

UNIVERSIDAD RICARDO PALMA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA



Determinación de las concentraciones de los reguladores de crecimiento en la inducción de callo embriogénico en *Theobroma cacao* L. var. Criollo de la región Piura

Tesis para optar el Título Profesional de Licenciada en Biología

Mary Elena Morán Merino

Lima, Perú
2020

DEDICATORIA

Dedico esta tesis a mis padres,
que con su apoyo ilimitado, amor incondicional,
contantes palabras de aliento y oraciones
motivaron a que cada día
busque cumplir mis objetivos
personales y profesionales.

AGRADECIMIENTOS

A mi madre, mi padre y mi hermano por su apoyo incondicional y constantes palabras de aliento a lo largo de mi formación académica y en el desarrollo de esta tesis.

Ph D. Mauro Quiñones por su asesoría y por haberme brindado la oportunidad de realizar la presente investigación en el Laboratorio de Biotecnología y Fisiología Vegetal.

Al profesor César Puicón, por su tiempo, apoyo y recomendaciones en el desarrollo de esta investigación.

A los jurados evaluadores, Dra. Haydee Montoya Terreros, Flor de María Madrid y Lidia Cruz por sus observaciones y sugerencias para pulir esta tesis.

A mis amigos de Laboratorio de Biotecnología y Fisiología Vegetal y amigos de universidad por brindarme su amistad incondicional, palabras de aliento e ideas en el desarrollo de esta investigación.

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUCCIÓN	3
2. ANTECEDENTES	5
2.1 Clasificación taxonómica.....	5
2.2 Origen y distribución geográfica	5
2.3 Diversidad Genética	6
2.4 Embriogénesis somática	7
2.5 Callogénesis	8
2.5.2 Callogenesis en <i>Theobroma cacao</i>	9
2.5.3 Fitohormonas en la inducción de callo embriogénico en <i>Theobroma cacao</i>	10
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	12
3.1 Obtención del material biológico.....	12
3.2 Preparación de medios de cultivo para inducción de callo	12
3.3 Germinación de semillas y Desinfección de cotiledones	13
3.4 Desinfección de botones florales	14
3.5 Introducción de explantes de cotiledón en medio de inducción para la callogenesis.....	15
3.6 Introducción de pétalos en medio de inducción para la callogenesis	15
3.7 Proliferación de callo	16
3.8 Evaluación de la viabilidad de las células del callo y presencia de gránulos de almidón.....	17
4. RESULTADOS	18
4.1 Desinfección de cotiledones	18
4.2 Desinfección de Botones Florales	19
4.3 Inducción <i>in vitro</i> de callogenesis en explantes de cotiledón	19

4.4 Proliferación de callo obtenido en explantes de cotiledón	20
4.5 Inducción <i>in vitro</i> de callogenesis en pétalos	21
4.6 Proliferación de callo obtenido a partir de pétalos	21
4.7 Evaluación de la viabilidad y presencia de gránulos de almidón en las células del callo obtenido a partir de explantes de cotiledón y pétalos...	23
5. DISCUSIÓN.....	24
5.1 Desinfección de cotiledones	24
5.2 Desinfección de botones florales.....	25
5.3 Inducción <i>in vitro</i> de callogenesis a partir de explantes de cotiledón	25
5.4 Inducción <i>in vitro</i> de callogenesis en pétalos	26
5.5 Proliferación de callo en cotiledones y pétalos	27
5.6 Evaluación de la viabilidad y presencia de gránulos de almidón en las células del callo	29
6. CONCLUSIONES.....	30
7. RECOMENDACIONES	31
8. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA	32
9. ANEXOS.....	38
9.1 Tablas.....	38
9.2 Figuras.....	47

TÉRMINOS Y ABREVIATURAS

2,4-D	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético.
6 BAP	6 Bencilaminopurina.
DKW	Medio de cultivo Driver y Kuniyuki.
Explante	Tejido vivo vegetal utilizado para el cultivo de tejidos <i>in vitro</i> .
Callo	Masa de Células desdiferenciadas.
Friable	Característica del callo, por la que las células del callo son disgregables.

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición del medio de cultivo DKW descrito por Driver y Kuniyuki (1984).....	38
Tabla 2. Tratamientos para inducción de callo en cotiledones.....	38
Tabla 3. Tratamientos para inducción de callo en pétalos.....	39
Tabla 4. Tratamientos de desinfección para cotiledones de <i>Theobroma cacao</i> L. var. Criollo.....	39
Tabla 5. Tratamientos de desinfección para botones florales de <i>Theobroma cacao</i> L. var. Criollo.....	39
Tabla 6. Criterio de evaluación de las variables: Contaminación y fenolización en la desinfección de explantes <i>in vitro</i>	40
Tabla 7. Criterio de evaluación de la variable formación de callo en explantes de cotiledón y pétalo de <i>Theobroma cacao</i> L. var. Criollo.....	40
Tabla 8. Sistemas de desinfección en cotiledones <i>Theobroma cacao</i> L. var. Criollo.....	41
Tabla 9. Fenolización en cotiledones <i>Theobroma cacao</i> L. var. Criollo.....	42
Tabla 10. Formación de callo en cotiledones <i>Theobroma cacao</i> L. var. Criollo.....	43
Tabla 11. Estadio de desarrollo de la formación de callo en cotiledones de <i>Theobroma cacao</i> L. var. Criollo.....	44
Tabla 12. Formación de callo en pétalos de <i>Theobroma cacao</i> L. var. Criollo.....	45
Tabla 13. Estadio de desarrollo de la formación de callo en pétalos de <i>Theobroma cacao</i> L. var. Criollo.....	46

. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. A, Semillas de <i>Theobroma cacao</i> . B, Germinación <i>in vitro</i> de <i>Theobroma cacao</i>	47
Figura 2. A, Plántula germinada de <i>Theobroma cacao</i> . B, Cotiledones.	47
Figura 3. Botones florales de <i>Theobroma cacao</i> entre 5 mm – 6 mm de tamaño.....	48
Figura 4. A. Botón floral de <i>Theobroma cacao</i> . s, sépalos. p, pétalos. e, estaminodios. B, pétalo de <i>Theobroma cacao</i> . c, coagulla. li, limbo.....	48
Figura 5. Formación de callo en explantes de cotiledón a los 20 días de su introducción <i>in vitro</i> en medio DKW en presencia de 6BAP.....	49
Figura 6. Formación de callo en explantes de cotiledón a los 20 días de su introducción <i>in vitro</i> en presencia de 2,4D.....	49
Figura 7. Estado de proliferación de callo en explantes de cotiledón. A, Estado de Proliferación 0. B, Estado de Proliferación 1. C, Estado de Proliferación 2. D, Estado de Proliferación 3.....	49
Figura 8. Callo en explantes de cotiledón 50 días después de su introducción <i>in vitro</i> en presencia de 6BAP.....	50
Figura 9. Callo en explantes de cotiledón 50 días después de su introducción <i>in vitro</i> en presencia de 2,4D.....	50
Figura 10. Tipos de callo formados a partir de explantes de cotiledón. fr, callo friable. cb, callo compacto blanco. cp, callo compacto pardo cr, callo cremoso. al, células alargadas de callo friable. fi, callo blanco con formaciones alargadas.....	51
Figura 11. Formación de callo en pétalos a los 50 días de su introducción <i>in vitro</i> en presencia de 6BAP.	52
Figura 12. Formación de callo en pétalos a los 50 días de su introducción <i>in vitro</i> en presencia de 2,4D. cb, formaciones redondeadas de callo compacto blanco.....	52
Figura 13. Estado de proliferación de callo en pétalos. A, Estado de Proliferación 0. B, Estado de Proliferación 1. C, Estado de Proliferación 2. D, Estado de Proliferación 3.....	52

Figura 14. Callo en pétalos 80 días después de su introducción <i>in vitro</i> en presencia de 6BAP. fr, callo friable. cb, callo compacto blanco.....	53
Figura 15. Callo en pétalos 80 días después de su introducción <i>in vitro</i> en presencia de 2,4D. cr, callo cremoso. cb, callo compacto blanco. crn, callo cremoso necrosado.....	53
Figura 16. Tinción con azul de Evans al 0.5% de células de callo friable y compacto (400X). A. Células de callo compacto. nv, células no viables. B Células de callo friable. v, Células viables con inclusiones citoplasmáticas.....	53
Figura 17. Células embriogénicas teñidas con lugol (400X). A. Conglomerado de células embriogénicas. B Célula embriogénica con gránulos de almidón en el citoplasma.....	54
Figura 18. Tipos de callo formados a partir de pétalos. fr, callo friable. cb, callo compacto blanco. cr, callo cremoso.....	54

RESUMEN

La presente investigación tuvo como objetivo determinar la concentración de 2,4-diclorofenoxiacético (2,4D) y 6-bencilaminopurina (6BAP) en la obtención de callo embriogénico a partir de pétalos y cotiledones de *Theobroma cacao* Var. "Criollo" de la Región Piura. Se desarrollaron ensayos de desinfección para los explantes, en los que se evaluó dos soluciones desinfectantes: hipoclorito de sodio al 3% (NaClO) y cloruro de mercurio al 0,1 % (HgCl₂), con tiempos de exposición entre 5 y 20 minutos en ambos casos. Para la inducción y proliferación de callo, los explantes desinfectados fueron introducidos en medio Driver y Kuniyuki (DKW) suplementado con 3 concentraciones diferentes de 2,4D (2mg/L, 4mg/L y 6mg/L) y 6BAP (2mg/L, 4mg/L y 6mg/L). En cotiledones, se obtuvo 90% de asepsia y 77% de explantes no fenolizados al utilizar HgCl₂ al 0,1 % por 20 minutos; mientras que, en pétalos se obtuvo 100% de asepsia y 100% de explantes no fenolizados en todos los ensayos de desinfección. El 97% de explantes de cotiledón formaron callo a los 20 días de introducción *in vitro* en presencia de 4mg/L de 6BAP, 2mg/L de 2,4D y 4mg/L de 2,4D; mientras que el 100% de explantes de pétalo formaron callo a los 50 días de introducción *in vitro* en presencia de 2mg/L y 4mg/L de 6BAP. Por otro lado, se obtuvo estado de proliferación 3 en 67% de explantes de cotiledón y 80% en pétalos, en presencia de 2mg/L de 6BAP a los 30 días después del inicio de la formación de callo; asimismo, en ambos explantes en presencia de 6BAP se obtuvo callo embriogénico, cuyas células son viables, caracterizadas por ser de forma redondeada y/o alargada, poseer citoplasma denso y gránulos de almidón.

Palabras clave: *Theobroma cacao* L., Embriogenesis somática, callogenesis, explante, regulador de crecimiento.

