

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE
JAÉN**

**ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERIA FORESTAL Y
AMBIENTAL**



**MICROPROPAGACIÓN DE *Theobroma cacao* L. “CACAO NATIVO”
PARA CONSERVACIÓN DE GERMOPLASMA EN JAÉN – PERÚ.**

Presentado por:

ANALI ROXANA CRUZ ACOSTA

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERO
FORESTAL Y AMBIENTAL**

Jaén – Perú

2019



UNIVERSIDAD NACIONAL DE JAÉN

RESOLUCIÓN DE CONSEJO DIRECTIVO N° 002-2018-SUNEDU/CD
COORDINACIÓN CARRERA PROFESIONAL DE INGENIERÍA FORESTAL Y AMBIENTAL



"Año de la Lucha Contra la Corrupción y la Impunidad"

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

Siendo las quince horas y treinta minutos, del día veintiocho de Febrero del dos mil diecinueve, reunidos en la sala de profesores de la Universidad Nacional de Jaén, los Miembros del Jurado, designados mediante resolución N° 042 – 2019 - CO – UNJ del 15 de Febrero del 2019:

- Dra. Ing. Irma Rumela Aguirre Zaquinaula (Presidente)
- Ing. M. Sc. Santos Clemente Herrera Díaz (Secretario)
- Ing. M. Sc. Wagner Colmenares Mayanga (Vocal)

Con la finalidad de llevar a cabo la Sustentación de Informe de Tesis Titulado: **"MICROPROPAGACIÓN DE *Theobroma cacao* L. "CACAO NATIVO" PARA CONSERVACIÓN DE GERMOPLASMA EN JAÉN - PERÚ"**, presentado por el tesista: **Cruz Acosta Anali Roxana** en presencia de su asesor Ph. D. Omar Justo Zeballos Cáceres.

Los Miembros del Jurado, presencian la sustentación del Informe de Tesis denominado: **"MICROPROPAGACIÓN DE *Theobroma cacao* L. "CACAO NATIVO" PARA CONSERVACIÓN DE GERMOPLASMA EN JAÉN - PERÚ"**, luego se procede a realizar las preguntas correspondientes para ser contestadas por el tesista, los Miembros del Jurado de Tesis luego de escuchar la defensa del tesista, deliberan y deciden aprobar la sustentación, siendo el calificativo final: **TRECE (13) BUENA**

Deficiente	Regular	Buena	Muy Buena	Sobresaliente
0 - 10	11-12	13-14-15	16-17-18	19-20
_____	_____	_____	_____	_____

Siendo las dieciséis horas y treinta minutos, del mismo día, se procede a firmar la presente en señal de conformidad y elevar a las autoridades competentes para el trámite correspondiente.

Presidente

Nombre: Dra. Ing. Irma Rumela Aguirre Zaquinaula

Firma

Secretario

Nombre: Ing. M. Sc. Santos Clemente Herrera Díaz

Firma

Vocal

Nombre: Ing. M. Sc. Wagner Colmenares Mayanga

Firma

Dedicatoria

Mis padres

Astolfo Cruz y Carmen Acosta quienes son los pilares de mi formación personal y profesional, por confiar y brindarme todo su apoyo en todo momento.

Mis hermanos

A mis hermanos Charly Cruz, Nataly Cruz y Mariela Cruz por brindarme su comprensión y amor incondiciona

Agradecimiento

A Dios por la vida, por la oportunidad que nos da día a día. A mis padres Astolfo Cruz y Carmen Acosta quienes me apoyan y guían cada día de mi vida, son motivo y fortaleza para emprender mis metas profesionales y personales. A mis hermanos por brindarme su ejemplo y apoyo incondicional.

Agradezco a mi asesor Ph.D. Omar Zeballos Cáceres y mis co-asesores Ing.M.Sc. Vitoly Becerra Montalvo e Ing.M.Sc. Francisco Fernando Aguirre de los Ríos, por compartir sus conocimientos y experiencias brindándome todo su apoyo de una forma desinteresada.

Agradecimiento sincero al Ing. Gerardo Alarcón Cubas, Gerente General de la Cooperativa de Servicios Múltiples Sol&Café LTDA, que apoyó con parte del financiamiento del proyecto y con información que validan mi trabajo de investigación. Así mismo al Ing. Atilio Huapaya Naupay y Técnico Ronald por apoyarme en la preparación de la planta madre.

A mi amiga Omery Campos Torres por la ayuda en laboratorio, al Coordinador de la Escuela Profesional de Ingeniería Forestal y Ambiental Ing.M.Sc.Santos Clemente Herrera Díaz, ING .Franklin y Bach. Reyner por las facilidades y comprensión dadas para el ingreso al laboratorio de biotecnología.

Y finalmente, a mis amigos de la Universidad, Karen Arévalo, Susan Brito, Luci Barturén, Katharine Gaytán, Hitler Fernández y David Coronel, que durante cinco años de carrera me brindaron su soporte y paciencia y con quienes tuve la dicha de compartir momentos imperecederos de aprendizaje.

ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA	II
AGRADECIMIENTO.....	III
ÍNDICE GENERAL	IV
ÍNDICE DE TABLAS	VI
ÍNDICE DE GRÁFICOS	VIII
ÍNDICE DE ANEXOS.....	IX
RESUMEN	X
I. INTRODUCCIÓN	12
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	14
2.1. ANTECEDENTES TEÓRICOS DE LA INVESTIGACIÓN.....	14
2.2. BASES TEÓRICAS CONCEPTUALES DE <i>THEOBROMA</i>	16
2.2.1. ANTECEDENTES HISTÓRICOS DE <i>THEOBROMA CACAO</i>	16
2.2.2. MORFOLOGÍA Y TAXONOMÍA DE CACAO.....	17
2.2.3. DISTRIBUCIÓN Y HÁBITAT	18
2.2.4. DESCRIPCIÓN DENDROLÓGICA.....	19
2.2.5. ASPECTO EDÁFICOS Y CLIMA.....	21
2.2.6. DIVERSIDAD GENÉTICA	22
2.2.7. IMPORTANCIA DEL GÉNERO <i>THEOBROMA</i>	24
2.3. MICROPROPAGACIÓN.....	25
2.3.1. VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE LA MICROPROPAGACIÓN.....	26
2.3.2. FASES O ETAPAS DE LA MICROPROPAGACIÓN:.....	27
2.3.3. FACTORES QUE INFLUYEN EN LA MICROPROPAGACIÓN	29
2.3.4. MEDIOS DE CULTIVO.....	30
2.3.5. COMPONENTES NUTRICIONALES DE LOS MEDIOS DE CULTIVO.....	31
2.3.6. REGULADORES DE CRECIMIENTO	32
2.3.7. SUSTRATOS	33
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	36
3.1. HIPÓTESIS	36
3.2. MATERIALES	36
3.3. METODOLOGÍA	38

3.4. TRATAMIENTOS EN ESTUDIO	41
3.5. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	43
3.5.1.PRUEBA ESTADÍSTICA	44
3.5.2.EVALUACIONES REALIZADAS:.....	44
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	46
V. CONCLUSIONES	58
VI. RECOMENDACIONES	59
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60
VIII. ANEXOS	65

Índice de tablas

Tabla 1 : Tratamientos aplicados en la fase de desinfección de los explantes de <i>Theobroma cacao</i> L. “cacao criollo” (CSC 17).....	41
Tabla 2: Tratamientos aplicados en la fase de crecimiento de <i>Theobroma cacao</i> L. “cacao criollo”(CSC 17).....	41
Tabla 3 :Tratamientos aplicados en la fase de multiplicación de <i>Theobroma cacao</i> L. “cacao criollo” (CSC 17).....	42
Tabla 4: Tratamientos aplicados en la fase de enraizamiento de <i>Theobroma cacao</i> L. “cacao criollo” (CSC 17).....	42
Tabla 5: Tratamientos aplicados en la fase de aclimatación de <i>Theobroma cacao</i> L. “cacao criollo” (CSC 17).....	43
Tabla 6: Prueba de comparación de medias de Duncan para la variable altura del explante de <i>Theobroma cacao</i> L. en la fase de crecimiento.	48
Tabla 7: Prueba de comparación de medias de Duncan para la variable número de brotes de <i>Theobroma cacao</i> L.....	51
Tabla 8: Prueba de comparación de medias de Duncan para la variable Longitud promedio (mm) de brotes de <i>Theobroma cacao</i> L.....	53
Tabla 9: : Explantes de <i>Theobroma cacao</i> L. “cacao criollo enraizados por tratamiento...	54
Tabla 10: Prueba de comparación de medias de Duncan para la variable porcentaje de plántulas de <i>Theobroma cacao</i> L. “cacao criollo” sobrevivientes por sustrato.....	56
Tabla 11: Resultados de los tratamientos realizados en la desinfección de <i>Theobroma cacao</i> L.	65
Tabla 12: Registro obtenidos en la evaluación de la fase de crecimiento de explantes de <i>Theobroma cacao</i> L. a los 60 días – mm.....	65
Tabla 13: Análisis de varianza (ANVA) para la variable altura promedio de explante de <i>Theobroma cacao</i> L. en la fase de crecimiento	65
Tabla 14: Registro obtenidos en la evaluación de la fase de multiplicación de explantes de <i>Theobroma cacao</i> L., en la cuarta semana – número de brotes	

.....	66
Tabla 15: Análisis de varianza (ANVA) para la variable número de brote promedio por explante de <i>Theobroma cacao</i> L. en la fase de multiplicación.	66
Tabla 16: Registro obtenidos en la evaluación de la fase de multiplicación de explantes de <i>Theobroma cacao</i> L. , en la cuarta semana – longitud de brotes:	66
Tabla 17: Análisis de varianza (ANVA) para la variable longitud promedio por explante de <i>Theobroma cacao</i> L. en la fase de multiplicación	67
Tabla 18: Registro obtenidos en la evaluación de la fase de Enraizamiento de Explantes de <i>Theobroma cacao</i> L. - número de raíces	67
Tabla 19: Evaluación realizada en la cuarta semana – longitud de raíces:.....	67
Tabla 20: Registro obtenidos en la evaluación de la fase de aclimatación de plántulas de <i>Theobroma cacao</i> L. sobrevivientes (%) por sustrato.....	68
Tabla 21: Análisis de varianza (ANVA) para la variable porcentaje de plántulas de <i>Theobroma cacao</i> L. “cacao criollo” sobrevivientes (%) por sustrato en la fase de aclimatación.....	68

Índice de gráficos

Gráfico 1: Porcentaje de Explantes de <i>Theobroma cacao</i> L. no contaminados por tratamiento.	46
Gráfico 2: Medias del crecimiento de explantes de <i>Theobroma cacao</i> L. en los respectivos tratamientos con una evaluación de 60 días.	49
Gráfico 3: Promedio de números de brotes por explante de <i>Theobroma cacao</i> L. a los 28 días.	51
Gráfico 4: Gráfico 3: Medias de longitud de brotes por explante de <i>Theobroma cacao</i> L. a los 28 días.	53
Gráfico 5: Medias de supervivencia en la fase de aclimatación de los explantes de <i>Theobroma cacao</i> L.	56

Índice de figuras

Figura 1 : Preparación de planta madre de <i>Theobroma cacao</i> L.	73
Figura 2: Preparación de planta madre de <i>Theobroma cacao</i> L.	73
Figura 3: Esterilización de materiales	74
Figura 4: Preparación de medios de cultivo	74
Figura 5: Preparación de Hipoclorito de calcio (desinfectante)	75
Figura 6: Preparación de los explantes de <i>Theobroma cacao</i> L.	75
Figura 7: Desinfección de los explantes de <i>Theobroma cacao</i> L.	76
Figura 8: Siembra de los explantes <i>Theobroma cacao</i> L.	76
Figura 9: Explantes de <i>Theobroma cacao</i> L.	77
Figura 10: Crecimiento de los explantes de <i>Theobroma cacao</i> L.	77
Figura 11: Fase de multiplicación de <i>Theobroma cacao</i> L.	78
Figura 12: Fase de multiplicación de <i>Theobroma cacao</i> L.	79
Figura 13: Enraizamiento de los brotes de <i>Theobroma cacao</i> L.	79
Figura 14: Aclimatación de las plantas <i>Theobroma cacao</i> L.	80

Índice de anexos

Anexo 1 : Pruebas estadísticas.....	65
Anexo 2: Composición de los medios de cultivo	69
Anexo 3: Protocolo para la Micropropagación de la <i>Theobroma cacao</i> L	71
Anexo 4: Descripción de la planta madre de <i>Theobroma cacao</i> L. “cacao criollo”: comportamiento agronómico del material seleccionado y su potencial productivo.....	72
Anexo 5: Panel Fotográfico de la investigación.....	73
Anexo 6 : Certificación de identificación botánica <i>Theobroma cacao</i> L.....	81

RESUMEN

El objetivo general de esta investigación fue evaluar el efecto de reguladores de crecimiento y medios de cultivo en la micropropagación de *Theobroma cacao* L. “cacao nativo”. Para micropropagar esta especie se realizó todas las fases de la micropropagación, iniciando con la fase de preparación de la planta madre, obteniéndola de Caserío de Canana; Distrito de Bellavista; Provincia de Jaén, la identificación se dio mediante el proyecto “Colección de plantas madres de cacao criollo en Jaén-San Ignacio”, de la cual se obtuvieron yemas para injertarlas y poder tener acceso del material en laboratorio, para evitar la oxidación o muertes de los explantes en el traslado. La segunda fase desinfección del material, se trabajó con cuatro tratamientos, con 3 por ciento de hipoclorito de calcio, agregándolo tres gotas de tween, en tiempos de 5min, 10min, 15min, y 20min. Tercera fase de crecimiento, en la cual se evaluó en tres tipos de medios de cultivos: Murashige & Skoog (1962), Campbell y Durzan (1975) y el medio Fossard et al (1974)M. Cuarta fase de multiplicación se trabajó con fitohormonas de crecimiento BAP y KIN, se evaluó número de brotes y longitud de brotes. Quinta fase de enraizamiento donde se evaluó dos tipos de auxinas AIB y ANA, teniendo como variables a evaluar el número de raíces y longitud promedio de raíces. Última fase de aclimatación donde se evaluó la sobrevivencia de las plantas in vitro en tres tratamientos con diferentes sustratos. Culminando con un protocolo guía para la micropropagación de especie *Theobroma cacao* L. “cacao nativo”.

Palabras Claves

Micropropagación, *Theobroma cacao* L., fitohormonas.

SUMMARY

The overall objective of this research was to evaluate the effect of growth regulators and means of cultivation in the micropropagation of *Theobroma cacao* L. "native cocoa". To micropropagate this specie all the phases of micropropagation were carried out, beginning with the preparation phase of the mother plant, obtaining it from the Village of Canana; District of Bellavista; Province of Jaén. The identification was given through the project "Collection of mother plants of cacao criollo in Jaén - San Ignacio", from which buds were obtained to graft them and to have access to the material in the laboratory, to avoid oxidation or deaths of the explants in the movement. The second phase was disinfection of the material, it was worked with four treatments, with 3 percent of calcium hypochlorite, adding three drops of tween, in times of 5min, 10min, 15min, and 20min. The third phase of growth, was evaluated in three types of means of cultivation: Murashigue & Skoog (1962), Campbell and Durzan (1975) and the medium Fossard et al (1974) M. The fourth phase of multiplication was worked with phytohormones of growth BAP and KIN, number of shoots and shoot length were evaluated. The fifth phase of rooting where two types of auxins AIB and ANA were evaluated, having as variables to evaluate the number of roots and average length of roots. Last phase of acclimatization where the survival of the in vitro plants was evaluated in three treatments with different substrates. The research ends with a guide protocol for the micropropagation of species *Theobroma cacao* L. "native cocoa".

