Bailey, Aime, Griffith, Zhang, & Pereira. (2008). *Moniliophthora perniciosa the causal agent of witches’ broom disease of cacao: what’s new from this old foe?* MOLECULAR PLANT PATHOLOGY.
- Méndez-Hernández, Ledezma-Rodríguez, M., Avilez-Montalvo, R., Skeete, A., & Avilez-Montalvo, J. (2019). *Signaling Overview of Plant Somatic Embryogenesis.* *Frontiers in Plant Science .*
- Mera, & Ruiz. (2014). *Evaluación física, sensorial y bromatológica del licor de cacao en variedades clonales EET-19, EET-48, EET-62, EET-95, EET-96, EET-103 en la ESPAM.* Calceta: ESPAM.
- Merkle, S., Parrott, W., & Flinn, B. (1995). *Morphogenic aspects of somatic embryogenesis. En: Thorpe, TA (Ed) In vitro Embryogenesis in Plant.* Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
- Monsalve, García, & Sigarroa. (2010). *Obtención de embriones somáticos primarios de Theobroma cacao en clones de interés regional para el Departamento norte de Santander, Colombia.* Santander: Universidad Francisco de Paula Santander.
- Mustafa, Winter, Ward, & Verpoorte. (2011). *Initiation, growth and cryopreservation of plant cell suspension cultures.* *Nature protocols.*
- NPTEL. (2016). *Growth And Production Kinetics Of Cell Cultures In Shake Flasks.* India.
- Oseni, O. M. (2018). *A Review on Plant Tissue Culture, A Technique for Propagation and Conservation of Endangered Plant Species. .* *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences.*

- Osorio, E. (2008). *Estudio de la eficiencia de consorcios micorrízicos nativos durante el proceso de aclimatación de plántulas de cacao nacional (Theobroma cacao L.) obtenidas por embriogénesis somática*. Santo Domingo: Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE.
- Paredes, N. (2009). *Manual de Cultivo de Cacao para la Amazonía Ecuatoriana*. Manual de Cultivo de Cacao.
- Pence, V. (1995.). *Somatic Embryogenesis in Cacao (Theobroma cacao)*. . Biotechnology in Agriculture and Forestry.
- Phillips-Mora, W., & Cerda. (2009). *Catalog: Cacao Diseases in Central América*. Turrialba: CATIE.
- Proaño, A. (2015). *Obtención de embriones somáticos a partir de explantes florales de los clones certificados de cacao fino de aroma EET-19 y EET-103 de la provincia de Santo Domingo de los Tsachilas*. Sangolquí: Universidad de las Fuerzas Armadas.
- Procacaho. (2016). “*Mal de machete*”, una enfermedad del cacao que no se debe descuidar. PROCACAO.
- Quimbita, B. (2011). *Efecto de la concentración de 2,4-d y el tipo de explante en la formación de callos embriogénicos en el cultivo in vitro de cacao (Theobroma cacao L)*. Cuba: Universidad de Granma.
- Quirós, A. (2013). *Evaluación de dos protocolos para la inducción de embriogénesis somática en clones de cacao (Theobroma cacao L.) seleccionados por el Programa de Mejoramiento Genético de Cacao del CATIE*. Turrialba: CATIE.
- Quiroz, J. (2000). *Características agronomica de clones recomendados por Iniap*. INIAP.
- Quiroz, J. (2002). *Caracterización Molecular y Morfológica de Genotipos Superiores de Cacao Nacional (Theobroma cacao L.) de Ecuador*. Turrialba: CATIE.
- Quiroz, J. (2016). *Potencial genético de los materiales de cacao de INIAP*. INIAP.
- Quiroz-Figueroa, F., Mendez-Zeel, M., Larque-Saavedra, A., & Layola-Vargas. (2001). *Picomolar Concentrations of Salicylates Induce Cellular Growth and Enhance Somatic Embryogenesis in Coffea arabica Tissue Culture*. Plant Cell Report.
- Rodríguez, M., Alarcón, N., Zambrano, O., & Carvajal, T. (2010). *Manejo técnico del cultivo de cacao en Manabí. Portoviejo, Ecuador: INIAP, Estación Experimental Portoviejo, Núcleo de Transferencia y Comunicación. (Manual 75)*. Portoviejo: INIAP.
- Rosero, C. (2013). *Selección estable de marcadores moleculares microsátélites (SSRs) para la identificación de clones comerciales de cacao Nacional (Theobroma cacao L.), recomendados por el INIAP*. Sangolquí: Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE.
- Ruiz, H. (2018). *Pronóstico de las exportaciones del cacao ecuatoriano para el 2018 con el uso de modelos de series de tiempo*. Guayaquil: INNOVA Research Journal.

- Saenz, J. (2007). *Principales avances y resultados de la campaña de Monilia en Colombia*. Innovacion y Cambio Tecnológico. Corpoica.
- Sanches, Pinto, Silva, & Loguercio. (2008). *Assessment of resistance to Ceratocystis cacaofunesta in cacao genotypes*. Eur J Plant Pathol.
- Schoof, H., Panis, B., Strosse, H., Mayo, López, J., Roux, N., . . . Swennen, R. (1999). *Cuellos de botella en la regeneración y mantenimiento de las suspensiones celulares morfológicas de bananos y la regeneración de las plantas vía embriogénesis somática a partir de ellos*. INFOMUSA .
- Schripsema, J., & Verpoorte, R. (1995). *Novel techniques for growth characterization and phytochemical analysis of plant cell suspension cultures*. . J. Nat. Prod.
- Sreenath, H., Shanta, H., Harinat, K., & Naidu. (1995). *Somatic Embryogenesis from Integument (perisperm) Cultures of Coffee*. . Plant Cell Reports .
- Superintendencia de Control del Poder de Mercado (SCPM). (2015). *Producción y Comercialización de Cacao Fino de Aroma en el Ecuador - Año 2012-2014*. Quito.
- Thorpe, T. (2007). *History of plant tissue culture*. J. Mol. Microbial Biotechnol.
- TradeMap. (2018). *Estadísticas del comercio para el desarrollo internacional de las empresas. Lista de los exportadores de Cacao*. Obtenido de https://www.trademap.org/Country_SelProduct_TS.aspx?nvpm=3%7c%7c%7c%7c%7c1801%7c%7c%7c4%7c1%7c1%7c2%7c2%7c1%7c2%7c1%7c1
- Valarezo, R. (2015). *Obtención de callos embriogénicos a partir de explantes florales en 2 clones de cacao*. Machala: Universidad Técnica de Machala.
- Vera, Suarez, & Mogrovejo. (1984). *Descripción técnica de algunos híbridos y clones de cacao recomendados por el Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP)*. Quedo: INIAP.
- Wampash, B., Nieves, G., & Barriga, F. (2011). *Implementación, adecuación y valoración de un sistema climatizado para el área de incubación del laboratorio de micropropagación del campo Juan Lunardi Canton Paute, Provincia de Azuay*. Cuenca: Universidad Politécnica Salesiana.
- Yang, X., & Zhang, X. (2010). *Regulation of somatic embryogenesis in higher plants*. Crit. Rev. Plant Sci.
- Zarrillo, G. P., Viot, Lesur, Fouet, Argout, Guichoux, . . . Yepez. (2018). *The use and domestication of Theobroma cacao during the mid-Holocene in the upper Amazon*. Calgary: Nature Ecology & Evolution.