ABSTRACT

The objective of the present investigation was to determine the concentration of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4D) and 6-benzylaminopurine (6BAP) in the production of embryogenic callus from petals and cotyledons of *Theobroma cacao* Var. "Criollo" of the Piura Region. Disinfection tests were developed for the explants, in which two disinfectant solutions were evaluated: sodium hypochlorite 3% (NaClO) and mercury chloride 0.1% (HgCl₂), with exposure times between 5 and 20 minutes in both cases. For the induction and proliferation of callus, the disinfected explants were introduced in Driver and Kuniyuki medium (DKW) supplemented with 3 different concentrations of 2,4D (2mg / L, 4mg / L and 6mg/L) and 6BAP (2mg/L, 4mg/L and 6mg/L). In cotyledons, 90% asepsis and 77% non-phenolized explants were obtained by using 0.1% HgCl₂ for 20 minutes; while, in petals 100% asepsis and 100% non-phenolized explants were obtained in all the disinfection tests. 97% of cotyledon explants formed callus at 20 days of introduction *in vitro* in the presence of 4mg/L of 6BAP, 2mg / L of 2,4D and 4mg/L of 2,4D; in contrast, 100% of petal explants formed callus at 50 days of *in vitro* introduction in the presence of 2mg/L and 4mg/L of 6BAP. On the other hand, state of proliferation 3 was obtained in 67% of cotyledon explants and 80% in petals, in the presence of 2mg/L of 6BAP at 30 days after the onset of callus formation; in the same way, in both explants in the presence of 6BAP embryogenic callus was obtained, whose cells are viable, characterized by being rounded and / or elongated, having dense cytoplasm and starch granules.

Key words: *Theobroma cacao* L., Somatic embryogenesis, callogenesis, explant, growth regulator.

1. INTRODUCCIÓN

Theobroma cacao L., pertenece a la familia Malvaceae y es originario de los bosques del Amazonas. En la actualidad se conocen tres variedades de cacao: Criollo, forastero y trinitario, siendo este último un híbrido, producto del cruce entre la variedad criollo y forastero. La variedad Criollo corresponde a una planta que produce mazorcas con semillas que tienen alto contenido de grasa, por lo que el grano proporciona un mejor sabor y aroma al chocolate, estas características hacen que la variedad Criollo tenga un mejor precio en el mercado chocolatero frente a otras variedades.

En la actualidad, los países que destacan como los principales productores en Sudamérica son Ecuador, Colombia, Perú y Venezuela. Perú es considerado el segundo mayor productor de cacao var. Criollo, gracias a que sus condiciones agroecológicas permiten el cultivo de esta variedad, específicamente en la región Piura, en las provincias de Morropón y Huancabamba.

Theobroma cacao es una planta alógama, su reproducción sexual es mediante polinización cruzada, lo que causa constante variabilidad genética en las nuevas poblaciones. En la actualidad, la propagación vegetativa tradicional (injerto, estaca y acodo) es vista como alternativa para contrarrestar la segregación de caracteres causada por la polinización cruzada. Sin embargo, existen muchas desventajas asociadas a las técnicas de propagación tradicional, entre las que destaca su baja tasa de multiplicación.

Uno de los métodos de cultivo de tejidos *in vitro* que permite la multiplicación masiva de plántulas en periodos cortos de tiempo es la embriogénesis somática, esta técnica permite la obtención de embriones no cigóticos a partir de cualquier tejido vegetal (explante), gracias a la totipotencialidad de las células. La fase inicial de la embriogénesis somática se denomina callogenesis, es en esta etapa donde las células, en presencia de reguladores de crecimiento logran sucesivas divisiones mitóticas, que

dan lugar a una masa amorfa de células no diferenciadas (callo). Al ser la callogénesis la etapa donde se inicia la formación de embriones somáticos, es importante establecer un protocolo, puesto que, la obtención de callo embriogénico depende del tipo de regulador de crecimiento y la dosis utilizada, la cual es diferente para cada especie y variedad.

En la actualidad, la propagación del cacao var. Criollo de la Región Piura se restringe a las técnicas tradicionales, debido a que aún no existen protocolos de propagación *in vitro* para este cultivar. Razón por la cual, esta investigación tiene como objetivo principal determinar la concentración de regulador(es) de crecimiento que permita la formación de callo embriogénico en explantes florales y cotiledón. Por otro lado, los objetivos específicos son estandarizar el sistema de esterilización para botones florales y cotiledones de *Theobroma cacao* L. Var. Criollo y Evaluar las estructuras embriogénicas obtenidas a partir de cotiledones y pétalos de *Theobroma cacao* L.

2. ANTECEDENTES

2.1 Clasificación taxonómica

La clasificación taxonómica de la especie *Theobroma cacao* L. según la clasificación de Carlos Linneo y la última versión del Sistema de clasificación de angiospermas de APG (Angiosperm Phylogeny Group) es la siguiente:

Reino	: Plantae
Subreino	: Tracheobionta
Superdivisión	: Spermatophyta
División	: Magnoliophyta
Clase	: Magnoliopsida
Subclase	: Dilleniidae
Orden	: Malvales
Familia	: Malvaceae
Subfamilia	: Byttnerioideae
Género	: <i>Theobroma</i>
Especie	: <i>Theobroma cacao</i> L.

2.2 Origen y distribución geográfica

Theobroma cacao L. es un árbol nativo de regiones tropicales húmedas, y fue cultivado desde hace siglos en América. Los Toltecas, aztecas y Mayas cultivaban el cacao desde mucho antes del descubrimiento de América, en base a esta evidencia histórica es que Hardy (1961) señala a México y Centroamérica como lugares de origen del cacao. Por otra parte, Wood (1985) señaló el área del alto Amazonas como lugar de origen del cacao,

exactamente áreas que comprenden los países de Ecuador, Colombia, Perú y Brasil, debido a que en este lugar se encontró la mayor diversidad de caracteres morfológicos y fisiológicos en arboles de cacao.

Gracias al uso de marcadores moleculares en investigaciones realizadas por Dias, (2001) y Motamayor *et al.*, (2002) se ha podido plantear tres hipótesis que proponen el origen y dispersión del cacao: La primera es una hipótesis de dispersión que supone que el cacao tuvo como centro de origen a la cuenca alta del Amazonas, lugar de donde habría sido llevado a través de los Andes hacia Centroamérica, siendo aquí el lugar donde se domesticó; La segunda hipótesis de dispersión, respalda un origen Centroamericano y dispersión del cacao en dirección opuesta a la anterior hipótesis; por último, la tercera hipótesis plantea un desarrollo simultáneo e independiente de dos poblaciones de cacao: el cacao Criollo en Centroamérica y Forastero en Sudamérica.

Aunque aún existe controversia sobre el origen y domesticación del cacao, las evidencias antropológicas, históricas, paleontológicas y biogeográficas, junto con los estudios moleculares en genética de poblaciones refuerzan la primera hipótesis de dispersión (Dias, 2001; Motamayor *et al.*, 2002) Hipótesis que también es reforzada por Lanaud *et al.*, 2000, quienes afirman que la cuenca del Amazonas es el lugar de origen del cacao, específicamente en territorios cercanos a los países de Perú, Colombia y Ecuador que son los lugares donde se encuentra la mayor diversidad genética de cacao.

2.3 Diversidad Genética

Existen tres principales variedades de cacao que han sido descritas y cultivadas tradicionalmente alrededor del mundo, estas son: Criollo, Forastero y Trinitario. La diversidad es más evidente en caracteres del fruto como la forma, relieve de la superficie y color; así como la forma de la semilla y el color de los cotiledones y en menor grado en caracteres del porte, follaje y flores. Menos visibles, pero de gran importancia económica

son las diferencias en susceptibilidad a enfermedades fungosas (León, 2000)

El grupo de los Criollos, fue originalmente cultivado por los mayas en América Central y representa el primer grupo de cacao domesticado del mundo, sus almendras producen cacao de alta calidad, a este grupo también se le denomina cacao fino de aroma y lo utilizan para la preparación de chocolate. Se cultiva en México, Venezuela, Colombia, Nicaragua, Guatemala, Trinidad, Jamaica y Granada, en la zona del océano Índico y en Indonesia. Representa, como mucho, el 5% de la producción mundial (Adriazola, 2003 y Afoakwa *et al.*, 2008).

La variedad Forastero incluye distintas poblaciones localizadas a lo largo de la Región Amazónica. El grupo Forastero cuenta con dos subgrupos bien definidos: Forasteros del Alto Amazonas, los que provienen de la parte alta de la cuenca Amazónica y Forasteros del bajo Amazonas (Efombagn *et al.*, 2008). De esta variedad, se obtiene el cacao a granel o “básico” y contribuyó como parental en la generación de los Trinitarios hace unos 250 años (Motamayor *et al.*, 2008)

El grupo Trinitario, es una población híbrida que se originó del cruce entre la variedad Forastero (amelonado) de las Guyanas y Criollo de Venezuela (García, 2000). Por tanto, posee una alta heterogeneidad debido a su origen híbrido. Este grupo fue domesticado y empleado como materia prima en la alimentación de los pueblos precolombinos de Centroamérica hace unos 3.800 años (Powis *et al.*, 2011).

2.4 Embriogénesis somática

La embriogénesis somática es el proceso por el cual se forman embriones a partir de células somáticas. Estos embriones, conocidos como embriones somáticos, son morfológicamente iguales a los embriones cigóticos, poseen estructura bipolar, órganos embrionarios, hipocotilo y cotiledones. Sin embargo, su desarrollo se da a través de diferentes vías (Von Arnold *et al.*, 2002; George *et al.*, 2007).

Gracias a la capacidad totipotente de las células, los embriones somáticos se pueden obtener a partir de células somáticas, de cualquier tipo de tejido vegetal, sometiéndolas a estrés, a través de la manipulación de las condiciones del medio de cultivo y la aplicación de reguladores de crecimiento (Freire 2003).

2.5 Callogénesis

La callogenesis es la primera fase de la embriogenesis somática en donde a partir de la siembra de un explante *in vitro* se observa la proliferación de células en forma desordenada y sin ninguna función predeterminada (Levitus, *et al.*, 2010).

2.5.1 Desinfección de explantes

La contaminación microbiana es uno de los problemas que afecta la viabilidad de los explantes en el establecimiento de los cultivos *in vitro*, por lo que a lo largo del tiempo, se han realizado investigaciones para evaluar distintos agentes desinfectantes en el establecimiento aséptico de cultivos *in vitro*. Sondahl *et al.*, (1994), utilizaron cloruro de sodio (NaClO) al 1%, al 2% y al 0.8% por 20, 15 y 10 minutos respectivamente en la desinfección de explantes florales para la obtención de callo embriogénico. Asimismo, Azofeifa (2009), Quiñones *et al.*, (2013), García *et al.*, (2015) evaluaron la desinfección de distintos explantes vegetales con cloruro de sodio (NaClO), dicloruro de mercurio (HgCl₂) a distintas concentraciones y distintos tiempos de inmersión, obteniendo cultivos *in vitro* asépticos y bajos índices de oxidación.

2.5.2 Callogenesis en *Theobroma cacao*

Las primeras investigaciones relacionadas a la callogenesis en cacao evaluaron la capacidad de formación de callo a partir de embriones cigóticos inmaduros en presencia de auxinas y citoquininas. Kononowicz, *et al.* (1984) obtuvo callo friable, al que calificó como embriogénico y con el que logro producir embriones somáticos, utilizó a embriones cigóticos inmaduros como explantes y los sembró en medio suplementado con 2,4D en concentraciones de 0 a 2mg/L + agua de coco (100 ml/L). Posteriormente Ndoumou, *et al.*, (1997) indujo la formación de callo en dos clones de cacao trinitario a partir de explantes de cotiledon en presencia de 2,4D y kinetina; años más tarde Velásquez, *et al.*, (2006) trabajo con cacao venezolano y utilizó nuevamente embriones cigóticos inmaduros como explantes para la inducción de callo en presencia de 2,4D (4,6 y 8mg/L) en concentraciones más altas de las utilizadas anteriormente obteniendo también callo embriogénico.