Keywords

Micropropagation, *Theobroma cacao* L., phytohormones.

I. INTRODUCCIÓN

El cacao es un producto de exportación significativo para muchas economías en desarrollo: en África, Asia y América Latina. Según la Organización Internacional del Cacao en el 2012, su producción incorporó un valor en el mercado de US\$ 12 mil millones y es un medio de sustento para un estimado de entre 40 y 50 millones de personas. De los más de 50 países que producen cacao, solo 10 países tienen condiciones edafoclimáticas para producir cacao de fino aroma y sabor, uno de ellos es el Perú. (International Cocoa Organization [ICCO], 2012)

Actualmente, el cultivo de cacao en el Perú se ubica en el segundo lugar con mayor superficie agrícola, en los últimos años el requerimiento de granos de cacao de calidad ha permitido abrir nuevas posibilidades para los mercados de la Amazonía peruana, así como nuevas exigencias acordes a ellos. En estado natural el cacao se encuentra en los pisos inferiores de las selvas húmedas de los trópicos, desde los 20° latitud norte hasta los 20° latitud sur y a una altitud por debajo de los 1 250 m.s.n.m. Jaén teniendo estas condiciones edafoclimáticas favorables cuenta con importante cantidad de hectáreas dedicadas al cultivo del cacao criollo y nacional que tiene muy buena aceptación en el mercado, por su calidad y fino aroma (Naupay, 2015). Asimismo, estas condiciones edafoclimáticas favorables contribuyen a la ventaja de micropropagar la planta a nivel de laboratorios logrando facilitar su traslado y producción. Además, no existe investigación referente a micropropagación de *Theobroma cacao* L. en el país y mucho menos en la región, que nos permitan tener un claro conocimiento científico y tecnológico para que sea de nuestro dominio la micropropagación del *Theobroma cacao* L.

Por motivo que nace el proyecto a ejecutar de Micropropagación de *Theobroma cacao* L. “cacao nativo” para conservación de germoplasma en Jaén – Perú. Teniendo como objetivo general evaluar el efecto de reguladores de crecimiento y medios de cultivo en la micropropagación de *Theobroma cacao* L. “cacao nativo”, y como objetivos específicos:

determinar el mejor medio de cultivo para micropropagar la *Theobroma cacao* L. “cacao nativo”, determinar el tipo y la concentración de reguladores de crecimiento vegetal más apropiados para la micropropagación de *Theobroma cacao* L. “cacao nativo” y proponer un protocolo de micropropagación de *Theobroma cacao* L. “cacao nativo”.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. ANTECEDENTES TEÓRICOS DE LA INVESTIGACIÓN

- Universidad de San Carlos de Guatemala Facultad de Agronomía,” Instituto de Investigaciones Agronómicas”, En el presente estudio se investigó la respuesta de cinco clones de cacao (*Theobroma cacao* L.) al cultivo de tejidos in vitro, a partir de un explante de yema axilar, meristemo apical y hoja, en un medio de cultivo (Murashige y Skoog), con el propósito de generar conocimiento y tecnología que puedan contribuir a la propagación y conservación de dichas plantas. Las auxinas utilizadas fueron ANA en niveles de 0.5, 1.0, 3.0, 5.0 mg/L. y citosinas como BAP a niveles de 0.5, 1.0, 3.0, 5.0 mg/L. Se trabajó el cultivo de cacao por medio de la técnica de cultivo in vitro, pero existieron limitantes como el tiempo de traslado del material vegetal de la finca Bulbuxyá hacia el laboratorio de cultivo de tejidos en la Facultad de Agronomía de la ciudad de Guatemala para el desarrollo de las estructuras utilizadas conocidas como explantes, debido al alto porcentaje de oxidación que presenta la estructura. Para obtener resultados satisfactorios en la etapa de inducción de brotes nos recomienda reducir el tiempo de corte de las varetas porta yemas y el tiempo de siembra de lo explantes a utilizar. (Medrano, 2010)
- El estudio de “Proliferación de brotes y enraizamiento in vitro de *Theobroma cacao* L. tipo Amelonado”, describe el cultivo in vitro de explantes de brotes de *T. cacao* en crecimiento activo. Donde ha logrado cierta proliferación de brotes axilares y estos brotes se han inducido a formar raíces adventicias. Para ello han utilizado dos tipos de explantes puntas de brotes y cortes de yemas nodales; ambos tenían una longitud de 0,5 a 1,0 cm. La fase de desinfección se hizo con hipoclorito de sodio al 10% durante 30 minutos, seguidos de cuatro lavados en agua destilada estéril. Los experimentos iniciales incluyeron una variedad de medios de cultivo que incluían algunos formulados de acuerdo con la composición de la savia de *T. cacao* xylem,

que se encontró que era rica en P y Mg. Sin embargo, ninguno de estos medios demostró ser superior a los basados en el medio revisado de Murashige y Skoog (1962). Así, el medio básico para el cultivo de brotes descrito en este documento consistió en los elementos mayor y menor de este medio Murashige y Skoog (1962). (Passey y Jone, 1983)

Para la proliferación de brotes utilizaron la hormona; BAP, Z y ZR, donde se produjeron entre dos y seis brotes axilares por explante. La fase de enraizamiento de la punta de los brotes y los explantes de yemas nodales se dio en el medio básico que contenía 2.5 IBA, ANA y I o-3M phloroglucinol con o sin floroglucinol, produciendo el 60 y el 80 por ciento de raíces adventicias (Passey y Jone, 1983).

- En la investigación de “*Theobroma cacao* L. : un procedimiento de propagación in vitro de brotes axilares” , realizado en Laboratorio de biología molecular del cacao ACRI, Departamento de Ciencia de los Alimentos, Estado de Pennsylvania, menciona que en su fase de desinfección los explantes se transfirieron directamente a la solución que contenía un 0.37 por ciento de NaOCL (50 mM), ácido ascórbico 10 mM más 10 gotas por litro de Tween 20, (10-15 segmentos del tallo por 250 ml) durante 14 min, los segmentos del tallo se enjuagaron dos veces en agua desionizada estéril durante 10-15 minutos por enjuague. La composición del Medio basal de la planta leñosa fue de McCown (Sigma), ajustado a un pH 5,6. El medio (8 ml) se dispensó en tubos de cultivo de vidrio de 20 x 100 mm cubiertos y luego se autoclavó a 121 ° C durante 20 minutos. Los explantes fueron sembrados en el medio, ubicándolos en una cámara de crecimiento con temperatura de 23 a 26.5 ° C. Para la fase de enraizamiento los brotes se extirparon del explante original cuando medían 4-6 cm de altura y puestos a sales de WPM, con suplemento orgánico como se define en el medio basal, 10.0 g/L - sacarosa, 0.15 g /L, carbón activado, IBA a 3.0 mg/L, con pH de 5.8. Finalmente, las plántulas enraizadas se transfirieron asépticamente a recipientes de cultivo compuesta de 3 partes de musgo de turba sphagnum, 2 partes de vermiculita y 1 parte de tierra. (Flynn y Glicenstein , 1990)
- La investigación “Resultados Preliminares del Control de la Contaminación In Vitro en Micropropagación de *Theobroma Cacao* L. En La Unas”, en este trabajo, con

miras de micropropagar yemas de cacao, se planteó como objetivo ensayar estrategias para disminuir la tasa de contaminación. Los componentes en estudio fueron: tiempos en el remojo de las varas yemeras con benomyl (2 por ciento) (12 y 24 horas), adición de ácido ascórbico (10mM) y dosis de estreptomycin en el medio de cultivo (50, 80, 100, 150 mg/L). Cada tratamiento involucró 10 repeticiones y se separaron en 3 ensayos. Se eligió al cacao clon CCN 51 cultivado en el Fundo UNAS. La colecta se realizó en horas de la mañana y se eligieron varas yemeras jóvenes de aproximadamente 20 cm, cortando las hojas sólo a la mitad. Inmediatamente, fueron transferidas al Laboratorio para realizar los ensayos correspondientes. Las yemas se lavaron cuidadosamente con agua potable y detergente; se enjuagaron con agua destilada y se llevaron a la cabina de flujo laminar. Se procedió a sumergir las yemas en alcohol 70 por ciento por 1 minuto y luego con hipoclorito de sodio (1por ciento) más tween 20 (0,1 por ciento) por 20 minutos. Finalmente, se enjuagaron 3 veces con agua destilada estéril, cada vez por tres minutos. Además, el medio de cultivo que contenía 150mg/l estreptomycin. Con esto, se redujo la profanación de hongos y bacterias en el cultivo; sin embargo, la tasa de contaminación es alta, por lo que los ensayos continúan actualmente. Por otro lado, aún no se consigue la regeneración de las yemas. (Briceño, Isabel, Vásquez, Juan, y Chia Wong, 2010)

2.2. BASES TEÓRICAS CONCEPTUALES DE *THEOBROMA*

2.2.1. ANTECEDENTES HISTÓRICOS DE *THEOBROMA CACAO*

El origen del árbol de cacao (*Theobroma cacao* L.) se habría producido aproximadamente hace unos 4,000 años, en la región de las cuencas de los ríos Amazonas y Orinoco, al presente territorios de Venezuela, Colombia y Ecuador. Sin embargo, las más pretéritas referencias históricas sobre su cultivo consignan a Centroamérica, unos mil años antes de la llegada de Colón, durante el desarrollo de la civilización Maya. Posteriormente, la especie fue aprovechada también por los aztecas asentados en lo que hoy es México desde donde, a través de los españoles, pasó a Europa y de ahí al resto del mundo. (Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura [IICA], 2009)

La historia relata que el emperador azteca Moctezuma obsequió, en 1520, a Hernán Cortés y a sus soldados con xocolatl. El español evidenció que sus tropas podían soportar todo un día de jornada forzada consumiendo solo un vaso de xocoatl. Moctezuma creía que el conquistador español era la reencarnación de Quetzacoatl, el Dios-Rey tolteca, y por tal motivo le concedió la plantación real de cacao de Manialtepec, la que Cortés aprovechó muy bien, ya que estableció con los indígenas el intercambio de las avellanas del árbol del cacao por oro. (Valenzuela, 2007)

Esta referencia histórica habría servido como fundamento para dar al cacao el nombre científico *Theobroma*, término que en griego significa “alimento de los dioses”. Los mayas nombraron al cacao “cacau” y fueron quienes establecieron las primeras plantaciones cacaoteras en Centroamérica. En la civilización maya el cacao simbolizó riqueza y poder (López, Delgado, y López , 1992).

IICA (2009) menciona que el Perú la introducción del cultivo fue análoga a la del café, ambos asociados al proceso de colonización de la selva que se produjo a partir de 1930, durante el cual grandes contingentes de pobladores andinos y algunos grupos de migrantes europeos se trasladaron hacia la Amazonía y añadieron al cultivo de productos tradicionales como el plátano y la yuca, la producción de maíz amarillo duro, arroz, cítricos, café y cacao. Entre 1970 y 1980, el cultivo del cacao se expandió asociado a otros productos en zonas con condiciones apropiadas de humedad, temperatura y sombra de bosques. Su producción se orientó a cubrir la demanda del mercado internacional tradicional, por entonces, poco dinámico.

2.2.2. MORFOLOGÍA Y TAXONOMÍA DE CACAO

Su nombre científico *Theobroma Cacao* L. le fue impuesto en 1758 por el botánico sueco Carlos Linneo, que significa en griego: “alimento de los dioses”. La primera clasificación de las plantas familiarizadas con el cacao fue realizada en Guatemala, en 1869, por el botánico suizo Gustavo Bernouille. A la fecha, el género *Theobroma Cacao* L. agrupa un total de 24 especies botánicas (Gutiérrez, 2012).

- Reino: Vegetal
- Tipo: Espermatofita
- Subtipo: Angiosperma
- Clase: Dicotiledoneas
- Subclase: Dialipetalas
- Orden: Malvales
- Familia: Malvaceae
- Género: *Theobroma*
- Especie: *cacao*
- Nombre Científico: *Theobroma Cacao* L. (Ministro de Agricultura y RiegoMINAGRI, 2016).

El cacao es una planta perenne, posee 20 cromosomas y su polinización es cruzada (alógama), su reproducción puede ser de forma sexual (semillas) y asexual (ramas) (Ártica, 2008).

2.2.3. DISTRIBUCIÓN Y HÁBITAT

El árbol del cacao se cultiva en las regiones tropicales. Es comercialmente cultivada entre 15° al norte y 15° al sur de la línea ecuatorial. Sin embargo, se puede encontrar hasta las latitudes subtropicales entre 23°26' (límite del Trópico de Cáncer) al norte y 23°26' (límite del Trópico de Capricornio) al sur de la línea ecuatorial. El rango de temperatura promedio anual va de 23° a 30° C, siendo el óptimo de 25° C.5 Se cultiva desde el nivel del mar hasta los 1 200 msnm, siendo el óptimo de 500 a 800 msnm. Asimismo, necesita humedad relativa anual promedio de entre el 70% y 80% (Aliaga, 2014,p9).

Según Wood (1985) y Lass (1985) mencionan que “el cultivo de cacao es encontrado alrededor del mundo en la zona tropical, cuya área de desarrollo alcanza en el extremo norte, hasta Hainan en China y en el extremo sur hasta Sao Paulo, Brasil. Dentro de los principales países productores se encuentran Costa de Marfil, Ghana, Indonesia, Nigeria, Brasil, Camerún, Ecuador y Malasia; siendo la región de África Occidental una de las mayores productoras” (p207).

claro. Las ramas primarias se forman en verticilos terminales con 3 a 6 ramillas; al conjunto se le llama “molinillo”. El hábito de crecimiento es dimórfico, con brotes ortotrópicos o chupones que tienen hojas en espiral y las ramas plagio trópicas o en abanico con hojas alternas (León, 2000, p.522).

Las hojas son simples, con un pecíolo corto, enteras de forma oblonga a lanceolada-oblonga, miden de 10 a 12 cm de largo y tienen el ápice muy acuminado, margen entero y ondulado. La superficie de ambas caras es lisa y brillante y de colores variables que van desde morado hasta verde pálido (León, 2000, p.522).

El cacao es una especie cauliflora, es decir, con sus flores incrustadas sobre el tronco o en las antiguas ramificaciones sostenidas por un pedicelo de 1 a 3 cm. Las flores son pequeñas, hermafroditas, con coloraciones rosadas, púrpuras o blancas de 0,5 a 1 cm de diámetro y de 2 a 2,5 cm de largo en forma de estrella con 5 pétalos de 6 mm alternos con 5 sépalos angostos y ampliamente extendidos (Wood y Lass, 1985).

El fruto es una mazorca de 15 a 25 cm de largo, dentro de la cual se hallan las semillas saturadas en una pulpa mucilaginoso; el número de semillas puede estar entre 30 a 40, las que se convierten en el grano del cacao después de ser fermentadas y secadas. Las mazorcas salen del tronco principal y de las ramas de la copa. El cacaotal comienza a producir a partir del cuarto o quinto año de haber sido plantado y puede producir por decenios (Wood y Lass, 1985).

El cacao es un arbusto alógamo de ciclo vegetativo perenne y diploide ($2n=20$), generalmente la polinización es entomófila llevada a cabo por individuos del género *Forcipomya*. Anualmente, una planta produce de 100 000 a 150 000 flores, de las cuales sólo se fecundan entre el 0,1 y 0,3 por ciento cuyos frutos maduran de 5 a 6 meses después de la polinización (Marín, 1997).

2.2.5. ASPECTO EDÁFICOS Y CLIMA

a. Clima

En cuanto a las condiciones edafoclimáticas del cacao, la precipitación pluvial óptima para el cultivo de la planta está en el rango entre 1,600-2,500 milímetros, distribuidos a lo largo del año. Precipitaciones mayores a los 2,600 milímetros pueden causar daños a la planta y la calidad de la producción. la temperatura media óptima es de 25° C, con rango a variaciones entre 23° y 30° C. En general, estos requerimientos de temperatura definen también las altitudes y lugares en los que el cultivo se puede desarrollar de manera óptima. Asimismo, necesita humedad relativa anual promedio de entre el 70% y 80%. (Aliaga, 2014).Otras condiciones edafoclimáticas consideradas son vientos suaves y luminosidad media, razones por las que se encomienda que el cultivo sea manejado en un sistema agroforestal de sombra (IICA,2009).

La luminosidad es inestable dependiendo del ciclo productivo en el que se encuentre, siendo del 40% al 50% para el cultivo en crecimiento (menor de 4 años) y del 60 al 75% para plantación en producción (mayor de 4 años) (MINAGRI, 2016).

b. Suelos

Los suelos más apropiados para el cultivo del cacao son los de origen aluvial, francos y profundos, con subsuelo permeable, con profundidad mínima de un metro. Otras características para considerar son, buen drenaje, pH entre 6.0 y 6.5, aunque el cacao es una planta tolerante a rangos excesivos de alcalinidad, entre 4.5 y 8.5 (IICA, 2009).

2.2.6. DIVERSIDAD GENÉTICA

Gatica(1994) menciona “La diversidad genética de las poblaciones cultivadas de cacao es tan amplia que se consideraba que incluía tres grupos diferenciados según: *Theobroma cacao* L. que agrupa a los criollos, forasteros y trinitarios. Además, existen otras especies que no se cultivan en áreas grandes pero que tienen valor por el uso doméstico que se les asigna en algunos países o regiones (p77).

a. Criollo

Son árboles débiles, de pausado crecimiento, bajo rendimiento y más susceptibles enfermedades y plagas. Se caracterizan por tener frutos alargados, mazorcas de color rojo o amarillo en la madurez, los cotiledones frescos son de color blanco o violeta pálido. Su sabor es delicado, suave y complejo, y su aroma es intenso, lo hacen un tipo de cacao característico y demandado en los mercados más exigentes del mundo requieren de un período corto para fermentar (2-3 días), es muy aromático y se los designa comercialmente como “cacao fino” (Vera, 1987).

Este grupo se cultivó primeramente en Mesoamérica donde ya son muy raros, luego en Suramérica, se cruzaron con poblaciones forasteras, dando origen al grupo Trinitario (León, 2000).

Ramirez (2010) afirma que “en la actualidad solo representa entre el 5% al 8% de la producción mundial, en la medida que su cultivo es muy difícil, propenso a plagas: esta situación ha influido en la limitada propagación e incluso disminución de sus áreas de cultivo (p44).

b. Trinitario

Los Trinitarios no se hallan en estado silvestre, son descendientes de cruces entre los Criollos y poblaciones locales de Forasteros; principalmente América del Sur está ocupada por esta variedad. Las poblaciones de Trinitario tienen

características de mazorca y semilla usualmente variables, debido a los caracteres altamente contrastantes de sus ancestros (León y Toxopeus,1985).

c. Forastero

Toxopeus (1985) afirma que “este grupo tiene su origen en el Amazonas e incluye poblaciones silvestres, semi silvestres y cultivadas. Estos se caracterizan por sus mazorcas verdes que al madurar se tornan amarillas, su cáscara es lisa y extremadamente dura, cada mazorca tiene más de 30 semillas de color violeta oscuro o púrpura de forma aplastada (p37).

Se subdividen formas de fruto calabacillo, cundeamor, angoleta y amelonados, que poseen características de alto rendimiento y resistencia a enfermedades. Desde el punto de vista comercial, en el mercado mundial generalmente se clasifican los granos de cacao en dos categorías (Quintero, 2004).

Cacao ordinario: granos producidos por los cacaos tipo Forastero; éstos son utilizados en la fabricación de manteca de cacao y de productos que tengan una elevada proporción de chocolate.

Cacao fino o de aroma: en términos ordinarios, los granos de cacaos Criollos y Trinitarios corresponden a lo que en el mercado mundial se conoce como cacao fino o de aroma. Éste es utilizado usualmente en mezclas con granos ordinarios o Forastero para producir sabores específicos en los productos terminados. Los granos correspondientes a esta categoría dan características específicas de aroma o color en chocolates finos de revestimientos o capas de cobertura. También se usan (aunque cada vez menos) para producir cacao en polvo que se emplea como aroma en algunas recetas y en la preparación de algunos alimentos y bebidas (PROAMAZONÍA, 2003).

Uno de los principales problemas que enfrenta la cadena productiva del cacao en el Perú es la alta incidencia de plagas y enfermedades que afecta tanto el nivel de rendimiento de la planta como la calidad de los frutos. Según un estudio de

caracterización de las zonas cacaoteras, la incidencia de la moniliasis llega hasta el 85 por ciento y la “escoba de bruja” hasta el 30 por ciento en algunas zonas productoras (PROAMAZONÍA, 2003).

2.2.7. IMPORTANCIA DEL GÉNERO THEOBROMA

a. Social

El cacao es un producto de exportación importante para muchas economías en desarrollo: en África, Asia y América Latina. Según la Organización Internacional del Cacao en el 2012, su producción representó un valor en el mercado de US\$ 12 mil millones y es un medio de sustento para un estimado de entre 40 y 50 millones de personas. De los más de 50 países que producen cacao, solo 10 países tienen condiciones edafoclimáticas para producir cacao de fino aroma y sabor, uno de ellos es el Perú. (International Cocoa Organization [ICCO], 2012)

Actualmente la producción nacional de cacao está distribuida en 106 mil hectáreas, lo que originó alrededor de 7,7 millones de jornales anuales, favoreciendo de manera directa a más de 90 mil familias, e indirecta a 450 mil personas (Vinelli, 2015).

b. Ambiental

El cacao es un producto nativo de la Amazonía y su manejo se efectúa dentro del bosque junto con otras especies de la flora y la fauna. En los últimos años, el cacao también ha obtenido gran importancia en el contexto de la política ambiental del estado peruano, como parte de acciones de adaptación frente al cambio climático, fenómeno que, en la ceja de selva, combinado con la tala indiscriminada, está generando la desertificación acelerada de varias cuencas (IICA, 2009).

El cacao es apreciado, junto con el café, una de las principales especies que deben ser cultivadas intensivamente en la ceja de selva mediante el sistema agroforestal, es decir, asociada a forestales que constituyan bosques permanentes de sombra y protección de suelos en ladera. Se pretende así contener el avance de la desertificación de las regiones de bosque húmedo por deforestación para la propagación del cultivo del maíz amarillo duro, arroz y de la ganadería extensiva. El sistema de producción del cacao predominante en el país es de carácter extensivo, básicamente de recolección, por lo que su presión sobre el medio ambiente es exigua. (IICA, 2009)

2.3. MICROPROPAGACIÓN

Villalobos y Thorpe (2010), afirman que la micropropagación consiste en cultivar asépticamente diferentes explantes constituidos por fracciones de un tejido u órgano que se extrae de la planta, la micropropagación es una multiplicación masiva in vitro.

Consiste en la propagación de plantas en un ambiente artificial controlado, empleando un medio de cultivo adecuado. Es una técnica basada en la capacidad que poseen las células vegetales de dividirse y de regenerar órganos y plantas enteras, cuando son sometidas a condiciones nutritivas y ambientales adecuadas y son estimuladas con determinados reguladores de crecimiento. Las características esenciales del método son: Es una propagación vegetativa, es decir, sin participación de los órganos reproductores de la planta, por medio de la estimulación de la inducción de yemas axilares que darán lugar a nuevos brotes que, una vez enraizados, formarán las nuevas plantas. Es una propagación masiva, ya que la formación de yemas puede ser estimulada en gran número y en corto espacio de tiempo. (Velázquez, 1997)

Además, es una propagación clonal, ya que la formación de yemas axilares asegura la producción de plantas conformes genéticamente al tipo original. Es una propagación in vitro porque tiene lugar en frascos de cultivo (originalmente de vidrio, aunque actualmente se emplea el plástico cada vez más), y con medios de cultivo definidos en los que se controla la composición y concentración de sus

componentes. Tiene lugar fuera del ambiente natural, en cámaras de cultivo donde son controladas las condiciones ambientales (luz, temperatura, humedad relativa) que se mantienen a unos niveles óptimos para el crecimiento). Se mantienen las condiciones asépticas en todas las manipulaciones, evitando las contaminaciones por hongos o bacterias que proliferarían con rapidez en el medio de cultivo afectando negativamente el cultivo de tejidos. Para ellos es esencial la esterilización del material vegetal y de los frascos y medios de cultivo. Las características de una planta en condiciones de laboratorio (in vitro) respecto a una planta en condiciones naturales (in vivo), no realiza fotosíntesis, crecimiento en condiciones controladas, crecimiento en condiciones de asepsia, alta humedad relativa, estomas no funcionales, ausencia de pelos radiculares, ausencia de cera en la cutícula. (Velázquez, 1997)

2.3.1. VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE LA MICROPROPAGACIÓN

George y Sherrington (1984), Roca y Mroginski (1991) y Seemann (1993) (como se citó en Dubos, 2006) la micropropagación es una técnica que ha mostrado importantes ventajas en comparación con los métodos convencionales de propagación en algunas especies.

Estas se pueden resumir como sigue:

a. Ventajas de la micropropagación

- Propagación vegetativa rápida y a gran escala.
- Posibilidad de multiplicar grandes cantidades de plantas en una superficie reducida, a bajos costos y en tiempos económicamente rentables.
- Posibilidad de multiplicar rápidamente una variedad de la cual solo existan pocos individuos (Conservación de germoplasma.).
- Mayor control sobre la sanidad del material propagado.
- Facilidades para el intercambio internacional de material vegetal.

b. Desventajas de la micropropagación

Sin embargo, según Hartmann y Kester (como se citó en Dubos, 2006) la micropropagación a escala comercial posee características particulares que podrían crear problemas y por ende limitan su uso. Estas desventajas se pueden resumir como sigue:

- Requerimiento de costoso y sofisticado material de trabajo, entrenamiento del personal y especialización técnica.
- Alto costo inicial de las labores.
- La contaminación puede causar altas pérdidas en corto tiempo.
- Contaminación endógena y superficial de los explantes cultivados
- Se requiere un volumen alto, más o menos continuo en el sistema de distribución de materiales e insumos.

2.3.2. FASES O ETAPAS DE LA MICROPROPAGACIÓN:

Castillo (2004), menciona que el proceso de micropropagación diferenciamos varias fases:

Fase 0: preparación de la planta madre

La planta donadora de yemas se mantiene en un invernadero bajo condiciones controladas. En ese ambiente se cultiva la planta en condiciones sanitarias óptimas y con un control de la nutrición y riego adecuados para permitir un crecimiento vigoroso y libre de enfermedades.

Fase 1: desinfección del material vegetal

Una vez elegida la planta madre, se extraerán los fragmentos y se realizará la desinfección ,a partir de los cuales se obtendrán los explantes. Los explantes pueden ser yemas, trozos de hojas, porciones de raíces, semillas, etc. A efectos de obtener las condiciones de asepsia, se trabajará en cabinas de flujo laminar para extraer los explantes a partir del material vegetal.

Fase 2: introducción del material in vitro

Luego de la desinfección superficial, las semillas o las yemas dependiendo del material seleccionado, se ponen en medio de cultivo estéril. En un período de una semana o quince días, comienza el proceso de germinación o regeneración de nuevos tejidos vegetales, iniciando el ciclo de cultivo in vitro.

Fase 3: multiplicación de los brotes

Durante esta fase se espera que los explantes que sobrevivieron la FASE 1 y 2 originen brotes (de procedencia axilar o adventicia) con varias hojas. En la base de cada hoja hay una yema que se desarrollará luego de ser puesta en contacto con el medio de cultivo. Periódicamente estos nuevos brotes se deben subcultivar en un nuevo medio mediante divisiones y resiembras en tubos de cultivo u otros recipientes adecuados. Estas operaciones se realizan en la cámara de flujo laminar o en un lugar aislado que nos permita mantener las condiciones de asepsia. De esta forma aumenta el número de plantas en cada repique o división de las plantas.

El número de plantas que se obtiene dependerá de la especie vegetal y de las condiciones del medio de cultivo. El número de plantas que se obtiene por la vía de la micropropagación permite alcanzar incrementos exponenciales, considerando que todos los factores que afectan el crecimiento hayan sido optimizados.

Fase 4: elección de un medio de enraizamiento de los explantos

Para enraizar los explantes se utilizan principalmente plantines individuales de un tamaño aproximado de 2 centímetros. Los brotes obtenidos durante la fase de multiplicación se transfieren a un medio libre de reguladores de crecimiento o que solo contenga hormonas del tipo auxinas. Algunas especies de plantas no necesitan pasar por esta etapa y emiten sus raíces en

el mismo medio de cultivo donde desarrollan yemas nuevas, por lo tanto, el proceso de multiplicación y enraizamiento transcurren en forma simultánea.

Fase 5: aclimatación de los explantes enraizados

Etapa en que se extraen los explantes o plantines enraizados de los frascos, y se los lleva a un ambiente en el cual vas adaptando al explanto a condiciones normales de campo, hasta lograr que la planta deje de ser heterótrofa a autótrofa y pueda desarrollarse normal en el medio natural.

2.3.3. FACTORES QUE INFLUYEN EN LA MICROPROPAGACIÓN

Planta donante: Roca y Mroginski(1991), mencionan que el estado fisiológico como sanitario de la planta madre que da el explante influyen significativamente en su capacidad morfogénica. Asimismo, se ha observado que la edad fisiológica del explante tiene gran influencia en la morfogénesis. Se sabe que mientras más joven y menos diferenciado esté el tejido que se va a sembrar, mejor será la respuesta in vitro.