Posteriormente los esfuerzos se dirigieron a la evaluación de la capacidad de formación de callo de explantes florales. Chanatásig (2004) evaluó la capacidad de formación de callo de pétalos y estaminodios en presencia de 2,4D y tidiazuron, obteniendo a los 28 días explantes totalmente cubiertos por callo. Situación similar se observó en trabajos realizados por Li *et al.*, (1998), Maximova *et al.*, (2002), Cabrera (2011), Mata (2013) e Hidalgo (2014), quienes obtuvieron resultados promisorios callo embriogénico utilizando explantes florales como: pétalos y estaminodios. En explantes florales se obtuvo formaciones de callo con las que se logró hasta un 90% de producción de embriones somáticos. Así como también, se estableció exitosamente la regeneración de plantas de cacao mediante embriogénesis somática (Solano, 2008; Monsalve *et al.*, 2005; Chanatásig, 2004).

Aunque las investigaciones reportadas hasta el momento tienen resultados satisfactorios en producción de callo embriogénico, todavía son de utilidad limitada, siendo aplicables solo a algunos genotipos ya que no todos los genotipos reaccionan de manera similar a un mismo protocolo de inducción de callo.

2.5.3 Fitohormonas en la inducción de callo embriogénico en *Theobroma cacao*

Investigaciones de Abdelnour *et al.*, (1994); Santos *et al.*, (2002); Chong *et al.*, (2007); Santana *et al.*, (2010); Jácome *et al.*, (2012) y Ortega (2013), reportan que el callo embriogénico, se caracteriza por poseer células redondeadas y/o alargadas, por lo general agrupadas en cadena con presencia de gránulos de almidón en su citoplasma, así mismo, reportan que los reguladores de crecimiento son determinantes en la obtención de callo embriogénico ya que estos interactúan con los niveles hormonales endógenos. En algunos casos, las respuestas para la obtención de callo embriogénico están dadas por la acción conjunta de dos o más reguladores de crecimiento (Anami *et al.*, 2010) y en algunos casos la callogenesis puede ser inducida bajo la presencia de un solo regulador de crecimiento.

La respuesta de explantes de *Theobroma cacao* L. fue evaluada en medios suplementados con agua de coco y 2,4 D logrando la proliferación de callo a partir de embriones cigóticos. (Figueira y Janick, 1993; López-Baez *et al.*, 1993 y Quimbata, 2011). La eficacia del 2,4D también fue probada por Kononowicz *et al.* (1984) y Elhag *et al.*, (1988), obteniendo en ambos casos resultados positivos. Por otro lado, Li *et al.*, (1998) lograron inducir un crecimiento rápido del callo utilizando el medio suplementado con citoquininas.

Elhag *et al.*, (1988) reporta que el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4 D) no es esencial para la inducción de la formación de callo en todas las especies, y que en algunos casos la callogenesis puede ser inducida en la presencia de citoquininas.

Posteriormente, Li *et al.* (1998), Gultinan *et al.* (2003), Díaz *et al.* (2009) y Urrea *et al.* (2011) consideran combinaciones de auxinas y citoquininas en los medios de inducción, los que permitieron obtener callo embriogénico a partir de explantes de pétalo y estaminoides.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Obtención del material biológico

Los botones florales y mazorcas fueron colectados de árboles de *Theobroma cacao* var. Criollo del Banco de Germoplasma *in situ* de propiedad del Ing. Eduardo Espinoza Tamariz, ubicado en el distrito La Quemazón – Morropón, región Piura.

Los botones florales colectados fueron colocados en placas Petri con algodón humedecido en agua estéril. Tanto mazorcas como botones florales fueron rotulados y colocados en un cooler con gelpacks para mantener la temperatura entre 5°C -8°C durante su transporte vía terrestre Piura - Lima.

3.2 Preparación de medios de cultivo para inducción de callo

Los medios de cultivo para la inducción de callo tuvieron como base las sales minerales a concentración completa del medio de cultivo DWK establecido por Driver y Kuniyuki (1984) (Tabla 1). La preparación de este medio se realizó a partir de soluciones stock de macroelementos, microelementos, vitaminas y quelato de hierro, se tomó las alícuotas correspondientes de cada una de las soluciones stock y se le adicionó diferentes concentraciones de la hormona 6 – Benzil aminopurina (6BAP) y ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4 D), dependiendo del tipo de tratamiento (Tabla 2 y 3). Luego, se agregó 30 g/l de sacarosa, se enrazó con agua destilada al volumen a preparar, se ajustó el pH a 5.7 y se adicono 3 g/L de gelrite .A continuación se sirvieron 15 ml de medio en frascos de vidrio y fueron esterilizados en autoclave por 15 minutos a 121°C y a 15 libras de presión.

3.3 Germinación de semillas y Desinfección de cotiledones

Las semillas fueron extraídas de las mazorcas y lavadas con agua de grifo hasta quitar por completo el mucilago, posteriormente, dentro de la cámara flujo laminar las semillas fueron esterilizadas por 15 minutos con hipoclorito de sodio (NaOCl) al 2% y luego se enjuagaron con agua destilada estéril. A continuación fueron colocadas en placas Petri y con la ayuda de un bisturí se retiró la testa de cada una de ellas, luego fueron introducidas en frascos de vidrio estériles con algodón humedecido con agua destilada (Figura 1). Los frascos fueron incubados en el cuarto de crecimiento a una temperatura de 22 – 25 °C \pm 2° en completa oscuridad por 72 horas y posteriormente fueron expuestos a 16 h luz y 8h de oscuridad.

Transcurrido el tiempo establecido, en una cámara flujo laminar se aislaron los cotiledones de las plántulas de cacao germinadas *in vitro* (Figura 2), luego se sumergieron en alcohol al 70% por 40 segundos, seguido de la inmersión en soluciones desinfectantes según el tratamiento. En los tratamientos 1, 2 y 3 se utilizó una solución de hipoclorito de sodio (NaClO) al 3% con tiempos de exposición de 5, 10 y 15 minutos; mientras que, en los tratamientos 4, 5 y 6 se utilizó la solución de cloruro de mercurio (HgCl₂) al 0.1% con tiempos de exposición de 10, 15 y 20 minutos (Tabla 4). Posteriormente, los explantes fueron enjuagados con agua destilada estéril, colocados en placas Petri estériles y seccionados en segmentos de 5 mm aproximadamente. Finalmente se sembraron cinco segmentos de cotiledón en un frasco de vidrio con medio Driver y kuniyuki (DWK), estas fueron incubados en el cuarto de crecimiento a una temperatura de 22 – 25 °C \pm 2° en completa oscuridad.

Se consideró como unidad experimental cada uno de los cinco segmentos de cotiledón sembrados en un frasco y por tratamiento se realizaron 30 repeticiones. Las variables evaluadas fueron porcentaje de desinfección y porcentaje de fenolización. El criterio para evaluar ambas variables

consistió en observar el número de explantes con presencia o ausencia de agentes contaminantes (hongos o bacterias) y se calificó como contaminado y no contaminado. El porcentaje de fenolización se determinó por la presencia o ausencia de tejido necrosado o la coloración pardo o marrón en el medio de cultivo alrededor de los explantes y se calificó fenolizado o no fenolizado (Tabla 6).

3.4 Desinfección de botones florales

Se seleccionó botones florales entre 5 y 6 mm de tamaño (Figura 3) y se lavaron superficialmente con agua de grifo y detergente, luego en una cámara flujo laminar se sumergieron en alcohol al 70% por 40 segundos, seguido de la inmersión en soluciones de hipoclorito de sodio (NaClO) al 2% y cloruro de mercurio al (HgCl_2) 0.1% según el de tratamiento. En los tratamientos 1, 2 y 3 se utilizó soluciones de hipoclorito de sodio (NaOCl) al 2% por 5, 10 y 15 minutos respectivamente, mientras que en los tratamientos 4, 5 y 6 se utilizó soluciones de cloruro de mercurio (HgCl_2) al 0.1% con tiempos de exposición de 5, 10 y 15 minutos respectivamente (Tabla 5). Posteriormente, los botones florales fueron enjuagados con agua destilada estéril, colocados en placas Petri y bajo un esteroscopio con la ayuda de un bisturí estéril se aislaron los pétalos, luego fueron sembrados en un frascos de vidrio con medio Driver y kuniyuki (DWK) e incubados en el cuarto de crecimiento a una temperatura de $22 - 25 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2^\circ$ en completa oscuridad.

Los cinco pétalos de cada botón floral fueron sembrados en un frasco de vidrio, la unidad experimental consistió en cada pétalo que conforma un botón floral (Figura 4), se realizó 30 repeticiones por tratamiento y las variables evaluadas fueron porcentaje de contaminación y porcentaje de fenolización. El criterio para evaluar ambas variables consistió en observar el número de explantes con presencia o ausencia de agentes contaminantes (hongos o bacterias) y se calificó como contaminado y no

contaminado. El porcentaje de fenolización se evidenció por la presencia o ausencia de tejido necrosado o la coloración de color pardo o marrón en el medio de cultivo alrededor de los explantes y se calificó y se calificó como fenolizado y no fenolizado (Tabla 6).

3.5 Introducción de explantes de cotiledón en medio de inducción para la callogenesis

En cabina de flujo laminar los cotiledones fueron desinfectados, seccionados y sembrados en el medio de cultivo Driver y Kuniyuki (DWK) suplementado con 6 – Benzil amino purina (6BAP) y la hormona ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4 D) en concentraciones de 2, 4 y 6 mg/L cada una, obteniendo en total 6 tratamientos (Tabla 2).

Cinco explantes de cotiledón fueron sembrados en 1 frasco de vidrio y fueron incubados en el cuarto de crecimiento a temperatura de 22 – 25 °C \pm 2 °C en condiciones de total oscuridad. Se realizaron 30 repeticiones por tratamiento y se consideró como unidad experimental a cada explante de cotiledón. La variable evaluada fue número de explantes con formaciones de callo expresada en porcentajes (Tabla 7) y los resultados se analizaron estadísticamente utilizando el paquete estadístico (SPSS versión 21),

3.6 Introducción de pétalos en medio de inducción para la callogenesis

En cabina de flujo laminar los pétalos fueron desinfectados, seccionados y sembrados en el medio de cultivo Driver y Kuniyuki (DWK) suplementado con 6 – Benzil amino purina (6BAP) en concentraciones de 2, 4 y 6 mg/L y la hormona ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4 D) en concentraciones de 2, 4 y 6 mg/L (Tabla 3).

Los cinco pétalos de un botón floral fueron sembrados en un frasco de vidrio y cada pétalo fue sembrado en posición horizontal tratando que la mayor parte de la superficie del pétalo se encuentre en contacto con el medio. Posteriormente fueron incubados en el cuarto de crecimiento a temperatura de $22 - 25 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$ en condiciones de total oscuridad.

Se consideró como unidad experimental a cada pétalo y se realizaron 30 repeticiones por tratamiento. La variable evaluada fue número de explantes con formaciones de callo expresada en porcentajes (Tabla 7), los resultados se analizaron estadísticamente utilizando el paquete estadístico (SPSS versión 21).

3.7 Proliferación de callo

Los callos formados en los distintos tratamientos de inducción se subcultivaron en medio fresco de la misma composición por un periodo de 30 días. Al momento de la siembra siempre se aseguró un buen contacto del explante y las formaciones de callo con el medio de cultivo y fueron incubados en el cuarto de crecimiento a temperatura de $22 - 25 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$ en condiciones de total oscuridad.