El explante.: Georgee y Sherrington(1984), mencionan que la propagación in vitro de la mayoría de las especies leñosas demanda de la utilización de explantes provenientes de material juvenil. El tamaño del explante es otro aspecto que se debe tener en cuenta para el establecimiento de un cultivo. Continuamente existe un tamaño óptimo para los explantes usados para iniciar un cultivo de tejidos. Explantes muy pequeños, ya sean brotes o meristemas, fragmentos enteros de tejidos de plantas o piezas de callos, no sobreviven bien en cultivos, y por el contrario el uso de explantes grandes puede traer consigo la dificultad de realizar una desinfección efectiva como también una pérdida en la facilidad en la manipulación de estos.

Para enraizar los explantes se utilizan principalmente plantines individuales de un tamaño aproximado de 2 centímetros. (Castillo, 2004)

Factores físicos: Bhojwani y Razdan (como se citó en Dubos, 2006) señalan que la micropropagación se puede llevar a cabo entre rangos de temperatura de 22 a 25°C durante el periodo de luz y de 15 a 18°C en el periodo de obscuridad. La intensidad

lumínica por lo general fluctúa desde 1.000 a 5.000 lux y va a depender de la cantidad de tubos instalados por repisa y de la calidad de tubo fluorescentes. El fotoperiodo es otro aspecto importante en incubación, debe ser regulado con exactitud, evitando influencias del fotoperiodo natural, por lo que la sala de incubación no debe poseer ventanas. Usualmente el fotoperiodo se regula a 12-16 horas.

Medio de cultivo. Margara (1988), menciona que la micropropagación de especies vegetales demanda el uso de medios de cultivo más o menos complejos que están compuestos por macro y micronutrientes, aminoácidos y vitaminas, fitohormonas o reguladores de crecimiento, compuestos orgánicos complejos, carbohidratos y eventualmente un gelificante.

El pH: Araos (como se citó en Dubos, 2006) afirma que en muchos casos refleja la aprovechabilidad de los nutrientes para las plantas, ya que determina en parte la solubilidad de elementos químicos (del suelo) y a veces indica su abundancia relativa.

Seemann (como se citó en Dubos, 2006) menciona que antes de adicionar el gelificante al medio debe regularse el pH a valores entre 5 y 6,5, debido a que valores menores o mayores pueden detener el crecimiento. El pH del medio antes y después del autoclavado es diferente, bajando 0,3 a 0,7 unidades después del proceso de esterilización de los medios. Del mismo modo, durante el crecimiento de los cultivos puede bajar el pH del medio por síntesis de algunos metabolitos, lo cual en algunos casos produce licuación del medio.

2.3.4. MEDIOS DE CULTIVO

Seemann (como se citó en Dubos, 2006) afirma que la micropropagación de especies exige el uso de medios de cultivo más o menos complejos que están compuestos por macro y micronutrientes, aminoácidos y vitaminas, fitohormonas o reguladores de crecimiento, compuestos orgánicos complejos, carbohidratos y eventualmente un gelificante. Se han descrito un gran número de medios nutritivos para el cultivo de vegetales in vitro (Heller, 1953, 1954; Murashige & Skoog, 1962;

Gamborg, 1968 y 1970; Schenk & Hildebrandt, 1972; De Fossard, 1976 y Campbell y Durzan (1975).

2.3.5. COMPONENTES NUTRICIONALES DE LOS MEDIOS DE CULTIVOS

Hidalgo(2014) sostiene que, en los cultivos in vitro cada especie vegetal, y por consiguiente todo órgano o tejido, deben ser considerados como un caso particular. Para los cultivos vegetales se hace necesaria la adición de macro y microelementos, todos deben estar presentes en el medio acuoso en estados de iones.

Hartmann y Kester(1987) afirman que los principales componentes de los medios de cultivos son los siguientes:

a. Macro y micronutrientes

Macronutrientes (N, P, K, S, Ca y Mg) y Micronutrientes (Fe, B, Mn, Zn, Cu, Mo, y Co), son la base de la nutrición mineral de las plantas y aseguran el metabolismo y los procesos fisiológicos como la fotosíntesis, crecimiento y reproducción celular. (Margara, 1988).

b. Vitaminas y aminoácidos

Hidalgo (2014), sostiene que las vitaminas benefician el crecimiento celular; la tiamina es un suplemento vitamínico indispensable para los cultivos in vitro, los cuales, en su ausencia, son difícil de proliferar; también se utilizan el ácido nicotínico, piridoxina, riboflavina y biotina, presentando efectos favorables en los cultivos vegetales. Estas sustancias son efectivas en pequeñas cantidades y actúan como factores de la división celular o del crecimiento, ya que ambos cesan cuando algún compuesto escasea en el tejido de la raíz.(Margara, 1988)

Entre las vitaminas que se incluyen normalmente en los medios de cultivo la tiamina, es la más importante (0,1 a 0.4 mg/L), el ácido nicotínico (0.5 mg/L), piridoxina (0.5 mg/L), inositol (100 mg/L), ácido pantoténico (0,1 mg/L) y biotina (0,1 mg/L). (Margara, 1988)

Roca y Mroginski (como se citó en Dubos, 2006) menciona que se han incorporado aminoácidos a los medios de cultivo, siendo la glicina la que más se usa en la preparación de los medios de cultivo.

c. Sustancias orgánicas

Hartmann y Kester (1987) mencionan “La sacarosa es la más utilizada como fuente de carbono, aunque para determinadas especies se utilizan la glucosa y la fructosa. Se recomienda suministrar al medio algún compuesto antioxidante como por ejemplo el ácido ascórbico (100 mg/L) o ácido cítrico (150 mg/L) especialmente en aquellas especies de difícil establecimiento (p75).

d. Agentes gelificantes

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

2.3.6. REGULADORES DE CRECIMIENTO

Entre las sustancias de clara influencia sobre las reacciones y el metabolismo vegetal, se cuentan los compuestos internamente sintetizados llamados hormonas. En general, el término “hormonas” se hace referencia a ciertos compuestos orgánicos que ejercen importantes efectos de regulación del metabolismo de un organismo, aun cuando operen en cantidades minúsculas (Meyer, 1981).

Auxinas. - En cultivo in vitro las auxinas son utilizadas principalmente para la diferenciación de raíces y la inducción de callo. Las auxinas más utilizadas son: IBA (ácido indol-3-butírico), NAA (ácido naftalenacético), IAA (ácido indolacético) y 2,4-D (ácido diclorofenoxiacético). El IBA y el ANA son usados frecuentemente para enraizamiento. El 2,4-D es muy efectivo para la inducción de callos. Las auxinas se disuelven usualmente en etanol diluido o en una solución de hidróxido de sodio (Montalvo, 2001).

Citoquininas. - Estas estimulan la división celular y se encuentran en casi todos los tejidos y órganos; son abundantes en los granos, frutas y raíces. Las más importantes son: zeatina (natural), kinetina y la bencilaminopersina (BAP o BA, sintética). La más utilizada es el BAP, que es un compuesto muy activo y de fácil conservación, se lo utiliza en concentraciones de 0,03 - 30,0 mg/L. Pueden utilizarse a concentraciones muy fuertes para favorecer la proliferación in vitro de meristemas axilares en cultivo de ápices y para permitir la obtención de macollos de yemas (Hidalgo, 2014).

Gibberalinas. - También conocida como ácido giberélico, estimulan el alargamiento celular de los entrenudos del tallo y pedúnculos florales, rompen la dormancia de gran número de brotes y semillas. El ácido giberélico en altas concentraciones produce desdiferenciación celular, provocando la formación de callos, y en pequeñas cantidades combinadas con auxinas y citoquininas forman callos aéreos en el área de corte de los explantes; participan también en la formación de brotes adventicios y hacen brotar los embriones. Es una hormona muy potente, cuya presencia natural en plantas controla su desarrollo. Se lo usa generalmente en concentraciones de 0,1 a 1,0 mg/L. (Hidalgo, 2014)

2.3.7. SUSTRATOS

Según Vifinex (como se citó en Campo, 2018) indica:

Un sustrato es un medio material en el que se desarrollan las raíces de las plantas, capaz de proporcionar el agua y los elementos nutritivos que demande, y a las raíces el oxígeno necesario para su respiración. Pueden clasificarse según su composición en Orgánicos e inorgánicos, los sustratos orgánicos o químicamente activos son: turbas, acícula de pino, cascarilla de arroz, aserrín, etc., dentro de los sustratos inorgánicos tenemos: gravas, las arenas de distintas granulometrías y las tierras de origen volcánico. Las diferencias entre ambos vienen determinadas por la capacidad de intercambio catiónico o la capacidad de almacenamiento de nutrientes por parte del sustrato. Los sustratos químicamente inertes actúan como soporte de la planta, no interviniendo en el proceso de adsorción y fijación de los nutrientes, por lo que han de ser suministrados mediante fertilización. Los sustratos químicamente activos sirven de soporte a la planta, pero a su vez actúan como

depósito de reserva de los nutrientes aportados mediante la fertilización, almacenándolos o cediéndolos según las exigencias del vegetal.

a) Propiedades físico- químicas

- **Propiedades físicas**

Tenemos: su composición granulométrica (partículas de distintos tamaños), densidad real (es la densidad media de las partículas del sustrato sin incluir el espacio poroso), densidad aparente (es la relación entre el peso seco de dicho sustrato y el volumen que ocupa en condiciones de cultivo), espacio poroso total (porcentaje del volumen del sustrato no ocupado por el material sólido, este volumen está lleno de aire en los macroporos y de agua en los microporos), capacidad de absorción de agua (capacidad de agua expresada en gramos, que 100 gramos de sustrato seco pueden retener).

- **Propiedades químicas**

Es toda aquella variable que está sujeta a cambios químicos o de composición química, en otras palabras, es la transferencia de materia entre el sustrato y la solución nutritiva que alimenta las plantas a través de las raíces, así encontramos la, Capacidad de intercambio catiónico, pH, capacidad tampón, contenido de sales (presión osmótica, conductividad eléctrica), contenido de elementos nutritivos, etc.

- **Turbas.**

Son materiales de origen vegetal más o menos húmificados y descompuestos y la más utilizada como sustrato, con una capacidad de intercambio iónico mayor, aireación y drenaje muy mejorado, alto contenido de nutrientes, mayor capacidad de retención de humedad que cualquier otro tipo de materia orgánica, etc.

- **Humus**

Resultado de la digestión de materia orgánica (compost, estiércol descompuesto, vegetales, etc.) por las lombrices, obteniéndose uno de los abonos orgánicos de mejor calidad.

- **Arenas**

Son materiales procedentes de canteras naturales y su composición depende fundamentalmente del origen de las rocas de las que proceden, silíceas y calcáreas, su tamaño comprendido entre los 0.02 y los 2 mm de diámetro. Suele hacerse la distinción, a efectos de clasificación, entre arenas gruesas (entre 0.2 y 2 mm) y arenas finas (entre 0.02 y 0.2 mm).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. HIPÓTESIS

La micropropagación de *Theobroma cacao* L. “cacao nativo”, depende del medio de cultivo y los reguladores de crecimiento vegetal empleados.

3.2. MATERIALES

a. Material Biológico

Constituido por plantas injertadas con yemas provenientes de planta madre de cacao criollo.

b. Reactivos

- Constituyentes de los Medios Basales de: Murashige y Skoog (1962), Campbell y Durzan (1975) y De Fossard et al (1974) M.
- Reguladores de Crecimiento: N6 – Bencil aminopurina (BAP), Kinetina (Kin), Ácido Naftalen Acético (ANA) y Ácido Indol Butírico (AIB).
- Agar
- Sacarosa
- Hidróxido de potasio (KOH) e Hidróxido de sodio.
- Hipoclorito de calcio (Ca (CLO)2)
- Agua destilada estéril
- Alcohol al 70%
- Tween 80

c. Material de Vidrio

- Tubos de ensayo de 25mm x 150 mm
- Cajas petri
- Pipetas de 1, 2, 5 y 10 ml
- Frascos para reactivo
- Embudo
- Erlenmeyer de 250, 500 y 1000 ml
- Probetas de 10, 25, 50, 100 y 250 ml
- Mechero de alcohol
- Matraz de 100, 250 y 500 ml

d. Equipos

- Temporizador de iluminación.
- Refrigeradora
- pH-metro
- Autoclave
- Agitador magnético
- Cámara de flujo laminar
- Balanza analítica
- Equipos fluorescentes de 40 W
- Destilador de agua

e. Otros

- Papel aluminio
- Cinta teflón
- Hojas de bisturí
- Papel de filtro
- Lapiceros marcadores
- Libreta de apuntes
- Material de escritorio
- Gradillas

3.3. METODOLOGÍA

a. Preparación de Medios de Cultivo

Se realizó mezclando soluciones madre de macronutrientes, micronutrientes, vitaminas, aminoácidos, reguladores de crecimiento, sacarosa y agar, según cantidades indicadas por los autores, en relación con las fases y tratamientos en estudio, posteriormente se midió el pH, el cual fue ajustado a 5.8 ± 0.2 con hidróxido de sodio (NaOH) e Hidróxido de potasio (KOH) al 0.1 N, en agitación.

Los medios de cultivo preparados se distribuyeron en volúmenes de 10 ml en los tubos de ensayo esterilizados, cubriendo la boca del tubo con papel aluminio, para finalmente esterilizarlo en la autoclave a 121°C, durante 25 minutos, posteriormente se dejó solidificar el medio a temperatura ambiente y mantenerlo en un lugar estéril para su respectivo uso.

b. Obtención del explante

La planta madre de cacao criollo CSC17 fue identificada en la parcela del señor Vásquez Ramírez Julio, Caserío de Canana; Distrito de Bellavista; Provincia de Jaén, la identificación se dio mediante el proyecto “Colección de plantas madre de cacao criollo en Jaén-San Ignacio”, ejecutado por la Cooperativa de Servicios Múltiples Sol&Café. En el Anexo N°4 describe en detalle toda la información disponible sobre el comportamiento agronómico del material seleccionado y su potencial productivo.

Las yemas recolectadas se injertaron y se mantuvo en un ambiente controlado para evitar agentes patógenos como bacteria, hongos y virus, se mantuvo bajo dosis de fungicidas 15 días antes de la obtención de los explantes. En un tiempo determinado de tres meses la yema de cacao criollo generó rebrotes para obtener los explantes.

Ubicación de la planta madre:

Departamento: Cajamarca

Provincia: Jaén

Distrito: Bellavista

Caserío: Canana

Coordenadas UTM: Este 750077 - Norte 9393510

Altitud :482 msnm

c. Fase de Desinfección

Consistió en la esterilización de los explantes que es indispensable en los cultivos in vitro. La eliminación de agentes patógenos contaminantes presentes en la superficie del explante. Los explantes se cortaron de las plantas injertadas , se sumergieron a una solución de jabón comercial , fueron enjuagados 3 veces con agua destilada, posteriormente se sometieron a un baño con alcohol etílico al 70% por 30 segundos, seguidamente se enjuagaron con agua destilada esterilizada y se colocaron en la solución de hipoclorito de calcio ($\text{Ca}(\text{ClO})_2$) al 3 por ciento mas 3 gotas de Tween[®] 80 (detergente) durante 5, 10, 15 y 20 minutos, una vez transcurrido estos tiempos, las yemas fueron enjuagadas repetidas veces en agua destilada (10 veces) estéril en la Cámara de Flujo Laminar, para finalmente colocarlas en placas petri esterilizadas, donde se obtuvieron los explantes del tamaño adecuado (2 cm aproximadamente).

d. Fase de Crecimiento

Bajo condiciones asépticas los explantes esterilizados en la fase de desinfección fueron sembrados en los tubos de ensayo contenidos con diferentes medios de cultivo en la Cámara de Flujo Laminar (se colocó un explante por tubo de ensayo), cada uno de ellos fueron sellados con papel aluminio y cinta teflón. Los tubos etiquetados por tratamiento fueron colocados en gradillas se mantuvieron en un cuarto de cultivo, ambiente controlado con temperatura promedio de $23^\circ\text{C} \pm 2$, a una exposición de luz de 16 horas y 8 horas oscuridad, por un periodo de 60 días.

e. Fase de Multiplicación

En esta fase se utilizaron los explantes del medio de cultivo de mayor crecimiento, es decir el medio de Murashigue & koog (1962) ; los tubos con explantes de mayor crecimiento fueron llevados a la Cámara de Flujo Laminar, en condiciones asépticas fueron extraídas y puestas en una placa petri esterilizada, el tallo fue cortado en segmentos, para proceder a sembrar un segmento por tubo de ensayo que contenía el medio de multiplicación, Murashigue & koog (1962) y los reguladores de crecimiento BAP y KIN en concentraciones establecidos en los tratamientos. Finalmente, los tubos fueron llevados al cuarto de cultivo por un periodo de 30 días.

f. Fase de Enraizamiento

Bajo condiciones asépticas los brotes inducidos en la fase de multiplicación fueron repicados en tubos de ensayo conteniendo el medio de Murashigue & Koog (1962), y los reguladores de crecimiento AIB y ANA en concentraciones según los tratamientos establecidos, finalmente se mantuvieron al cuarto de cultivo por un tiempo de 30 días, transcurrido este tiempo se notó la formación de primordios radiculares.

g. Fase de aclimatación

Las plántulas con raíces formadas en la fase anterior fueron llevadas a un invernadero con los sustratos establecidos en los tratamientos, previamente desinfectados con agua y lejía.

3.4. TRATAMIENTOS EN ESTUDIO

a. Desinfección

Tabla 1 : Tratamientos aplicados en la fase de desinfección de los explantes de *Theobroma cacao* L. “cacao criollo” (CSC 17).

Tratamiento	Descripción	Tiempo de exposición	Repeticiones
I	Ca (CLO)2 al 3% + 3 gotas de tween 80	5 minutos	10
II	Ca (CLO)2 al 3% + 3 gotas de tween 80	10 minutos	10
III	Ca (CLO)2 al 3% + 3 gotas de tween 80	15 minutos	10
IV	Ca (CLO)2 al 3% + 3 gotas de tween 80	20 minutos	10

Fuente: Elaboración propia

b. Crecimiento

Tabla 2: Tratamientos aplicados en la fase de crecimiento de *Theobroma cacao* L. “cacao criollo” (CSC 17).

TRATAMIENTO	DESCRIPCIÓN	REPETICIONES
I	Murashigue & Skoog (1962)	10
II	Campbell y Durzan (1975)	10
III	Fossard et al (1974) M	10

Fuente: Elaboración propia

c. Multiplicación

Tabla 3 :Tratamientos aplicados en la fase de multiplicación de *Theobroma cacao* L. “cacao criollo” (CSC 17).

TRATAMIENTO	DESCRIPCIÓN	REPETICIONES
I	MS + 0 .5mg/L de BAP+0.5mg/L KIN	10
II	MS+ 1mg/L de BAP	10
II	MS +1 mg/L de KIN	10
IV	MS 3 mg/L de BAP	10
V	MS + 3 mg/L de KIN	10

Fuente: Elaboración propia

d. Enraizamiento

Tabla 4: Tratamientos aplicados en la fase de enraizamiento de *Theobroma cacao* L. “cacao criollo” (CSC 17).

TRATAMIENTO	DESCRIPCIÓN	REPETICIONES
I	MS+ 1 mg/L de AIB	10
II	MS+ 1 mg/L de ANA	10
III	MS+ 3 mg/L de AIB	10
IV	MS+ 3 mg/L de ANA	10
V	MS+ 5mg/L de AIB	10
VI	MS+ 5 mg/L de ANA	10

Fuente: Elaboración propia

e. Aclimatación

Tabla 5: Tratamientos aplicados en la fase de aclimatación de *Theobroma cacao* L. “cacao criollo” (CSC 17).

TRATAMIENTO	DESCRIPCIÓN	REPETICIONES
I	Humus 50% + arena 50%	3
II	Turba 60% + arena 40%	3
III	Humus 100%	3

Fuente: Elaboración propia

3.5. DISEÑO EXPERIMENTAL

Se realizó un diseño completamente al azar (DCA), para las fases de micropropagación.

a. Método Aditivo Lineal del Diseño completamente al azar

$$Y_{ij} = \mu + t_i + E_{ij}$$

- Fase de crecimiento

Fuentes de Variabilidad (F.V)	Grados de Libertad (G.L)
Tratamiento	2
Error experimental	27
Total	29

Fuente: Elaboración propia

- Fase de multiplicación

Fuentes de Variabilidad (F.V)	Grados de Libertad (G.L)
Tratamiento	4
Error experimental	45
Total	49

Fuente: Elaboración propia

- Fase de aclimatación

Fuentes de Variabilidad (F.V)	Grados de Libertad (G.L)
Tratamiento	2
Error experimental	6
Total	8

Fuente: Elaboración propia

3.5.1. PRUEBA ESTADÍSTICA

Se realizó la prueba de “F” mediante Análisis de varianza (ANVA), y la prueba de comparación de medias de Duncan, para determinar la diferencia entre los tratamientos en estudio.

3.5.2. EVALUACIONES REALIZADAS:

a. Fase de Desinfección

Se observó si el explante está o no contaminado por algún agente patógeno (hongos o bacterias), tomándose en cuenta para esto la turbidez del medio y/o la presencia de estructuras macroscópicas que evidencien la presencia del microorganismo contaminante. Esta evaluación se realizó después de 15 días de sembrado el explante.

b. Fase de Crecimiento

La evaluación consistió en la medición de la longitud del explante semanalmente.

c. Fase de Multiplicación

Consistió en evaluar:

- Longitud promedio por explante, semanalmente
- El número de brotes por explante, semanalmente

d. Fase de Enraizamiento

Se determinó:

- El porcentaje de plántulas enraizadas.
- Número de raíces por explante.
- El número promedio de raíces por explantes

- La longitud promedio de las raíces de cada explante.
- e. Fase de Aclimatación:
- Se evaluó:
- Porcentaje de plántulas sobrevivientes por sustrato, después de un mes.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. FASE DE DESINFECCIÓN

En la Tabla 11 (Anexo 1) y el gráfico 1 se muestra los resultados de los tratamientos realizados en la fase de desinfección de explantes de *Theobroma cacao* L. “cacao criollo”, probándose que el tratamiento IV, presenta el 90 por ciento de explantes no contaminados y el 10 por ciento de explantes contaminados, por lo cual llegamos a la conclusión que el tratamiento antes mencionado presenta el menor porcentaje de muestras contaminadas y por ende el tratamiento más óptimo en desinfección de explantes; seguido del tratamiento III que presenta el 60 por ciento de explantes no contaminados y el 40 por ciento de explantes contaminados, el tratamiento II que presenta el 10 por ciento de explantes no contaminados y un 90 por ciento contaminados y el tratamiento I que presenta un 100 por ciento de explantes contaminados, considerándose el tratamiento I y II como tratamientos no adecuados para la fase de desinfección de explantes.

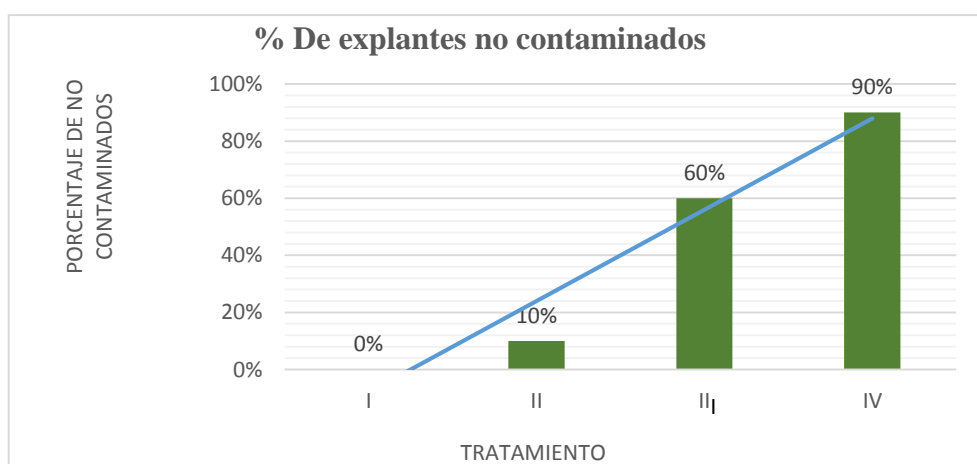


Gráfico 1: Porcentaje de Explantes de *Theobroma cacao* L. no contaminados por tratamiento.

El proceso de desinfección de los explantes con el tratamiento IV de *Theobroma cacao* L. “cacao criollo” inició mediante la inmersión de los explantes en una solución de jabón comercial, se enjuagó tres veces continuas, seguido de la inmersión en alcohol al 70 por ciento por 30 segundos y luego en hipoclorito de calcio al 3 por ciento con 3 gotas de tween 80 por 20 minutos, lográndose mediante este procedimiento un 90 por ciento de desinfección.

Roca y Mroginski (1991), afirman que los explantes requieren desinfectarlo superficialmente, para tal efecto se utilizan diferentes compuestos, siendo los más comunes el hipoclorito de sodio y de calcio, alcohol, nitrato de plata, peróxido de hidrógeno y otros. La selección, concentración y tiempo de los desinfectantes se determina por las características del explantes.

Campos (2018), determinó en su investigación “Reguladores de Crecimiento y Medios de Cultivo en la Micropropagación de *Cinchona Pubescens* Vahl”, que en su fase de desinfección de sus explantes el tratamiento adecuado es con 3% de hipoclorito de calcio con un tiempo de 20 minutos ,para obtener explantes desinfectados en un porcentaje de 95.83 por ciento.

Los resultados obtenidos se asemejan con Vargas (2005), en su investigación de Desinfección de Yemas para la Micropropagación de Sangre Grado donde concluye que,al desinfectar los explantes con 3.5 por ciento de hipoclorito de calcio y partir de de un tiempo 5 a 20´ todos los explantes quedan desinfectados al 100 por ciento.

Hurtado y Merino (1994), sugieren sumergir el material vegetativo en alcohol al 70 % durante 30 seg, con lo cual se eliminan las grasas, permitiendo así una mejor penetración del agente desinfectante en el material. Así mismo recomiendan emplear unas gotas de tween (Vargas, 2005).

Universidad de San Carlos de Guatemala Facultad de Agronomía,” se investigó la respuesta de cinco clones de cacao (*Theobroma cacao* L.) al cultivo de tejidos in vitro, a partir de un explante de yema axilar, meristemo apical, hoja, en un medio de cultivo (Murashige y Skoog), con el propósito de generar conocimiento y tecnología que puedan contribuir a la propagación y conservación de dichas plantas.

Se trabajó el cultivo de cacao por medio de la técnica de cultivo in vitro, pero existieron limitantes como el tiempo de traslado del material vegetal de la finca Bulbuxyá hacia el laboratorio de cultivo de tejidos en la Facultad de Agronomía de la ciudad de Guatemala para el desarrollo de las estructuras utilizadas conocidas como explantes, debido al alto porcentaje de oxidación que presenta la estructura. Para obtener resultados satisfactorios en la etapa de inducción de brotes se recomienda reducir el tiempo de corte de las varetas porta yemas y el tiempo de siembra de lo explantes a utilizar. (Medrano, 2010)

4.2. FASE DE CRECIMIENTO

Según el análisis de varianza en la Tabla 12 (Anexo 1) se puede visualizar que en su fuente de variación tratamiento existe diferencia estadística significativa, así mismo presenta un coeficiente de variabilidad de 4.3 por ciento.

En la tabla 6 se puede observar la prueba de comparación de medias de Duncan, donde se puede verificar que el tratamiento I (medio de cultivo Murashigue & Koog (1962)) es estadísticamente superior a los otros dos tratamientos, en relación a la altura promedio del explante sin la aplicación de hormonas, con 31.9 mm, seguido del tratamiento II (Campbell y Durzan(1975)), con una altura promedio de 30.3 mm y finalmente el tratamiento I (Fossard et al (1974)M), en el cual se obtuvo la altura promedio de 28.1 mm, siendo estos diferentes estadísticamente.

Tabla 6: Prueba de comparación de medias de Duncan para la variable altura del explante de *Theobroma cacao* L. en la fase de crecimiento.

Tratamiento	Media	Significancia
Murashigue & Koog (1962)	31.9	a
Campbell y Durzan(1975) De	30.3	b
Fossard et al (1974) M	28.1	c

Fuente: Elaboración propia

* Medias seguidas con letras iguales no son diferentes estadísticamente según la prueba de Duncan al 0.05 de probabilidad

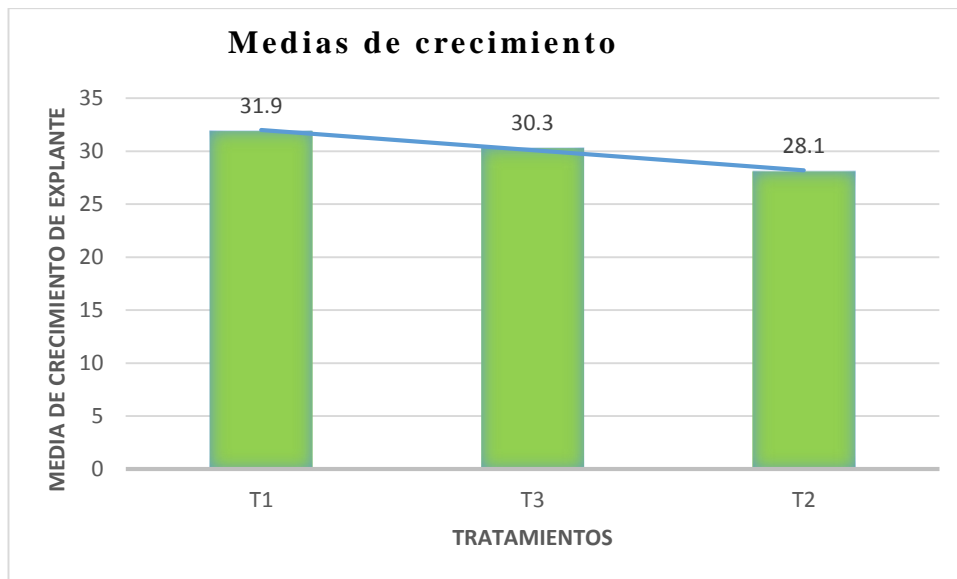


Gráfico 2: Medias del crecimiento de explantes de *Theobroma cacao* L. en los respectivos tratamientos con una evaluación de 60 días.