Para evaluar la proliferación de callo en cada tratamiento, se establecieron etapas de proliferación, a los que se le atribuyeron valores numéricos que van de 0 a 3, estos valores se encuentran relacionados con la proporción de callo que forma cada explante, 0 indica no formación de callo, 1 indica el inicio de formación de callo, 2 indica formación moderada de callo y 3 indica etapa de formación exponencial. La determinación de las diferentes etapas de proliferación de callo permitió evaluar de forma cuantitativa la relación entre la proporción de callo proliferado y las concentraciones de los reguladores de crecimiento utilizados.

Las variables evaluadas fueron porcentaje de callos en cada estado de proliferación, los resultados se analizaron estadísticamente utilizando el paquete estadístico (SPSS versión 21). Además se evaluó las características morfológicas (textura y color) de los callos obtenidos.

3.8 Evaluación de la viabilidad de las células del callo y presencia de gránulos de almidón.

Se evaluó la viabilidad de las células de los callos mediante un frotis de una muestra de callo sobre un portaobjeto, luego se agregó solución de Azul de Evans al 0.5%, se colocó un cubre objeto y se procedió a su observación bajo el microscopio. Se consideró como viables aquellas células que no presentaron coloración azul, y como células no viables aquellas en las que la pared celular y citoplasma se tiñeron de coloración azul.

Para detectar la presencia de gránulos de almidón en las células se realizó un frotis de una muestra de callo tal y como se describió en el párrafo anterior y posteriormente se tiñó con una solución de Lugol, se colocó un cubre objeto y se observó bajo el microscopio. Las células que poseen gránulos de almidón presentaron formaciones citoplasmáticas redondas con tinción de color morado oscuro.

4. RESULTADOS

4.1 Desinfección de cotiledones

En los tratamientos de desinfección con hipoclorito de sodio (NaClO) al 3% por 5, 10 y 15 minutos se obtuvo 50%, 53% y 83% de asepsia respectivamente (TABLA 8), mientras que, en los tratamientos con cloruro de mercurio (HgCl_2) al 0.1% por 10, 15 y 20 minutos se obtuvo 70%, 73% y 90% de porcentajes de asepsia respectivamente.

En los ensayos establecidos se evidenció la fenolización, por el oscurecimiento del explante y el medio de cultivo, los tratamientos con NaClO por 5, 10 y 15 minutos presentaron porcentajes de fenolización de 50%, 83,3% y 100% respectivamente, mientras que en los tratamientos donde se utilizó cloruro de mercurio (HgCl_2) al 0.1% por 10, 15 y 20 minutos presentaron 7%, 17% y 23% de fenolización respectivamente (TABLA 9). Estos resultados, muestran que los tratamientos en los que los explantes fueron expuestos a la solución desinfectante por mayor tiempo presentan mayor fenolización, además, evidencia que el hipoclorito de sodio presenta un mayor efecto abrasivo frente al cloruro de mercurio.

Un sistema de desinfección adecuado de los explantes asegura la eliminación de los agentes contaminantes (bacterias, hongos y virus) y evita la reacción oxido-reducción. En la presente investigación, el tratamiento que aseguro la eliminación de agentes contaminantes y el menor porcentaje de fenolización fue el tratamiento 6 (HgCl_2 al 0.1% por 20 minutos), donde se obtuvo un 90% de asepsia y 77% de explantes no fenolizados.

4.2 Desinfección de Botones Florales

Los tratamientos de desinfección en los que se utilizó hipoclorito de sodio (NaClO) al 2% y cloruro de mercurio (HgCl₂) al 0.1% por 5, 10 y 15 minutos respectivamente se logró obtener 100% de desinfección y ausencia de fenolización. Los resultados obtenidos evidencian la efectividad de los dos desinfectantes evaluados y la importancia de la desinfección de los botones florales antes de la anthesis ya que los sépalos protegieron a los explantes (pétalos) de la contaminación externa, evitando que el explante sufriera daños al estar en contacto con la solución desinfectante.

Con los seis tratamientos se lograron obtener cultivos asépticos, sin embargo, se eligió el tratamiento 1 (NaClO al 2% por 5 minutos) para continuar con las siguientes etapas de esta investigación por ser en el que se expone los explantes por menor tiempo a la solución desinfectante.

4.3 Inducción *in vitro* de callogenesis en explantes de cotiledón

En todos los tratamientos se observó aumento en el volumen y oscurecimiento en el borde de los explantes antes del inicio de la formación de callo, esta se inició en la base de los explantes a los 20 días después de la introducción *in vitro* (Figura 5). En los medios de cultivo DKW (tratamientos 1, 2 y 3) suplementados con 2, 4 y 6 mg/L de 6BAP respectivamente se obtuvo callo cristalino; mientras que, en los medios de cultivo DKW (tratamiento 4,5 y 6) suplementados con 2, 4 y 6 mg/L de 2,4D respectivamente se obtuvo callo con textura cremosa de color café claro (tratamiento 4) y color marrón (tratamiento 5 y 6). Asimismo, en estos tres tratamientos se observó formaciones de callo color blanco, el que se presentó en mayor proporción en el tratamiento 6 (Figura 6).

Los explantes cultivados en los tratamientos 1, 2 y 3 suplementados con 6BAP presentaron porcentajes de formación de callo de 93%, 97% y 93 % respectivamente; mientras que, los tratamientos suplementados con 2,4D 4 y 5 presentaron porcentajes de formación de callo de 97% y el tratamiento 6 de 90% (TABLA 10). En todos los tratamientos, los resultados observados evidencian la acción de los reguladores de crecimiento 2,4D y 6BAP en la desdiferenciación de los tejidos en callo, obteniéndose diferentes tipos de callo (Figura 10).

4.4 Proliferación de callo obtenido en explantes de cotiledón

Se observaron diferentes estadios de proliferación a los 50 días de cultivo *in vitro* de los explantes de cotiledón (Figura 7). En los tratamientos: 1, 2 y 3 suplementados con 2, 4 y 6 mg/L de 6BAP respectivamente se observó en 67%, 60% y 53% de explantes con callo en estadio de proliferación 3 (E3); mientras que, en el tratamiento 4 suplementado 4 mg/L de 2,4D se observó en 57% de los explantes callo en estado de proliferación 2 (E2) y en los tratamiento 5 y 6 suplementados con 4 y 6 mg/L de 2,4D respectivamente, se observó en 60% y 73% de explantes con callo en estado de proliferación 1 (E1) (TABLA 11). Los resultados obtenidos evidencian que la proliferación de callo disminuye con el aumento de concentraciones de los reguladores de crecimiento, obteniendo estadios de proliferación menores en presencia de 2,4D.

En los tratamientos 1 ,2 y 3 se observó pequeñas formaciones de callo compacto de color blanco, las que se presentaron en mayor proporción en los tratamientos 2 y 3 (Figura 8). Asimismo, se observó que el callo cristalino adquiere una coloración oscura (color café o café oscuro) a causa de la formación de sustancias fenólicas por oxidación, la que se acentuó por el tiempo de permanencia en el cultivo, la exposición del callo a la luz en el momento de la manipulación durante los subcultivos y su manipulación al momento de realizar los subcultivos. Luego de la

transferencia al medio fresco la formación de callo cristalino continua producto de la división celular activa; mientras que, los explantes subcultivados en los tratamientos 4,5 y 6 presentaron niveles de fenolización altos, que produjo el necrosamiento y muerte de los callos a los 50 días (Figura 9).

4.5 Inducción *in vitro* de callogenesis en pétalos

En todos los tratamientos se observó oscurecimiento en los explantes, engrosamiento de los bordes y aumento del volumen del limbo antes del inicio de la formación de callo. El inicio de la formación de callo se observó en el limbo, coagulla o parte media del pétalo a los 50 días después de la introducción *in vitro*.

Los pétalos cultivados en los tratamientos 1,2 y 3 suplementados con 2, 4 y 6mg/L de 6BAP respectivamente, presentaron callo de color café claro y blanco; mientras que, en los tratamientos 4,5 y 6 suplementados con 2, 4 y 6mg/L de 2,4D respectivamente, se observó callo color blanco en mayor proporción y ausencia o escasa formación de callo color café claro en comparación a los tratamientos 1,2 y 3 (Figura 11 y 12)

Se obtuvo formación de callo en 100% de los pétalos cultivados en los tratamientos 1 y 2; mientras que en el tratamiento 3 se obtuvo 97% de explantes que formaron callo. Por otro lado, en los tratamientos 4,5 y 6 se observó 77%, 60% y 47% de explantes que formaron callo (TABLA 12). Los resultados obtenidos, evidencian diferencias en la acción de los reguladores de crecimiento 6BAP y 2,4D en la formación de callo en pétalos.

4.6 Proliferación de callo obtenido a partir de pétalos

Se estableció diferentes estados de la proliferación de callo a los 80 días de la introducción *in vitro* de los pétalos (Figura 13). En el tratamiento,

suplementado con 2mg/L de 6BAP se observó en 80% de los explantes callo en estadio de proliferación 3 (E3); mientras que, en los tratamientos 2 y 3 suplementado con 4 y 6 mg/L 6BAP se observó en 73%, 70% explantes con callo en estadio de proliferación 2 (E2). Por otro lado, en el tratamiento 4, suplementado con 6 mg/L 2,4D se observó en 40% de explantes callo en estado de proliferación 2 (E2); mientras que, en los tratamientos 5 y 6 suplementados con 4 y 6 mg/L 2,4D se observó en 40% y 30% de explantes con callo en estadio de proliferación 1 (E1) (TABLA 13).

Durante el periodo de proliferación, se obtuvo diferentes tipos de callo (Figura 18), en los tratamientos 1, 2 y 3 en los que se utilizó 6 BAP se obtuvo dos tipos de callo, uno de color café oscuro de consistencia friable y otro de color blanco de consistencia compacta, además, se observó que este último se presenta en mayor cantidad conforme la concentración de 6 BAP aumenta (figura 14). Por otro lado, las formaciones de callo de consistencia friable, a diferencia del callo de apariencia compacta tienden a adquirir una coloración más oscura conforme transcurre el tiempo de cultivo, la que se debe a la fenolización. Los factores que aumentaron la fenolización en ambos tipos de callo fue la manipulación al momento de realizar los subcultivos, la exposición a la luz y ausencia de contacto con el medio de cultivo. Para evitar la fenolización se subcultivo en medio de cultivo fresco de manera continua procurando que el callo se encuentren en contacto directo con el medio de cultivo y manteniendolos en completa oscuridad.

Por otro lado, En los tratamientos 4, 5 y 6 en los que se utilizó 2,4D se obtuvo dos tipos de callo (Figura 15), callo compacto de color blanco y callo marrón oscuro de consistencia cremosa, este último se presenta en menor proporción en comparación con el callo compacto y generalmente se desarrolló en la coagula de los pétalos, este tipo de callo se fenoliza con gran facilidad a pesar de los subcultivos continuos en medio fresco, y a su vez presenta interrupción por el proceso de proliferación de necrosamiento.

Según los resultados obtenidos, el tratamiento que induce mejor proliferación de callo es el tratamiento 1, suplementado con 2mg/L de 6BAP, donde se observó 80% de explantes con callo friable en estadio de proliferación 3.