Estos resultados estarían indicando que el medio de cultivo de Murashigue & koog (1962) tiene una proporción adecuada tanto de macronutrientes y micronutrientes, vitaminas y aminoácidos para la micropropagación in vitro de yemas de *Theobroma Cacao* L..

Mejía (1994) en su investigación Propagación comercial :312 especies de plantas por cultivo in vitro , da a conocer el establecimiento del medio de Murashigue & koog (1962) en cultivo in vitro de *Theobroma Cacao* L. .Así mismo Passey y Jone(1983), en su investigación Proliferación de brotes y enraizamiento in vitro de *Theobroma cacao* L. tipo Amelonado , indica que en su investigación incluyeron una variedad de medios de cultivo que incluían algunos formulados de acuerdo con la composición de la savia de *T. cacao* xylem, que se encontró que era rica en P y Mg y también en las citoquininas zeatina (Z). Sin embargo, ninguno de estos medios demostró ser superior al medio de Murashige y Skoog (1962).

Hurtado y Merino (1994), menciona que Murashige y Skoog (1962) ha demostrado que es el medio adecuado para una gran variedad de especies, así como para diferentes partes de una planta; esta formula contiene macronutrientes, micronutrientes, vitaminas, aminoácidos, carbohidratos y reguladores, esenciales para el crecimiento del tejido vegetal.

Roca y Mroginski (1991), señalan que, para la micropropagación de especies leñosas, se debe utilizar medios de cultivo con un contenido mediano o alto de macronutrientes. Esto se ha podido corroborar, ya que los otros medios de cultivo tienen menor concentración de macronutrientes como es el caso de los medios de cultivo de De Fossard (1974) M, y de Campbell y Durzan (1975).

4.3. FASE DE MULTIPLICACIÓN

4.3.1. Número de brotes de *Theobroma cacao* L.

Según el análisis de varianza tabla 13 (Anexo 1) podemos observar en su fuente de variación tratamiento existe diferencia estadística significativa, así mismo presenta un coeficiente de variabilidad de 12.63 por ciento.

En el tabla 7 se puede observar la prueba de comparación de medias de Duncan, donde se puede ver que el tratamiento IV (3 ml/L de BAP) tiene el más alto número de brotes con 2.9, seguido del tratamiento II (1ml/L de BAP) con una número de brotes de 2.2 ,tratamiento I (0 .5mg/L de BAP+0.5 KIN) con números de brotes de 1.6, tratamiento III (1 ml/L de KIN) con números de brotes de 1.2 y el tratamiento V(3 ml/L de KIN)con un números de brote de 1 .Siendo el tratamiento IV con 3ml/L de BAP diferente y superior en el número de brotes .Estadísticamente los tratamientos V y III no tienen diferencias, por motivo de tener significancias de medias iguales .

Tabla 7: Prueba de comparación de medias de Duncan para la variable número de brotes de *Theobroma cacao* L.

Tratamiento	Tratamiento	Media
I	MS+ 0.5mg/L de BAP+0.5mg/L KIN	1.6 c
II	MS+ 1mg/L de BAP	2.2 b
III	MS+1 mg/L de KIN	1.2 d
IV	MS 3 mg/L de BAP	2.9 a
V	MS + 3 mg/L de KIN	1 d

Fuente: Elaboración propia

*Medias seguidas con letras iguales no son diferentes estadísticamente según

la prueba de Duncan al 0.05 de probabilidad

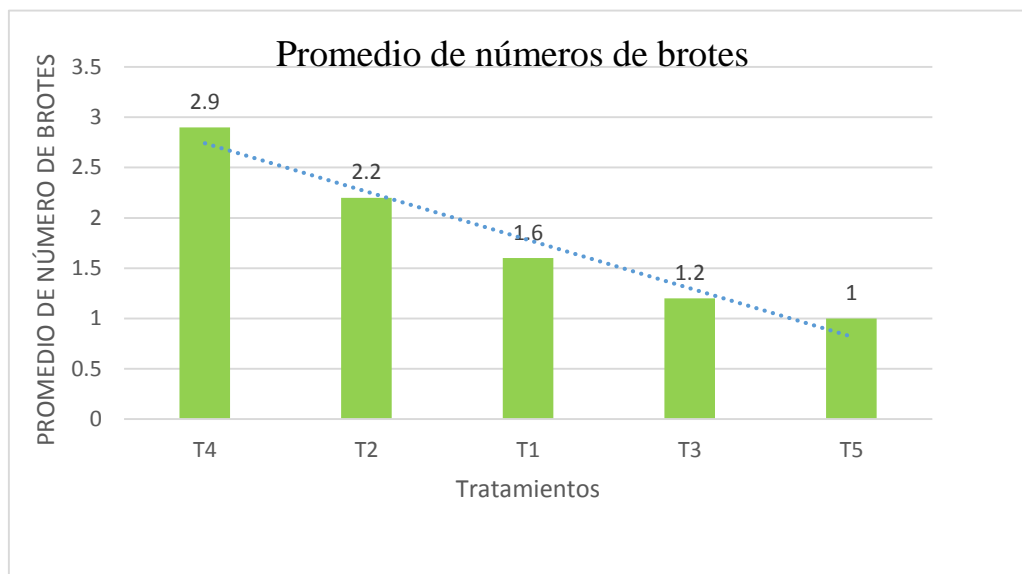


Gráfico 3: Promedio números de brotes por explante de *Theobroma cacao* L. a los 28 días.

Mejía(1994), en su investigación Propagación comercial :312 especies de plantas por cultivo in vitro , da a conocer el establecimiento del medio de Murashigue &S Koog (1962) en cultivo in vitro de *Theobroma Cacao* L. con 2.5 mg/L de BAP para su fase de establecimiento y multiplicación , obteniendo resultados positivos.

Passey y Jone (1983), en su investigación Proliferación de brotes y enraizamiento in vitro de *Theobroma cacao* L. tipo Amelonado, afirma que el crecimiento y la proliferación de brotes in vitro fueron mayores en estos experimentos de lo que se ha logrado hasta ahora con brotes de *T. cacao*. La mejora en el crecimiento parece deberse al uso de BAP, Zeanita o ZR en lugar de kinetina, pero el uso de explantes de plantas en crecimiento activo también podría haber sido un factor contribuyente, se obtuvieron de 2 a 6 brotes axilares por explante.

Luque (2007) en su investigación Micropropagación *IN VITRO* del Olivo variedad sevillana llegó a determinar que la mejor concentración de BAP para la micropropagación in vitro de la variedad sevillana es de: 2 mg/L que forma parte del medio Woody Plant Medium (WPM), obteniendo como números de brotes promedios de 2.3. Eso se asemeja con los resultados obtenidos por Tacaronte, Mora, y Valecillos (2004), desarrollaron la propagación en masa por cultivo In Vitro de la Caoba, para ello cultivaron segmentos nodales con un solo nudo en medio MS a la mitad de su fuerza iónica, complementado con diferentes relaciones de ANA y BAP, en un rango de 0-3 mg/ L para ambas hormonas. Las condiciones de cultivo fueron 25 °C, 16 h de, la superficie de respuesta resultante muestra un óptimo de alargamiento de yemas laterales.

Solis, Cachique y Ruiz (2010), en su investigación Efecto del BAP y el ANA en la multiplicación in vitro de cedro, su objetivo fue evaluar el efecto del BAP y ANA en la multiplicación in vitro de *Cedrela odorata* L. a partir de segmentos nodales obtenidas de plántulas germinadas in vitro. Los explantes fueron cultivados en medio de cultivo MS suplementado con diferentes concentraciones de BAP (0; 0,5; 1 y 2 mg/L) y ANA (0,1 y 0,5 mg/L), las variables evaluadas fueron: altura de plántulas, número de segmentos nodales, número de brotes y porcentaje de enraizamiento. El medio de cultivo MS suplementado con 1 mg/L de BAP y 0,1 de mg/L ANA resultó ser el más adecuado con un coeficiente de multiplicación de 3,50 y 41,67 % de enraizamiento.

4.3.2. Longitud de brotes de *Theobroma cacao* L.

Según el análisis de varianza tabla 14 (Anexo 1) podemos observar en su fuente de variación tratamiento existe diferencia estadística significativa, así mismo presenta un coeficiente de variabilidad al 8.65 por ciento.

En la Tabla 8 se puede observar la prueba de comparación de medias de Duncan, donde se puede ver que el tratamiento IV (3 ml/Lt de BAP) tiene una media de 36.9 en longitud de brotes, estadísticamente es diferente a los demás, considerado como superior. Seguido del tratamiento II (1ml/L de BAP) con una media de longitud de brotes de 34.1, tratamiento I (0.5mg/L de BAP+0.5 KIN) y tratamiento III (1 ml/L de KIN) con medias de 29.7 y 30.5, considerándose estadísticamente iguales. El tratamiento V (3 ml/L de KIN) con su media de 27.1 considerado no eficiente.

Tabla 8: Prueba de comparación de medias de Duncan para la variable Longitud promedio (mm) de brotes de *Theobroma cacao* L.

Tratamiento	Descripción	Media
IV	(MS + 3 ml/L de BAP)	36.9 a
II	(MS+1ml/L de BAP)	34.1 b
III	(MS+1 ml/L de KIN)	30.5 c
I	(MS+0.5mg/L de BAP+0.5 KIN)	29.7 c
V	(MS+3 ml/L de KIN)	27.1 d

Fuente: Elaboración propia

* Medias seguidas con letras iguales no son diferentes estadísticamente según la prueba de Duncan al 0.05 de probabilidad.

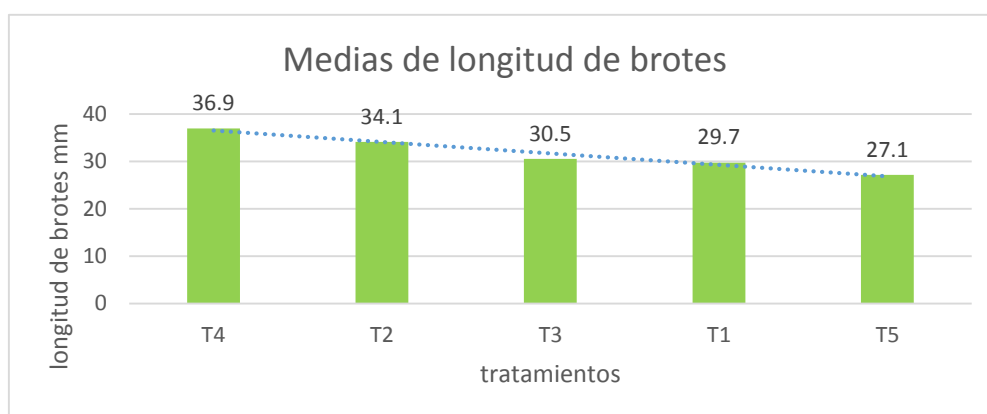


Gráfico 4:: Medias de longitud de brotes por explante de *Theobroma cacao* L. a los 28 días.

Estos resultados concuerdan con Passey y Jone (1983) en su investigación Proliferación de brotes y enraizamiento in vitro de *Theobroma cacao* L. tipo Amelonado, afirma que el crecimiento y la proliferación de brotes in vitro se debió al uso de BAP obteniendo de 2 a 6 brotes axilares por explante, con una longitud promedio 2.3 cm, evaluadas durante un tiempo de 30 días.

4.4. FASE DE ENRAIZAMIENTO

En el tabla 9 se puede notar que de los seis tratamientos realizados, dos han dado resultados, tratamiento II (ANA 1mg/L) tiene un promedio de 1.75 número de raíces y con una longitud de 19.87mm, el tratamiento IV (3mg/L) con un promedio de 2.16 números de raíces y con longitud promedio de 20.83 mm.

Tabla 9: Explantes de *Theobroma cacao* L. “cacao criollo enraizados por tratamiento

Tratamientos	Descripción	N° de raíces	Longitud (mm)
I	AIB 1 mg/l	0	0
II	ANA 1mg/l	1.75	19.87
III	ANA 3 mg/l	0	0
IV	AIB 3 mg/l	2.16	20.83
V	AIB 5mg/l	0	0
VI	ANA 5mg/l	0	0

Fuente: Elaboración propia

Los resultados obtenidos concuerdan con Flynn y Glicenstein (1990) , en su investigación *Theobroma cacao* L. : un procedimiento de propagación in vitro de brotes axilares, afirma que para la fase de enraizamiento aplicó el Medio WPM con suplementos orgánicos como 10.0 g/L sacarosa, 0.15 g /L carbón activado y AIB a 3.0 mg /L, obteniendo raíces de 2-3 mm de diámetro, blancas y variaban en número, produciéndose 1-4 por brote , la raíces se visualizaron a los 12-14 días al 90%.

Mejía(1994) , en su investigación Propagación comercial :312 especies de plantas por cultivo in vitrio , da a conser el establecimiento WPM del medio de cultivo in vitrio de *Theobroma Cacao* L. con 2.5 mg/L de BAP para su fase de

establecimiento y multiplicación , y 3gm/L de AIB para su fase de enraizamiento.Dando a conocer como su protocolo 2 de su investigación.

Beaulieu(1973) , afirma que ,el AIB (ácido Indolbutírico), en su forma sintética es considerado como uno de los mejores productos para aumentar el enraizamiento en un gran número de especies; su actividad auxínica es débil y los sistemas de enzimas destructoras de auxinas lo destruyen relativamente lento, resulta muy eficaz como estimulante de las raíces, debido a que se desplaza muy poco y se retiene cerca del sitio de aplicación; su molécula es más estable y menos soluble, pasa menos rápido en los tejidos de la planta y permanece más tiempo en el punto de aplicación, produce un sistema de raíces más fuertes y fibrosas.

Beaulieu(1973), manifiesta que el ANA (ácido naftalenacético) es de un empleo más delicado, porque el margen entre el umbral de su actividad y el umbral de su toxicidad es muy pequeño; es mucho más activo pero mucho más frtotóxico; ocasiona usualmente el desarrollo de raíces cortas y gruesas. Deben evitarse las concentraciones excesivas con ANA .por el peligro de provocar daños en las plantas; al usarlo en concentraciones muy altas tienden a producir raíces gruesas y atrofiadas.

Delgado y Rojas (1999), mencionan que la utilización de auxinas utilizadas en cultivo de tejidos es variable. Por lo general el ANA es utilizado entre 1 - 10 mg/L. Con un óptimo de 2 mg/L.

4.5. FASE DE ACLIMATACIÓN

4.5.1. Porcentaje (%) de supervivencia

Según el análisis de varianza tabla 16 (Anexo 1) podemos observar en su fuente de variación tratamiento que existe diferencia estadística significativa entre los tratamientos I (Turba 60+ arena 40%) con una media de aclimatación de 83.33 y tratamiento III (Humus 100%)con una media de 33.33 ,el tratamiento II (Humus50% + arena 50%) con media de 31.11 , estadísticamente es igual que el tratmiento I..Así mismo presenta un coeficiente de variabilidad al 18.2 por ciento.