4.7 Evaluación de la viabilidad y presencia de gránulos de almidón en las células del callo obtenido a partir de explantes de cotiledón y pétalos

Al evaluar la viabilidad de los callos se observó que el citoplasma de las células de callo friable de todos los tratamientos no presentaron tinción al ser coloreadas con azul de Evans al 0.5%. Las células presentaron las siguientes características: forma redondeada y/o alargada agrupadas en racimos y con citoplasma denso con presencia de gránulos de almidón; mientras que, las células de callo compacto no presentaron coloración en el citoplasma, forma definida y se agruparon en cadena (Figura 16 y 17). Estos resultados evidencian que el callo friable son células viables con potencial embriogénico.

5. DISCUSIÓN

5.1 Desinfección de cotiledones

Los cotiledones de las semillas germinadas fueron desinfectadas con solución de NaClO al 3% por 5, 10 y 15 minutos y se obtuvo 50%, 53% y 83% de asepsia respectivamente, mientras que al desinfectarlos con cloruro de mercurio al 0.1% por 10, 15 y 20 minutos se obtuvo 70 %, 73% y 90% de asepsia, estos resultados corroboran lo reportado por García *et al.* (2015), quienes utilizaron cloruro de mercurio entre 0.1% y 0.5%; Sondahl *et al.* (1994) 2.1% de hipoclorito de sodio, Quiñones *et al.* (2013) 1% de hipoclorito de sodio y obtuvieron el establecimiento aséptico de cultivos *in vitro*; mientras que, Ndoumou *et al.* (1997) y Velásquez *et al.* (2006) lograron obtener cultivos asépticos utilizando concentraciones más altas de hipoclorito de sodio (25%, y 20%), a las utilizadas en esta investigación.

Por otro lado, el efecto abrasivo de la solución desinfectante aumenta la fenolización de los explantes, en esta investigación se obtuvo entre 50 % y 100% de fenolización en los tratamientos en los que se utilizó NaClO al 3% por 5, 10 y 15 minutos, la fenolización se acentuó conforme el tiempo de exposición del explante a la solución desinfectante aumentaba. Estos resultados corroboran lo reportado por Azofeifa (2009) que indica que una de las causas de la fenolización es el efecto abrasivo del agente desinfectante; mientras que, al desinfectar los cotiledones con HgCl al 0.1% por 10 minutos se obtuvo 6.7 % de fenolización, lo que corrobora que el efecto abrasivo del NaClO es superior al del HgCl. Además, Quiñones y colaboradores (2013), evidenciaron que la mayor cantidad de fenoles en las plantas de cacao se encuentran en las semillas lo que corrobora los altos porcentajes de fenolización en cotiledones observados en esta investigación.

5.2 Desinfección de botones florales

En esta investigación se obtuvo 100% de asepsia al desinfectar los botones florales en solución de NaClO al 2% por 5, 10 o 15 minutos, la concentración del desinfectante que se utilizó es menor a las reportadas por Díaz *et al.* (2009) y Chanatásig (2004), quienes utilizaron NaClO al 20% y 25% respectivamente por 10 minutos; López-Baez *et al.* (1993) no reportaron los resultados obtenidos, mientras que, Chanatásig (2004) obtuvo porcentajes de desinfección cercanos al 100%. Por otro lado, Solano (2008) obtuvo porcentajes de asepsia entre el 55% y 96% al desinfectar los botones florales con hipoclorito de sodio al 1% por 20 minutos. Asimismo, Guiltinan *et al.* (2003), Monsalve *et al.* (2005) y Sondahl *et al.* (1994), lograron desinfectar botones florales con NaClO al 1%, al 2% y al 0.8% por 20, 15 y 10 minutos respectivamente, pero no reportaron los resultados obtenidos.

Es importante mencionar, que en ninguno de los tratamientos de desinfección se observó fenolización, lo que corrobora lo reportado por Quiñones *et al.* (2013), quien afirma que existe baja concentración de compuestos fenólicos en las flores de las plantas de cacao y que la mayor cantidad de fenoles se encuentran en las semillas y otros órganos.

5.3 Inducción *in vitro* de callogenesis a partir de explantes de cotiledón

En la presente investigación se observó la formación de callo en explantes de cotiledón 20 días después de la introducción *in vitro*, los porcentajes de formación de callo para cotiledones cultivados en medios suplementados con 2 y 6 mg/L de 6BAP fue de 93% y con 6 mg/L de 6BAP de 97%; mientras que, en medio suplementado con 2 y 4 mg/L de 2,4D se obtuvo 97% de formación de callo y con 6 mg/L de 2,4D 90%. Los resultados

obtenidos corroboran lo reportado por Ndoumou *et al.* (1997) quienes obtuvieron callo a partir de explantes de cotiledon de *Theobroma cacao* L. en medio suplementado con auxinas y citoquininas después de la tercera semana de la introducción *in vitro*; Kononowicz *et al.* (1984) observaron la formación de callo entre la segunda y tercera semana de la introducción *in vitro* de embriones cigóticos de *Theobroma cacao* L. en medio suplementado con 2,4D (2mg/L) y agua de coco (100 ml/L). Por otro lado, Quimbita (2011) reporto la formación de callo a los 28 y 50 días después de la introducción *in vitro* de los explantes de cotiledon de *Theobroma cacao* L. en medio suplementado con agua de coco (100ml/L), obteniendo 50% de formación de callo.

5.4 Inducción *in vitro* de callogenesis en pétalos

Los pétalos cultivados en medios con 2,4D y 6BAP formaron callo a los 50 días después de la introducción *in vitro*. Los resultados obtenidos en esta investigación difieren de los reportados por Chanatásig (2004), Cabrera (2011) y Mata (2013), quienes observaron las primeras formaciones de callo en pétalos de cacao a los 7 y 14 días de la introducción *in vitro* en medio de cultivo suplementado con 2,4D.

Por otro lado, en esta investigación los porcentajes de formación de callo para pétalos cultivados en medios suplementados con 2 y 4 mg/L de 6BAP fue de 100% y con 6 mg/L de 6BAP de 97%; mientras que, en medio suplementado con 2, 4 y 6 mg/L de 2,4D se obtuvo porcentajes de formación de callo de 77%, 60% y 47%. Estos resultados difieren de los reportados por Mata (2013), quien obtuvo porcentajes entre 20,9% y 100% de formación de callo para pétalos en medio suplementado con 2,4D. Asimismo, Cabrera (2011), obtuvo 100% y 85,7% de formación de callo en medios suplementados con 5mg/L 2,4D y 10 mg/L 2,4D respectivamente y reporto que concentraciones mayores a 10 mg/L de 2,4D disminuyen la formación de callo en explantes de pétalo.

Asimismo, en la presente investigación Se observó cambios en todos los explantes antes del inicio de la formación de callo, aumento en el volumen y engrosamiento en los bordes de los explantes, observaciones similares fueron reportadas por Cabrera (2011) y Chantásig (2004), sin embargo, este último reporto que no observo los cambios mencionados de manera uniforme en todos los genotipos con los que desarrollo su investigación, ya que los explantes de los genotipos que reporto con menor desarrollo de callo no presentaron aumento en su volumen.

Los pétalos presentan una respuesta más lenta a la callogénesis en comparación con los explantes de cotiledón, además, este último presenta mayores porcentajes de formación de callo cuando es cultivado en medios suplementados con 6BAP y 2,4D, mientras que, los pétalos presentan mayores porcentajes de formación de callo solo en medio de cultivo suplementado con 6BAP. Estos resultados corroboran lo reportado por Li *et al.*, (1998), Velásquez *et al.*, (2006), Chantásig (2004), Solano (2008), Monsalve *et al.* (2005) y Mata (2013), quienes afirman que la respuesta a la formación de callo en condiciones *in vitro* responde a la interacción de varios factores como: tipo de explante, tipo de fitorregulador y concentración utilizada.

5.5 Proliferación de callo en cotiledones y pétalos

En la presente investigación se obtuvo proliferación de callo a partir de explantes de cotiledón y pétalos en presencia de auxinas y citoquininas, lo que corrobora lo reportado por Von Arnold *et al.*, (2002) y George *et al.*, (2007), quienes afirman que se obtiene óptimos resultados en la proliferación de callo en medios suplementados con los mismos reguladores de crecimiento utilizados en el medio de inducción, que comúnmente son auxinas o citoquininas. Sin embargo, se observó que los medios suplementados con citoquininas (6BAP) favorecieron la

proliferación de callo en mayor proporción que el medio suplementado con auxinas (2,4D), estos resultados difieren de los reportados por Hidalgo (2014), que utilizó estaminoides de cacao y reporto la proliferación de callo en medios suplementados con 2,4D, logrando obtener callos de hasta 7,15mm, Asimismo, Díaz *et al.*, (2009), utilizaron estaminoides de cacao y reporto proliferación de callo en medio DKW utilizando una combinación de 2,4D, kinetina y agua de coco, logrando obtener callos de hasta 3,75mm de diámetro.

Por otro lado, Chanatásig (2004) evaluó la influencia de las citoquininas en la proliferación de callo formado a partir de pétalos de cacao, en medio de cultivo DKW suplementado con 6 BAP y Kinetina, obteniendo callos de hasta 6mm, por lo que concluyeron que sí existe influencia de las citocininas en la proliferación de callo. Otros autores como Mata (2013), Li *et al.* (1998) también reportaron a las citocininas como responsables de la proliferación de callo en explantes de diferentes genotipos de cacao. Estos resultados respaldan las observaciones de esta investigación, en la que se obtuvo mayor proliferación de callo en medio DKW suplementado con concentraciones de 2, 4 y 6 mg/L de 6BAP.

Las diferentes respuestas en la proliferación de callo en medios suplementados con citoquininas y auxinas, evidencian que la proliferación de callo no solo está ligada a la presencia de fitohormonas en el medio de cultivo, sino que cada genotipo de cacao presenta una respuesta diferente frente a una fitohormona determinada. Chanatásig (2004), evaluó la respuesta de diferentes genotipos y concluyó que la acción de las citoquininas no es independiente sino que hay una interacción con otros factores como el medio de cultivo, genotipo y tipo de explante. Díaz *et al.* (2009) e Hidalgo (2014) también evaluaron la proliferación de callo en diferentes genotipos y obtuvieron resultados diferentes para cada genotipo.

5.6 Evaluación de la viabilidad y presencia de gránulos de almidón en las células del callo

En esta investigación se obtuvo células embriogénicas a partir de callo friable de explantes de cotiledón y pétalos cultivados en medio DKW suplementado con 2, 4 y 6 mg/L 6BAP, las células embriogénicas obtenidas presentaron las siguientes características: viabilidad, forma redondeada y/o alargada, agrupadas en racimos y citoplasma denso con presencia de gránulos de almidón; estos resultados corroboran los reportados por Santana *et al.*, (2010), Cabrera (2011) y Chanatásig (2004), quienes observaron células embriogénicas en callo obtenido a partir de explantes de *Theobroma cacao* L. y las describieron como células que se presentan en conglomerados celulares, con citoplasma denso y gránulos de almidón. Asimismo, Levitus *et al.*, (2010) y Abdelnour *et al.*, (1994) describen a las células embriogénicas como células similares a las células meristemáticas debido a que no son demasiado voluminosas, generalmente agrupadas, que varían en tamaño y número y poseen citoplasma denso con pequeños granos de almidón.

Por otro lado, Jácome *et al.*, (2012), Ortega (2013), Chong *et al.*, (2007) y Santos *et al.*, (2002) observaron células embriogénicas en frutales y las describieron como células esféricas, en división constante, con un contenido citoplasmático denso y gránulos de almidón. Las características descritas por los autores citados constituyen indicadores del potencial embriogénico de las células y coinciden con los resultados obtenidos en esta investigación.