Tabla 10: Prueba de comparación de medias de Duncan para la variable porcentaje de plántulas de *Theobroma cacao* L. “cacao criollo” sobrevivientes por sustrato

Tratamiento	Media	Significancia
I (Turba 60% + arena 40%)	83.33	a
II (Humus50% + arena 50%)	61.11	a b
III (Humus 100%)	33.33	b

Fuente: Elaboración propia

* Medias seguidas con letras iguales no son diferentes estadísticamente según la prueba de Duncan al 0.05 de probabilidad

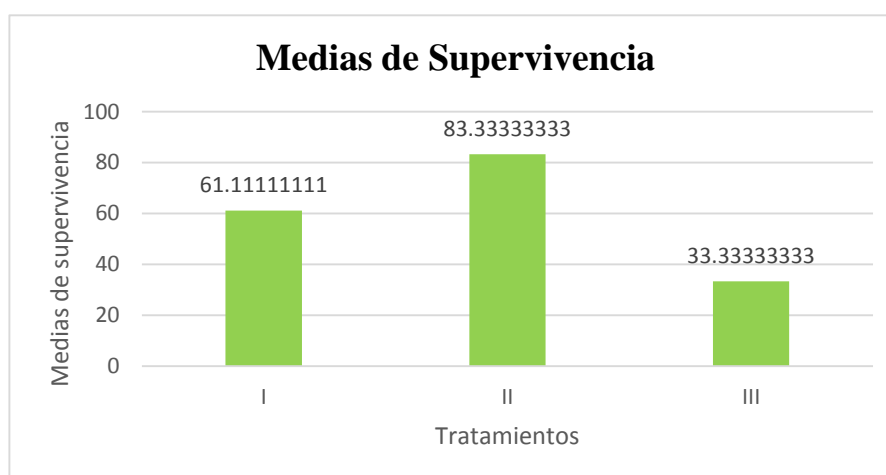


Gráfico 5: medias de supervivencia en la fase de aclimatación de los explantes de *Theobroma cacao* L.

Flynn y Glicenstein (1990), en su investigación *Theobroma cacao* L.: un procedimiento de propagación in vitro de brotes axilares, afirma que en su fase de aclimatación las plántulas enraizadas se transfirieron asépticamente a recipientes de que contenían 100 ml de vemiculita con 30,0 ml de fertilizante soluble con (pH 6,1). Después de los siete días las plántulas se transfirieron a cajas de plástico compuesta por 3 partes de musgo de turba, 2 partes de vermiculita y 1 parte de tierra.

Las investigaciones realizadas en *Theobroma cacao* L. no son muchas, siendo así que muchas de ellas sólo llegan a la fase de enraizamiento sin generar la aclimatación de este cultivo. Para la aclimatación de plantas in vitro de *Theobroma cacao* L. “cacao criollo” las plantas enraizadas *in vitro* deberán tener una buena proporción de primordios y raíces que los haga capaces de sobrevivir. Según a los resultados obtenidos discrepo con Mejía(1994), en su investigación Propagación comercial :312 especies de plantas por cultivo in vitro , da a conocer que en su fase de aclimatación de *Theobroma Cacao* L. sólo utilizó suelo sin ningún sustrato.

V. CONCLUSIONES

Bajo las condiciones en que se efectuó el presente trabajo de investigación, de acuerdo a los resultados obtenidos se puede llegar a las siguientes conclusiones:

- El mejor medio de cultivo identificado en este trabajo de investigación para la micropropagación de *Theobroma cacao* L. “cacao criollo” corresponde al medio Murashigue y Skoog (1962).
- Las concentración de hormonas más apropiadas para la fase de multiplicación, en las variables de número y longitud de brotes corresponden a 3 mg/L BAP (Bencilamino Purina) ,así como para la fase de enraizamiento las hormonas más adecuadas corresponden a las concentración de 3 mg/L AIB (ácido Indol butírico) .
- Para la Micropropagación optima de *Theobroma cacao* L. “cacao criollo”, se debe seguir el siguiente protocolo; en la fase de desinfección utilizar el hipoclorito de calcio (3 por ciento) con 3 gotas de Tween80 , por 20 minutos. Utilizar como medio de cultivo a Murashigue y Skoog (1962). En la fase de multiplicación utiliza hormona pura (solo citoquinina) en concentración de 3mg/L BAP V (Bencilamino Purina), en la fase de enraizamiento utilizar hormona pura (solo auxina), en concentración de 3 mg/L AIB (ácido Indol butírico) y en la fase de aclimatación se recomienda utilizar como sustrato al medio de Turba (60%) más arena (40%).

VI. RECOMENDACIONES

- Se recomienda que los explantes obtenidos de la planta madre tenga un estado fitosanitario bueno, para evitar contaminación de agentes patógenos en los cultivos.
- Realizar pruebas con diferentes concentraciones de auxinas en la fase de enraizamiento de los explantes de *Theobroma cacao* L. “cacao criollo”, para la obtención de mayores números de raíces, ya que en el trabajo presentado el enraizamiento obtenido es mínimo.
- Se recomienda continuar con investigaciones en la fase de multiplicación, para lograr un mayor número de brotes por explante de *Theobroma cacao* L. “cacao criollo”.
- Realizar el enraizamiento en un invernadero, es decir sin la aplicación de hormonas, para determinar el comportamiento de la especie y observar si la especie se adapta con mayor facilidad.
- Realizar estudios de la composición de los sustratos utilizados en la fase de aclimatación.
- Proponer el desarrollo de jardines miniclones a partir de vitroplantas provenientes de árboles con características ya seleccionadas, para su posterior introducción in vitro.
- Continuar con los estudios de la micropropagación In Vitro de tejidos de esta especie, utilizando diferentes tipos de explantes, medios de cultivos y reguladores de crecimiento.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aliaga, R. G. (2014). *Paquete Tecnológico del Cultivo del Cacao Fino de Aroma*. UNODOC, Lima.p9.
- Ártica, M. (2008). *Cultivo de Cacao*. Lima: MACRO PERU.
- Beaulieu, R. (1973). *Reguladores de crecimiento*. Barcelona -España: Ed. Oikos-Tau S.A.
- Briceño, P., Isabel, P., Vásquez, P., Juan, P., & Chia Wong, J. A. (2010). *Resultados preliminares del control de la contaminación*. Tingo María: Universidad Nacional Agraria de la Selva.
- Campos, O. (2018). *Reguladores de crecimiento y medios de cultivo en la micropropagación de Cinchona pubescens vahl "cascarilla"*. Jaén: universidad nacional de Jaén.
- Castillo, A. (2004). *Propagación de platas por cultivo in vitro: Una biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo*. Unidad de Biotecnol/INIA Las brujas. Recuperado de: http://www.inia.org.uy/publicaciones/documentos/lb/ad/2004/ad_382.pdf
- Centro de Comercio Internacional (CCI). (2001). *Cacao: Guía de prácticas comerciales*. Ginebra: Centro de Comercio Internacional UNCTAD/OMC.
- Conabio,(2004).*Theobroma Cacao* .(1753).Species Plantarum .2:782p.
- Delgado, G., Rojas. 1999. *Cultivos de vegetales 1: Aplicaciones y procedimientos*, Universidad Pedro Ruiz Gallo. Lambayeque, Perú.184p.
- Dubos, R. (2006). *Establecimiento in vitro de diferentes especies y genotipos del género*. Chile: Universidad Austral de Chile.100p.
- Flynn, W., & Glicenstein , L. (1990). *Theobroma cacao L: un procedimiento de propagación in vitro de brotes axilares*. Pennsylvania: Kluwer Academic Publishers.

- Gatica, M. (1994). Caracterización agromorfológica de 13 híbridos y 7 clones de cacao (*Theobroma cacao* L.) en el Centro de Agricultura Tropical “Bulbuxya“, San Miguel Panán, Suchitepéquez, Guatemala: USAC.77p.
- George EF, Sherrington PD. 1984. Plant propagation by tissue culture: Handbook and directory of commercial laboratories. Exegetics Ltd. Basingstoke. U. K.
- Hartmann, H. y Kester, D., (1987), *Propagación de plántulas*. Parte II. Compañía Editorial Continental, S.A., México. pp. 75-219.
- Hidalgo, C. (2014). “*Estudio preliminar para la obtención de explantes de cacao (Theobroma cacao L.) a través de embriogénesis somática*”. Daule – Ecuador: Universidad De Guayaquil.
- Hurtado, D; Merino, M. 1994. *Cultivo de tejidos vegetales*. Trillas, MX. 232 p.
- International Cocoa Organization ICCO. (2012). La Economía Cacaotera Mundial: Pasado y Presente. Obtenido de http://www.canacacao.org/uploads/smartsection/19_Economia_cacaotera_mundial_2002_2012.pdf
- Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura, (IICA). (2009). *Situación y perspectivas de la cadena de cacao-chocolate en el Perú*. IICA, LIMA. Recuperado de <http://orton.catie.ac.cr/REPDOC/A6001E/A6001E.PDF>
- ISSG. (2000). Global Invasive Species Database;. Recuperado de <http://www.iucngisd.org/gisd/search.php>
- ITC. (2001). *Cocoa; A Guide to Trade Practices. Product and Market Development*. . GENEVA: International Trade Centre.
- LASS, R. (1985). *Cocoa*. In Wood, GAR; Lass, RA., 4 th edition, 265-365.
- León, J. (2000). *Botánica de los cultivos tropicales*. 3 ed. Editorial Agroamérica del IICA. San José, CR. 522 p.
- López, A. P., Delgado, N. V., & López , A. J. (1992). *Manual de Producción del cacao en Tabasco*. Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas y Pecuarias. México: INIFAP-Huimanguillo.

- Luque, B. (2007). *Respuesta a la micropropagación IN VITRO del Olivo (Olea europaea L.) variedad sevillana haciendo uso del medio Woody Plant Medium (WPM)*. Tacna: Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann-Tacna.
- Margara, J. (1988). *Multiplicación vegetativa y cultivo in vitro*. Los meristemas y la. Mundi Prensa., 232pp.
- Marín Velázquez, J. A. (1997). *La micropropagación y la mejora de especies frutales*. Recuperado de http://digital.csic.es/bitstream/10261/19028/1/Mar%C3%ADnJ_DiscursoAcadC EFQN_1997.pdf
- Medrano, D. R.(2010). *Evaluación de la propagación in vitro en cinco clones promisorios de cacao (Theobroma cacao)*. Universidad De San Carlos De Guatemala.Guatemala.88p.
- Mejía, R., (1994), *Propagación comercial 312 especies de plantas por cultivo in vitro*, Lima, Perú.
- Meyer. (1981). *Propagation of Rhododendron from Flower Buds*. Mexico: HortScience.
- Ministro de Agricultura y Riego,(MINAGRI). (octubre de 2016). *Estudio del Cacao en el Perú y el Mundo*. Lima. MINAGRI-DEEIA. Recuperado de [file:///F:/Downloads/estudio-cacao-peru-julio-2016%20\(1\).pdf](file:///F:/Downloads/estudio-cacao-peru-julio-2016%20(1).pdf)
- Montalvo, B. (2001). *Micropropagación Vegetativa In Vitro de Nageia rospigliosii*.Universidad Nacional de Cajamarca,Perú.
- Morales, O., Borda, A., Argandoña, A., Farach, R., Garcia Naranjo, L., & Lazo, K. (2015). *La Alianza Cacao Perú y la cadena productiva*. Lima: Universidad ESAN.
- Navas, H; Petra, B. 1999. *Propagación "in vitro" del cacao (Theobroma cacao L.)*. Tesis Ing. Agr. Venezuela, Universidad Central de Venezuela, Facultad de Agronomía. 75 p.
- Naupay, A. H. (2015). *Colección de Plantas Madre de Cacao Nativo en Jaén y San Ignacio*. Jaén.42p.

- Passey, A., & Jone, O. (1983). *Shoot proliferation and rooting in vitro of Theobroma cacao* L. type Amelonado. *Journal of Horticultural Science*. doi: 10.1080/00221589.1983.11515161
- PROAMAZONÍA. 2003. *Manual del cultivo del cacao. Programa para el desarrollo de la Amazonía*. Ministerio de Agricultura. Perú. 83p.
- Quintero, M. L. (2004). El mercado mundial del cacao. SCIELO.
- Ramirez, F. D. (2010). *Cultivo y Explotación del Cacao*. Grupo Latino Editores S.A.S., 44p.
- Roca, W; Mroginski, L. 1991. *Cultivo de Tejidos en la Agricultura, fundamentos y aplicaciones*. Cali, CO. 969 p.
- Sánchez, J. (1995). *CULTIVO IN VITRO: Una Visión Rápida*. Revista de Química.
- Solis, R., Cachique, D., & Ruiz, H. (2010). *Efecto del BAP y el ANA en la Multiplicación In Vitro de Cedro*. Tarapoto: Universidad Nacional de San Martín-Tarapoto, Perú.
- Suárez. (2003). *Medios de cultivo Facultad de Biología*. Universidad La Habana. Departamento de Biología Vegetal. Recuperado de [http://Tema % 205 /medios de cultivo](http://Tema%205/mediosdecultivo)
- Tacaronte , E., Mora, V., & Valecillos , C. (2004). *Propagación In Vitro de Caoba (Swietenia macrophylla KJNG)* a partir de yemas axilares. Venezuela.
- Torres Gutiérrez, L. A. (2012). *Manual de producción de cacao fino de aroma a través de manejo*. Monográfico, Universidad de Cuenca Ecuador, p 12. Recuperado de <http://space.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/32501/1/TESES.pdf>
- Toxopeus, H. 1985. Botany, Types and Population. In Wood, GAR; Lass, RA. *Cocoa*. New York. Longman. p 11-37.
- Valenzuela, A. B. (2007). *El Chocolate, un Placer Saludable*. Laboratorio de Lípidos y Antioxidantes, INTA, Universidad de Chile .34p.

- Vargas, Y. (2005). *Desinfección de Yemas para la Micropropagación de Sangre Grado*. Tingo María: Universidad Nacional Agraria de la Selva. Recuperado de file:///F:/Desktop/CEL/micro%20sangre%20grdo.pdf
- Vera. (1987). Botánica y Clasificación del Cacao. In Suarez.
- Villalobos, A., & Thorpe, T. (2010). *Micropropagación: conceptos, metodología y resultados*. MEXICO: CONACYT.
- Vinelli, M. (2015). Perú, el segundo exportador de cacao del planeta. Obtenido de <http://larepublica.pe/impresaeconomia/5641-peru-el-segundo-exportador-de-cacao-del-planeta>
- Wood, G., & Lass, R. (1985). *Cocoa*. New York: Longman Group Limited Compañía Editorial Intercontinental SAC, 207p

VIII. ANEXOS

Anexo 1 : Pruebas estadísticas

Tabla 11: Resultados de los tratamientos realizados en la desinfección de *Theobroma cacao* L.