6. CONCLUSIONES

1. La formación de callo a partir de explantes de cotiledon fue de 97% a los 20 días de introducción *in vitro* en medio Driver y Kuniyuki suplementado con 4mg/L de 6 – Bencilaminopurina, 2mg/L y 4mg/L de 2,4-diclorofenoxiacético; mientras que, 100% de explantes de pétalo formaron callo a los 50 días en presencia de 2mg/L y 4mg/L de 6 – Bencilaminopurina.
2. La formación de callo friable con capacidad embriogénica en explantes de cotiledón y pétalos de *Theobroma cacao* L. variedad Criollo se dio en el medio Driver y Kuniyuki suplementado con 2 mg/L, 4 mg/L y 6 mg/L de 6 – Bencilaminopurina.
3. La mayor proliferación de callo friable se obtuvo en 80% de los explantes de cotiledón y en 67% de explantes de pétalos cultivados en medio Driver y Kuniyuki suplementado con 2mg/L de 6 – Bencilaminopurina.
4. El porcentaje de desinfección en explantes de cotiledón de *Theobroma cacao* L. variedad Criollo fue de 90% utilizando cloruro de mercurio al 0.1% por 20 minutos; mientras que en pétalos se obtuvo 100% de desinfección utilizando hipoclorito de sodio al 2% o cloruro de mercurio al 0.1% por 5,10 o 15 minutos.

7. RECOMENDACIONES

1. Evaluar diferentes medios de inducción para la obtención de callo *Theobroma cacao* L. variedad Criollo de la Región Piura
2. Evaluar diferentes medios para la proliferación de callo friable, considerando la cantidad de masa de callo desarrollada y el tiempo en el que se obtiene.
3. Continuar con la investigación con la finalidad de obtener embriones somáticos, estudiar las distintas etapas en su formación y lograr la regeneración de plántulas de *Theobroma cacao* L. variedad Criollo de la Región Piura.

8. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

- Abdelnour, A. y Vincent, J. (1994). Conceptos básicos del cultivo de tejidos vegetales. CATIE. Costa Rica.
- Adriazola, J. (2003). Producción del alimento de los dioses (*Theobroma cacao* L.). Universidad Nacional Agraria de la Selva. Tingo María, Perú.
- Afoakwa, E. O., Paterson, A., Fowler, M., y Ryan, A. (2008). Flavor formation and character in cocoa and chocolate: a critical review. *Critical reviews in food science and nutrition*, 48(9), 840-857.
- Anami, S. E., Mgtutu, A. J., Taracha, C., Coussens, G., Karimi, M., Hilson, P., ... Machuka, J. (2010). Somatic embryogenesis and plant regeneration of tropical maize genotypes. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 102(3), 285-295.
- Azofeifa, A. (2009). Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados *in vitro*. *Agronomía mesoamericana*, 20(1), 153-175.
- Cabrera, P. (2011). Formación de callos y establecimiento de suspensiones celulares en el cultivo de cacao (*Theobroma cacao* L.) (Tesis de Pregrado). Universidad de Granma, Cuba.
- Chanatásig, V. (2004). Inducción de la embriogénesis somática en clones superiores de cacao (*Theobroma cacao* L.), con resistencia a enfermedades fungosas. (Tesis de maestría). CATIE, Costa Rica.
- Chong, B., Gómez, R., Reyes, M., Bermúdez, I., Gallardo, J., Freire, M., ... Herrera, I. (2007). Comparación entre dos métodos de establecimiento de suspensiones celulares embriogénicas de banano cv. "Grande naine" (*Musa AAA*). *Biología Vegetal*, 7(2).

- Dias, L. (2001). Genetic Improvement of Cacao. Recuperado de <http://ecoport.org/ep?SearchType=earticleView&earticleId=197&page=-2#section2683>
- Díaz, A., Salazar, R. y Chirinos, M. (2009). Efecto del tamaño del botón floral sobre la inducción de embriones somáticos en cacao. *Agronomía Tropical*, 59(4), 481-489.
- Driver, J. y Kuniyuki, A.H. (1984). *In vitro* propagation of Paradox walnut rootstock. *HortScience*, 19, 507-509.
- Efombagn, I., Motamayor, J., Sounigo, O., Eskes, A., Nyassé, S., Cilas, C., ... Kolesnikova-Allen, M. (2008). Genetic diversity and structure of farm and GenBank accessions of cacao (*Theobroma cacao* L.) in Cameroon revealed by microsatellite markers. *Tree Genetics & Genomes*, 4(4), 821-831.
- Elhag, H., Whipkey, A. y Janick, J. (1988). Factors Affecting Asexual Embryogenesis Via Callus in *Theobroma cacao* L. *Agril. Biol Sci.* Vol. 6(1), pp. 31-43.
- Figueira A., y Janick J. (1993). Development of nucellar somatic embryos of *Theobroma cacao*. II International Symposium on *In Vitro* Culture and Horticultural Breeding 336 (pp. 231-238).
- Freire, S. (2003). Aspectos básicos de la embriogénesis somática. *Bioteología Vegetal* 3(4):195- 209.
- García, D., Mesa, N. y Ocampo, M. (2015). Standardization of the disinfection protocol for the micropropagation of *Aspidosperma polyneuron*. *Revista Colombiana de Bioteología*, 17(2), 76-84.
- García, L.F. (2000). Capítulo III Grupos y variedades de cacao. En: Arca B., M. (Ed.) *El Cultivo del Cacao en la Amazonía Peruana*. Presidencia de la Republica. Ministerio de Agricultura, Lima – Perú.

- George, E., Hall, M. y De Klerk, G. (2007). Plant propagation by tissue culture: volume 1. Springer Science & Business Media.
- Guiltinan M, Young A, Miller C, Antunez G, Swanson J, Pishak S. y Maxiova. S. (2003). Cacao tissue culture protocol book. USA Penn State University.
- Hardy F. (1961). Manual de cacao. Turrialba, Costa Rica.
- Hernández, Y. y González, M. (2010). Efectos de la contaminación microbiana y oxidación fenólica en el establecimiento *in vitro* de frutales perennes. Cultivos Tropicales. Ediciones INCA; 31(4):00–00.
- Hidalgo, C. (2014). Estudio preliminar para la obtención de explantes de cacao *Theobroma cacao* L. a través de embriogénesis somática.
- Jácome, J., Tatiana, P., Pedro, R., Cristian, R. y Cununyacu, A. (2012). Establecimiento, inducción y evaluación a callogénesis *in vitro* de meristemas apicales de árboles jóvenes de Romerillo (*Podocarpus oleifolius*) como futura estrategia de conservación de la especie en el Distrito Metropolitano de Quito (Tesis doctoral). Universidad Politécnica del Ejército. Ecuador.
- Kononowicz, H., Kononowicz, K., y Janick, J. (1984). Asexual embryogenesis via callus of *Theobroma cacao* L. Zeitschrift für Pflanzenphysiologie, 113(4), 347-358.
- Lanaud, C., Motamayor, J. y Risterucci, A. (2000). Implications of new insight into the genetic structure of *Theobroma cacao* L. for breeding strategies. INGENIC, 89-107.
- Leifert, C., Ritchie, J. y Waites, W. (1991). Contaminants of plant-tissue and cell cultures. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 7(4), 452-469.
- León, J. (2000). Botánica de los Cultivos Tropicales. 3a ed. San José, Costa Rica IICA. Editorial Agroamerica.

- Levitus, G., Echenique, V., Rubinstein, C., Hopp, E. y Mroginski, L. (2010). Biotecnología y mejoramiento vegetal II. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Argentina.
- Li, Z., Traore, A., Maximova, S., Gultinan, M. (1998). Somatic embryogenesis and plant regeneration from floral explants of cacao (*Theobroma cacao* L.) using thidiazuron. Springer;34(4):293–9.
- López, O., Bollon, H., Eskes, A., y Pétiard, V. (1993). Embryogenèse Somatique de cacaoyer (*Theobroma cacao* L.) à partir de Pièces Florales. Compte- Rendus de L'Académie de Sciences. 316: 579-584.
- Mata Quirós A. (2013). Evaluación de dos protocolos para la inducción de embiogénesis somática en clones de cacao (*Theobroma cacao* L.) seleccionados por el Programa de Mejoramiento Genético de Cacao del CATIE (Tesis de Maestría). CATIE, Costa Rica.
- Maximova S., Alemanno, L., Young, A., Ferriere, N., Traore A. y Gultinan, M. (2002). Efficiency, genotypic variability, and cellular origin of primary and secondary somatic embryogenesis of *Theobroma cacao* L. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*. Springer; 38(3):252–9.
- Monsalve, L., García, C. y Sigarroa, A. (2005) Obtención de embriones somáticos primarios de *Theobroma cacao* en clones de interés regional para el departamento Norte de Santander, Colombia. *Revista Respuestas*, 10(1), 21-29.
- Motamayor, J., Lachenaud, P., Mota, J., Loor, R., Kuhn, D., Brown, J. y Schnell, R. (2008). Geographic and genetic population differentiation of the Amazonian chocolate tree (*Theobroma cacao* L.). *PLoS one*, 3(10), e3311.

- Motamayor, J., Risterucci, A., Lopez, P., Ortiz, C., Moreno, A. y Lanaud, C. (2002). Cacao domestication I: the origin of the cacao cultivated by the Mayas. *Heredity*, 89(5), 380-386.
- Ndoumou, D., Ndzomo, G. y Niemenak, N. (1997). Phenol content, acidic peroxidase and IAA-oxidase during somatic embryogenesis in *Theobroma cacao* L. *Biologia plantarum*, 39(3), 337-347.
- Ortega, G., (2013). Inducción al proceso de callogénesis *In vitro* a partir de cotiledones y ejes embriogénicos de semillas madura de Guarango (*Cesalpinia spinosa*) como coadyuvante para su preservación en el Distrito Metropolitano de Quito (Tesis Pregrado). Escuela Politécnica del Ejército, Ecuador.
- Powis, T., Cyphers, A., Gaikwad N., Grivetti, L. y Cheong, K. (2011). Cacao use and the San Lorenzo Olmec. *Proc Natl Acad Sci USA*, 108(21):8595–8600.
- Quimbita, B. (2011). Efecto de la concentración de 2, 4-D y el tipo de explante en la formación de callos embriogénicos en el cultivo *in vitro* de cacao (*Theobroma cacao* L.) (Tesis Pregrado). Universidad de Granma, Cuba.
- Quiñones, J., Trujillo, R., Capdesuñer, Y., Quirós, Y. y Hernández, M. (2013). Potencial de actividad antioxidante de extractos fenólicos de *Theobroma cacao* L. (cacao). *Revista cubana de plantas medicinales*, 18(2), 201-215.
- Santos, A., López, J., Cabrera, M., Montano, N., Reinaldo, D., Ventura, J., ...Rayas, A. (2002). Obtención de embriones somáticos y establecimiento de suspensiones celulares embriogénicas en el cultivar de plátano "Navolean" (AAB). *Biotecnología vegetal*, 2(2).
- Santana, G., Velásquez, R. y Mata, J. (2010). Efecto de la fuente de carbono sobre la organogénesis y embriogénesis somática en cacao. *Agronomía Trop*, 60(2), 193-202.

- Solano, W. (2008). Embriogénesis somática en clones superiores de cacao (*Theobroma cacao* L.) obtenidos en el Programa de Mejoramiento Genético del CATIE (Tesis Doctoral). CATIE, Costa Rica.
- Sondahl, M., Chen, Z., Sereduk, T., Bellato, C., Liu, S. y Bragin, A. (1994). U.S. Patent No. 5,312,801. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Urrea, A., Atehortúa, L. y Gallego, A. (2011). Regeneration through somatic embryogenesis of an elite colombian *Theobroma cacao* L. variety. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 13(2), 39-50.
- Velásquez, R., Sandrea, Y., Betancourt, C., Mata, J. y García, F. (2006). Embriogénesis somática en cultivares de cacao Venezolanos. *Agronomía Tropical*, 56(1), 61-74.
- Von Arnold, S., Sabala, I., Bozhkov, P., Dyachok, J. y Filonova, L. (2002). Developmental pathways of somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. Springer, 69(3):233–49.
- Wood, G. (1985). History and Development. En Wood, G. y Lass R. (Ed.). *Cocoa* (pp. 22-30). Gran Bretaña: Blackwell Science.

9. ANEXOS

9.1 Tablas

Tabla 1. Composición del medio de cultivo DKW descrito por Driver y Kuniyuki (1984).

Componentes	Concentración mg/L
Macroelementos	
NH ₄ NO ₃	1416
MgSO ₄ . 7H ₂ O	740
CaCl ₂ . 2H ₂ O	149
KH ₂ PO ₄	265
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	1967
K ₂ SO ₄	1559
Microelementos	
H ₃ BO ₃	4.8
MnSO ₄ .4H ₂ O	33.5
Na ₂ MoO ₄ . 2H ₂ O	0.39
CuSO ₄ . 5H ₂ O	0.25
Zn(NO ₃) ₂ 6H ₂ O	8.6
Vitaminas	
Mio-inositol	200
Acido nicotínico	1
Tiamina	2
Glicina	2
Quelato de Hierro	
Na ₂ EDTA	45400
FeSO ₄ . 7H ₂ O	33800

Tabla 2. Tratamientos para inducción de callo en cotiledones

TRATAMIENTO	Medio	6BAP (mg/L)	2,4D (mg/L)
T1	DWK	2	-
T2	DWK	4	-
T3	DWK	6	-
T4	DWK	-	2
T5	DWK	-	4
T6	DWK	-	6

Tabla 3. Tratamientos para inducción de callo en pétalos

TRATAMIENTO	Medio	6BAP (mg/L)	2,4D (mg/L)
T1	DWK	2	-
T2	DWK	4	-
T3	DWK	6	-
T4	DWK	-	2
T5	DWK	-	4
T6	DWK	-	6

Tabla 4. Tratamientos de desinfección para cotiledones de *Theobroma cacao* L. var. Criollo.

TRATAMIENTO	Alcohol (°)	Tiempo de exposición (Seg)	Hipoclorito de Sodio (%)	Tiempo de exposición (min)	Cloruro de Mercurio (%)	Tiempo de exposición (min)
T1	70	40	3%	5 min	-	-
T2	70	40	3%	15 min	-	-
T3	70	40	3%	20 min	-	-
T4	70	40	-	-	0.1%	10 min
T5	70	40	-	-	0.1%	15min
T6	70	40	-	-	0.1%	20 min

Tabla 5. Tratamientos de desinfección para botones florales de *Theobroma cacao* L. var. Criollo.

TRATAMIENTO	Alcohol (°)	Tiempo de exposición (Seg)	Hipoclorito de Sodio (%)	Tiempo de exposición (min)	Cloruro de Mercurio (%)	Tiempo de exposición (min)
T1	70	40	2%	5 min	-	-
T2	70	40	2%	10 min	-	-
T3	70	40	2%	15 min	-	-
T4	70	40	-	-	0.1%	5 min
T5	70	40	-	-	0.1%	10 min
T6	70	40	-	-	0.1%	15 min

Tabla 6. Criterio de evaluación de las variables: Contaminación y fenolización en la desinfección de explantes *in vitro*.

VARIABLE	CRITERIO DE EVALUACIÓN
CONTAMINACIÓN	contaminado
	no contaminado
FENOLIZACIÓN	fenolizado
	no fenolizado

Tabla 7. Criterio de evaluación de la variable formación de callo en explantes de cotiledón y pétalo de *Theobroma cacao* L. var. Criollo.

VARIABLE	CRITERIO DE EVALUACIÓN
FORMACION DE CALLO	Presencia de callo
	Ausencia de callo

Tabla 8. Sistemas de desinfección en cotiledones *Theobroma cacao* L. var. Criollo.

Explantes contaminados y no contaminados	Tratamientos y tiempo de exposición al desinfectante					
	T1	T2	T3	T4	T5	T6
	5 min NaClO 3%	10 min NaClO 3%	15 min NaClO 3%	10 min HgCl 0.1%	15 min HgCl 0.1%	20 min HgCl 0.1%
Explantes no contaminados	15 (50,0 %)	16 (53,3%)	25 (83,3%)	21 (70,0%)	22 (73,0%)	27 (90,0%)
Explantes Contaminados	15 (50,0%)	14 (46,7%)	5 (16,7%)	9 (30,0%)	8 (27,0%)	3 (10,0%)
Total	30 (100,0%)	30 (100,0%)	30 (100,0%)	30 (100,0%)	30 (100,0%)	30 (100,0%)

Cada casilla indica el número de explantes; entre paréntesis, el porcentaje de explantes contaminados y no contaminado.

Tabla 9. Fenolización en cotiledones *Theobroma cacao* L. var. Criollo.

Explantes Fenolizados y no fenolizados	Tratamiento y tiempo de exposición al desinfectante					
	T1	T2	T3	T4	T5	T6
	5 min NaClO 3%	10 min NaClO 3%	15 min NaClO 3%	10 min HgCl 0.1%	15 min HgCl 0.1%	20 min HgCl 0.1%
Explantes no fenolizados	15 (50,0%)	5 (16,7%)	0 (0,0%)	28 (93,3%)	25 (83,3%)	23 (76,7%)
Explantes fenolizados	15 (50,0%)	25 (83,3%)	30 (100,0%)	2 (6,7%)	5 (16,7%)	7 (23,3%)
Total	30 (100,0%)	30 (100,0%)	30 (100,0%)	30 (100,0%)	30 (100,0%)	30 (100,0%)

Cada casilla indica el número de explantes; entre paréntesis, el porcentaje de explantes fenolizados y no fenolizados

Tabla 10. Formación de callo en cotiledones *Theobroma cacao* L. var. Criollo.

Formación de callo	Tratamiento y Concentración de la hormona					
	T1	T2	T3	T4	T5	T6
	6 BAP 2mg/L	6 BAP 4mg/L	6 BAP 6mg/L	2,4D 2 mg/L	2,4D 4mg/L	2,4D 6mg/L
Ausencia de callo	2 (6,7%)	1 (3,3%)	2 (6,7%)	1 (3,3%)	1 (3,3%)	3 (10,0%)
Presencia de callo	28 (93,3%)	29 (96,7%)	28 (93,3%)	29 (96,7%)	29 (96,7%)	27 (90,0%)
Total	30 (100,0%)	30 (100,0%)	30 (100,0%)	30 (100,0%)	30 (100,0%)	30 (100,0%)

Cada casilla indica el número de explantes; entre paréntesis, el porcentaje de explantes con presencia o ausencia de callo

Tabla 11. Estado de desarrollo de la formación de callo en cotiledones de *Theobroma cacao* L. var. Criollo.

Estadio de proliferación callo	Tratamiento y concentración de la hormona					
	T1	T2	T3	T4	T5	T6
	6 BAP 2mg/L	6 BAP 4mg/L	6 BAP 6mg/L	2,4D 2 mg/L	2,4D 4mg/L	2,4D 6mg/L
E0	2 (7%)	1 (3%)	2 (7%)	1 (3%)	1 (3%)	3 (10%)
E1	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	12 (40%)	18 (60%)	22 (73%)
E2	8 (27%)	11 (37%)	12 (40%)	17 (57%)	11 (37%)	5 (17%)
E3	20 (67%)	18 (60%)	16 (53%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Total	30 (100,0%)	30 (100,0%)	30 (100,0%)	30 (100,0%)	30 (100,0%)	30 (100,0%)

Cada casilla indica el número de explantes; entre paréntesis, el porcentaje de explantes en cada Estadio de Proliferación de callo.

Tabla 12. Formación de callo en pétalos de *Theobroma cacao* L. var. Criollo.

Formación de callo	Tratamiento y concentración de la hormona					
	T1	T2	T3	T4	T5	T6
	6 BAP 2mg/L	6 BAP 4mg/L	6 BAP 6mg/L	2,4D 2 mg/L	2,4D 4mg/L	2,4D 6mg/L
Ausencia de callo	0 (0,0%)	0 (0,0%)	1 (3,3%)	7 (23,3%)	12 (40,0%)	16 (53,3%)
Presencia de callo	30 (100,0%)	30 (100,0%)	29 (96,7%)	23 (76,7%)	18 (60,0%)	14 (46,7%)
Total	30 (100,0%)	30 (100,0%)	30 (100,0%)	30 (100,0%)	30 (100,0%)	30 (100,0%)

Cada casilla indica el número de explantes; entre paréntesis, el porcentaje de explantes con presencia o ausencia de callo

Tabla 13. Estadio de desarrollo de la formación de callo en pétalos de *Theobroma cacao* L. var. Criollo.

Estados de desarrollo de callo	Concentración de la hormona					
	T1	T2	T3	T4	T5	T6
	6 BAP 2mg/L	6 BAP 4mg/L	6 BAP 6mg/L	2,4D 2 mg/L	2,4D 4mg/L	2,4D 6mg/L
E0	0 (0%)	0 (0%)	1 (3%)	7 (23%)	12 (40%)	16 (53%)
E1	0 (0%)	0 (0%)	1 (3%)	1 (3%)	12 (40%)	9 (30%)
E2	6 (20%)	22 (73%)	21 (70%)	12 (40%)	6 (20%)	5 (17%)
E3	24 (80%)	8 (27%)	7 (23%)	10 (33%)	0 (0%)	0 (0%)
Total	30 (100,0%)	30 (100,0%)	30 (100,0%)	30 (100,0%)	30 (100,0%)	30 (100,0%)

Cada casilla indica el número de explantes; entre paréntesis, el porcentaje de explantes en cada Estadio de Proliferación de callo.

9.2 Figuras

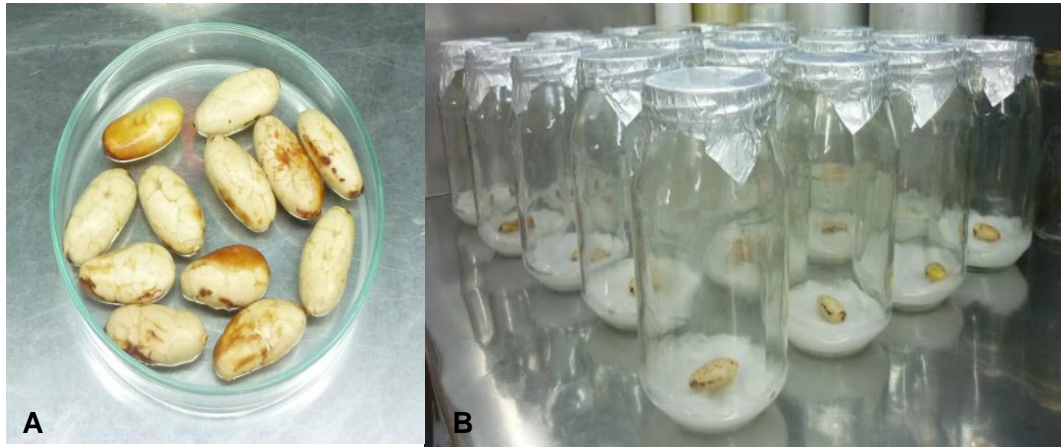


Figura 1. A, Semillas de *Theobroma cacao*. B, Germinación *in vitro* de *Theobroma cacao*.