N° Tratamiento	Duración de exposición (min)	Desinfección		
		N° Explantes tratados	% Explantes contaminados	% Explantes no contaminados
I	5	10	100	0
II	10	10	90	10
III	15	10	40	60
IV	20	10	10	90

Fuente: Elaboración propia

Tabla 12: Registro obtenidos en la evaluación de la fase de crecimiento de explantes de *Theobroma cacao* L. a los 60 días – mm

Tratamientos	Repeticiones									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
I	31	33	32	33	30	34	33	32	32	29
II	28	26	29	30	28	28	27	27	27	31
II	30	31	31	30	30	30	30	31	31	29

Fuente: elaboración propia

Tabla 13: Análisis de varianza (ANVA) para la variable altura promedio de explante de *Theobroma cacao* L. en la fase de crecimiento 60 días

F. V	G. L	S.C	C.M	F.C	F. T	Sig.
Tratamientos	2	72.8	36.4	21.4117647	3.35	*
Error experimental	27	45.9	1.7			
Total	29	118.7				
		C.V	4.33			

Fuente: Elaboración propia

Tabla 14: Registro obtenidos en la evaluación de la fase de multiplicación de explantes de *Theobroma cacao* L., en la cuarta semana – número de brotes

Tratamientos	Repeticiones									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
I	2	1	2	2	2	2	1	1	1	2
II	2	2	3	3	2	2	2	2	3	1
II	2	1	1	1	1	1	1	2	1	1
IV	3	3	3	3	3	2	3	3	3	3
V	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

Fuente: Elaboración propia

Tabla 15: Análisis de varianza (ANVA) para la variable número de brote promedio por explante de *Theobroma cacao* L. en la fase de multiplicación.

F.V	G.L	S.C	C.M	F.C	F.T	Sig.
Tratamientos	4	3.28	0.82	30.4958678	2.58	*
Error experimental	45	1.21	0.02688889			
Total	49	4.49				
C.V			12.63			

Fuente: Elaboración propia

*ANVA obtenido en base a datos con transformación de raíz cuadrada.

Tabla 16: Registro obtenidos en la evaluación de la fase de multiplicación de explantes de *Theobroma cacao* L., en la cuarta semana – longitud de brotes:

Tratamientos	Repeticiones									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
I	30	25	30	32	31	30	24	28	32	35
II	30	32	33	35	36	35	36	34	36	34
II	32	30	30	30	28	28	30	32	32	33
IV	40	42	38	36	36	35	36	38	34	34
V	24	24	24	26	29	24	26	34	28	32

Fuente: Elaboración propia

Tabla 17: Análisis de varianza (ANVA) para la variable longitud promedio por explante de *Theobroma cacao* L. en la fase de multiplicación

F.V	G.L	S.C	C.M	F.C	F.T	Sig.
Tratamientos	4	593.92	148.48	19.809072	2.58	*
Error experimental	45	337.3	7.49555556			
Total	49	931.22				
		C.V	8.65			

Fuente: Elaboración propia

Tabla 18: Registro obtenidos en la evaluación de la fase de Enraizamiento de Explantes de *Theobroma cacao* L. - número de raíces

Tratamientos	Repeticiones									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
I	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
II	1	2	2	2	2	2	2	2	2	1
III	0	0		0	0	0	0	0	0	0
IV	3	2	3	2	2	2	2	2	2	2
V	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
VI	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Fuente: Elaboración propia

Tabla 19: Evaluación realizada en la cuarta semana – longitud de raíces.

Tratamientos	Repeticiones									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
I	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
II	18.4	19.8	21	21	19.5	21	20	19	18	21
III	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0
IV	19	21	26	28	26	21	20	21	24	2
V	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
VI	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Fuente: Elaboración propia

Tabla 20: Registro obtenidos en la evaluación de la fase de aclimatación de plántulas de *Theobroma cacao* L. sobrevivientes (%) por sustrato

Tratamientos	Repeticiones		
	1	2	3
I	50	50	83.33
II	83.33	83.33	83.33
III	16.67	33.33	50

Fuente: Elaboración propia

Tabla 21: Análisis de varianza (ANVA) para la variable porcentaje de plántulas de *Theobroma cacao* L. “cacao criollo” sobrevivientes (%) por sustrato en la fase de aclimatación

F.V	G.L	S.C	C.M	F.C	F.T	Sig.
Tratamientos	2	1457.83	728.915	8.57194097	5.14	*
Error experimental	6	510.21	85.035			
Total	8	1968.04				
		C.V	18.12			

Fuente: Elaboración propia

*ANVA obtenido en base a datos con transformación angular.

Anexo 2: Composición de los medios de cultivo

COMPONENTES (mg/L)	MURASHIGE Y SKOOG (1962)	CAMPBELL Y DURZAN (1975)	De FOSSARD et al (1974)M
Macronutrientes			
KNO ₃ (Nitrato de potasio)	1900	340	1011
NH ₄ NO ₃ (Nitrato de amonio)	1650	800	800.5
Ca(NO ₃) ₂ 4H ₂ O (Nitrato de calcio tetrahidratado)		980	
CaCl ₂ 2H ₂ O (Cloruro de calcio dihidratado)	440		294.1
MgSO ₄ 7H ₂ O (Sulfato de magnesio heptahidratado)	370	370	369.8
KCl (Cloruro de potasio)		65	
KH ₂ PO ₄ (Fosfato de potasio monobásico)	170	170	
NH ₄ H ₂ PO ₄ (Fosfato de amonio monobásico)			
NaH ₂ PO ₄ H ₂ O (Fosfato de sodio hidratado)			
Na ₂ SO ₄ (Sulfato de sodio)			138
(NH ₄) ₂ SO ₄ (Sulfato de amonio)			63.9
Micronutrientes			
MnSO ₄ 4H ₂ O (sulfato de manganeso (II) tetrahidratado)	22.3	22.3	11.153
ZnSO ₄ 7H ₂ O (sulfato de zinc tetrahidratado)	8.6	8.6	5.751
H ₃ BO ₃ (Ácido Bórico)	6.2	6.2	3.092
K I (Yoduro de potasio)	0.83	0.83	0.415
CuSO ₄ 5H ₂ O (Sulfato de cobre II pentahidratado)	0.025	0.025	0.0249
Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O (Molibdato de sodio dihidratado)	0.25		0.0242
CoCl ₂ 6H ₂ O (Cobalto de	0.025	0.025	0.119

cloruro hexahidratado)			
FeSO ₄ 7H ₂ O (Sulfato de hierro II heptahidratao)	27.85	27.85	13.902
Na ₂ EDTA 2H ₂ O	37.25	37.25	18.613
Vitaminas			
Inositol	100	100	54
Tiamina - HCl	0.1	0.4	0.675
Ácido nicotínico	0.5		2.462
Piridoxina – HCl	0.5		0.617
Ác. Pantoténico			0.4765
Biotina			0.0489
Choline chloride			0.1396
Riboflavina			0.376
Ácido ascórbido			0.176
Ácido fólico			0.441
Glicina			0.375
Cysteina			9.5
Otros			
Agar (g/l)	7	7	7
Sacarosa (g/l)	30	30	30
PH	5.7	5.7	5.7

Fuente: Elaboración propia

Anexo 3: Propuesta de Protocolo para la Micropropagación de la *Theobroma cacao* L.

Nombre científico: *Theobroma cacao* L.

Nombre común: cacao

Establecimiento de los cultivos:

a. Explante utilizado

Se utilizan explantes jóvenes segmentos de tallos de aproximadamente 2 cm de largo.

b. Desinfección del explante:

Los explantes deben ser lavados con agua destilada, someter a una solución de jabón comercial y enjuagar tres veces con agua esterilizada, posteriormente se debe someter a un baño con alcohol etílico al 70 por ciento por 30 segundos, seguidamente se debe enjuagar con agua destilada esterilizada y colocar en una solución de hipoclorito de calcio (Ca (ClO)₂) al 3 por ciento más 3 gotas de tween 80 durante 5, 10, 15 y 20 minutos, donde el tratamiento más adecuado corresponde al tiempo de 20 minutos y finalmente las yemas deben ser enjuagadas repetidas veces en agua destilada estéril en la Cámara de Flujo Laminar.

Condiciones de incubación: temperatura 23 °C ± 2, a una exposición de luz de 16 horas y 8 horas oscuridad.

Componentes	Crecimiento	Multiplicación	Enraizamiento
MS	Completo	Completo	completo
sacarosa	30	30	30
Agar	7	7	7
BAP (mg/L)	3		-
AIB (mg/L)	-	3	-
pH	5.7	5.7	5.7

Fuente: Elaboración propia

Las plantas enraizadas se deben lavar cuidadosamente con la finalidad de eliminar los restos de agar, luego se transfieren al sustrato de turba (60%) y arena (40%) estéril, bajo condiciones ambientales controladas y riego por un mes hasta que la nueva planta se adapte.

Anexo 4: Descripción de la planta madre de *Theobroma cacao* L. “cacao criollo”: comportamiento agronómico del material seleccionado y su potencial productivo.

COLECCIÓN SOL&CAFÉ: CSC 17

VASQUEZ RAMIREZ JULIO, CASERIO DE CANANA; DISTRITO: BELLAVISTA; PROVINCIA: JAEN.



EL FRUTO:

- 1.- Color del fruto inmaduro: Rojo Pigmentado
- 2.- Tamaño del fruto : Mediano
- 3.- Forma del fruto: Oblongo.
- 4.- Forma del apice: Agudo.
- 5.- Rugosidad del fruto: Intermedio.
- 6.- Constricción basal: Ausente.
- 7.- Grosor de la cascara: gruesa.
- 8.- Disposición de un par de lomos: pareados.
- 9.- Profundidad de surcos: Profundo.

DE LA PRODUCTIVIDAD:

- 1.- Tamaño de semilla: Grande.
- 2.- N° semillas por fruto: 44.
- 3.- Peso total de semilla/fruto: 155.7 gr.
- 4.- Peso seco de semilla/fruto: 59.17 gr.
- 5.- Índice de mazorca: 16.9

SEMILLA:

- 1.- Forma en sección longitudinal: ovlonga.
- 2.- Forma en sección transversal: Intermedia.
- 3.- Color de cotiledon: Violeta.

SABORES BASICOS Y ESPECIFICOS DE LA PULPA.

- 1.- Dulzura: Alto
- 2.- Acidez: Medio
- 3.- Amargor: Muy bajo
- 4.- Astringencia: Bajo
- 5.- Floral: Alto
- 6.- Frutal: Medio.

PUNTAJE FINAL: 32

- 1.- Valor: Muy bueno

GEOREFERENCIACION:

COORDENADAS UTM		ALTITUD
Este 750077	Norte 9393510	482 msnm

Ar
Ve

Anexo 5: Panel Fotográfico de la investigación



Figura 1 : Preparación de planta madre de Theobroma cacao L.



Figura 2: Preparación de planta madre de Theobroma cacao L.



Figura 3: Esterilización de materiales



Figura 4: Preparación de medios de cultivo



Figura 5: Preparación de Hipoclorito de calcio (desinfectante)



Figura 6: Preparación de los explantes de *Theobroma cacao* L.



Figura 7: Desinfección de los explantes de *Theobroma cacao* L



Figura 8: Siembra de los explantes *Theobroma cacao* L.



Figura 9: Explantes de *Theobroma cacao* L.

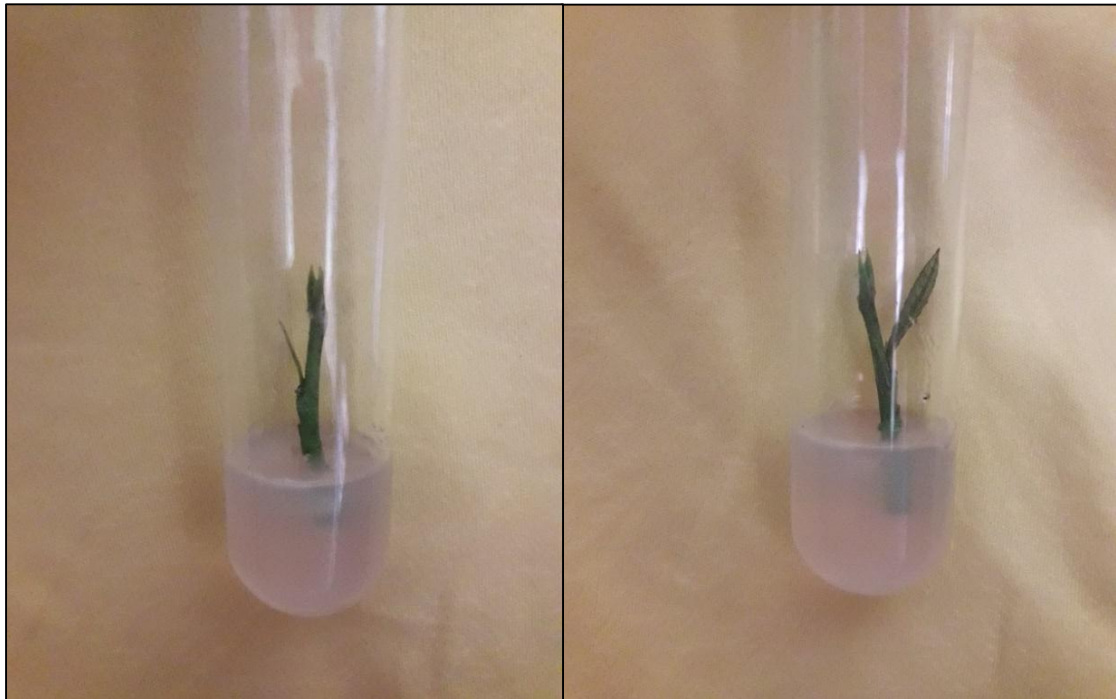


Figura 10: Crecimiento de los explantes de *Theobroma cacao* L.



Figura 11: Fase de multiplicación de Theobroma cacao L.



Figura 12: Fase de multiplicación de Theobroma cacao L.



Figura 13: Enraizamiento de los brotes de Theobroma cacao L.



Figura 14: Aclimatación de las plantas Theobroma cacao L.

Anexo 6 : Certificación de identificación botánica *Theobroma cacao* L.

CERTIFICACIÓN DE IDENTIFICACIÓN BOTÁNICA

ATILIO HUAPAYA NAUPAY INGENIERO AGRÓNOMO C.I.P. 16472

Certifica que, ANALI ROXANA CRUZ ACOSTA , egresada de la carrera profesional de ingeniería Forestal y Ambiental de la Universidad Nacional de Jaén, con fines de investigación científica , ha solicitado la identificación y certificación botánica de una planta recolectada en la parcela del señor Vásquez Ramírez Julio, Caserío de Canana; Distrito de Bellavista; Provincia Jaén y Departamento De Cajamarca ,la muestra con flores y frutos ha sido estudiada e identificada como *Theobroma cacao* L “cacao criollo” (CSC 17) .Y según el Sistema Integrado de Clasificación de las Angiospermas de Arthur Cronquist.(1981), ,ocupa las siguientes categorías taxonómicas:

REINO : Plantae
DIVISIÓN : Magnoliophyta
CLAS : Magnoliopsida
SUBCLASE : Dilleniidae
ORDEN : Malvales
FAMILIA : Malvaceae
GÉNERO : *Theobroma*
ESPECIE : *Theobroma cacao* L

Se expide la presente certificación para los fines que se estime conveniente.
ocupa

Tingo María, 19 de febrero de 2019

Pasaje Las Palmeras Lt. 7 Mz. 132Asociación Los Pinos – Castillo Grande


ATILIO HUAPAYA NAUPAY
INGENIERO AGRÓNOMO
C.I.P. 16472