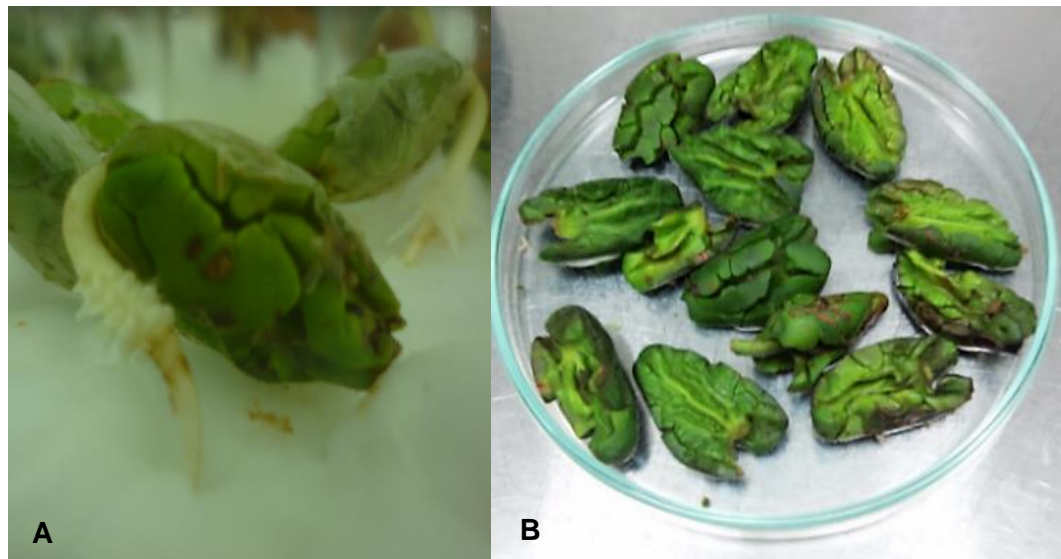


Figura 2. A, Plántula germinada de *Theobroma cacao*. B, Cotiledones.

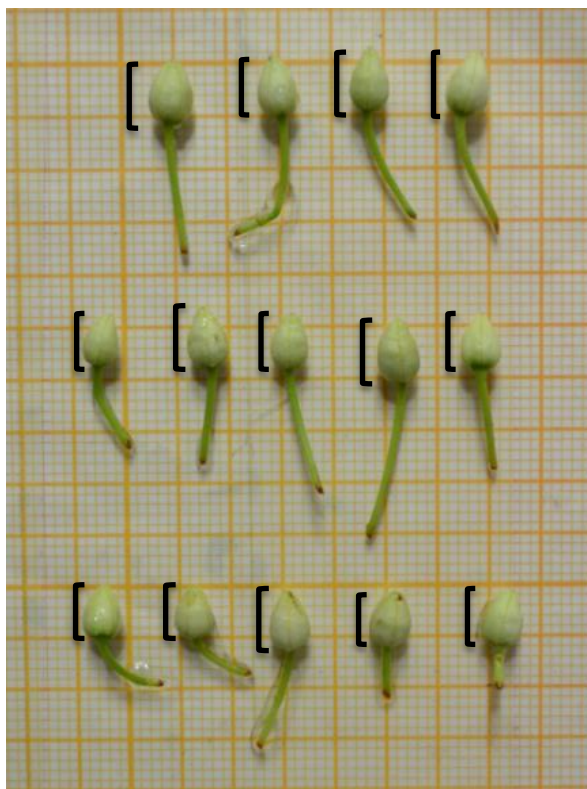


Figura 3. Botones florales de *Theobroma cacao* entre 5 mm – 6 mm de tamaño

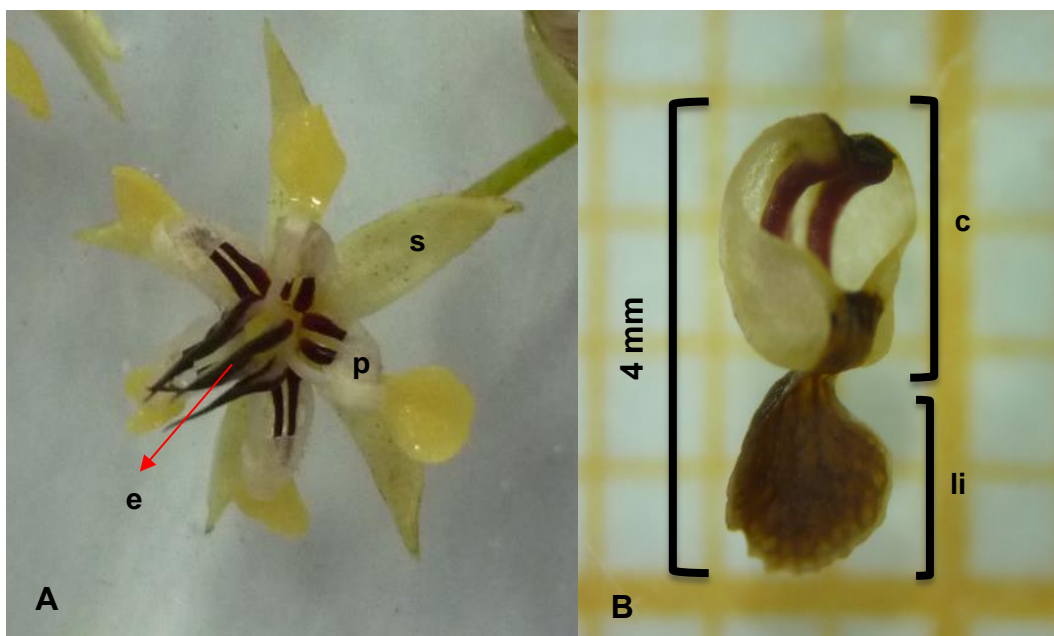


Figura 4. A. Botón floral de *Theobroma cacao*. s, sépalos. p, pétalos. e, estaminodios. B, pétalo de *Theobroma cacao*. c, coagulla. li, limbo.

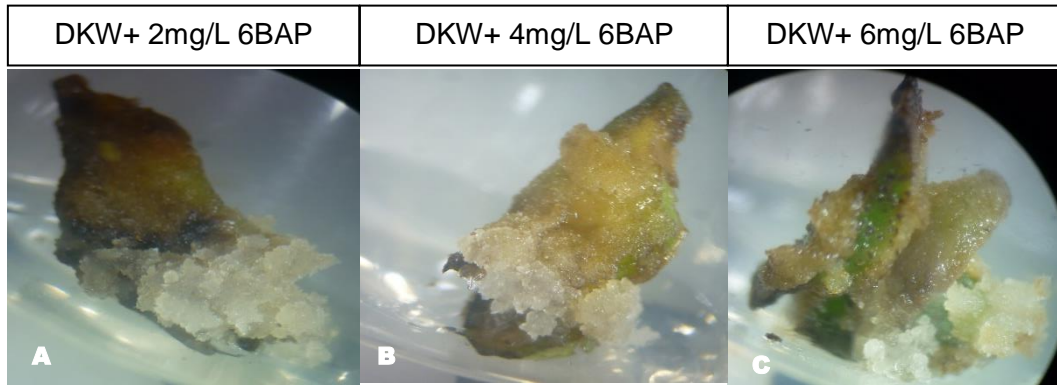


Figura 5. Formación de callo en explantes de cotiledón a los 20 días de su introducción *in vitro* en medio DKW en presencia de 6BAP.

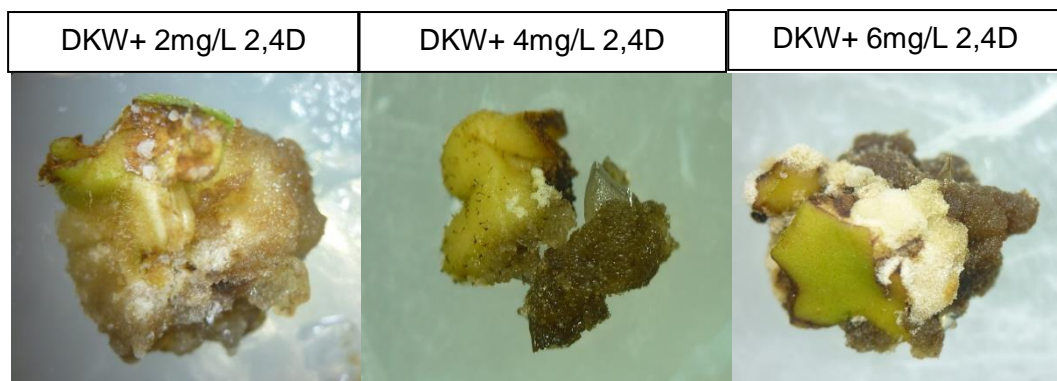


Figura 6. Formación de callo en explantes de cotiledón a los 20 días de su introducción *in vitro* en presencia de 2,4D

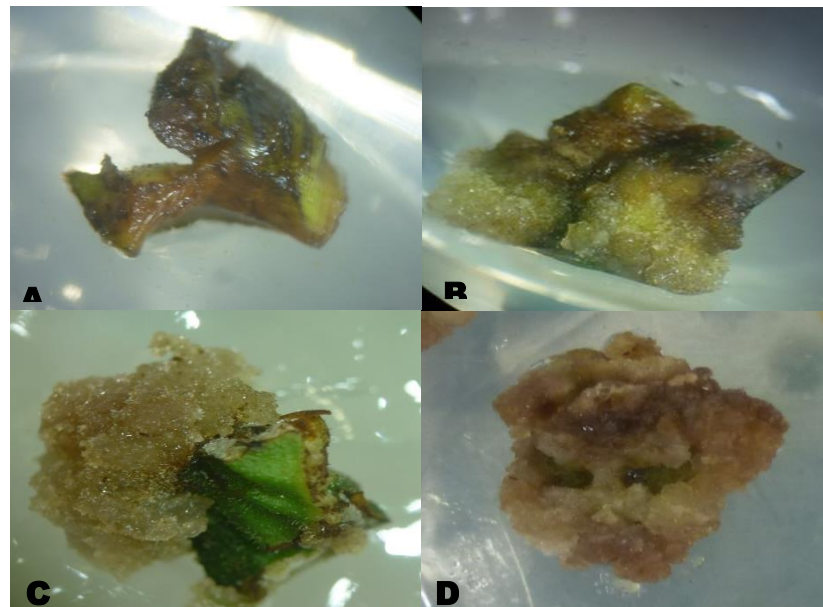


Figura 7. Estado de proliferación de callo en explantes de cotiledón. A, Estado de Proliferación 0. B, Estado de Proliferación 1. C, Estado de Proliferación 2. D, Estado de Proliferación 3.

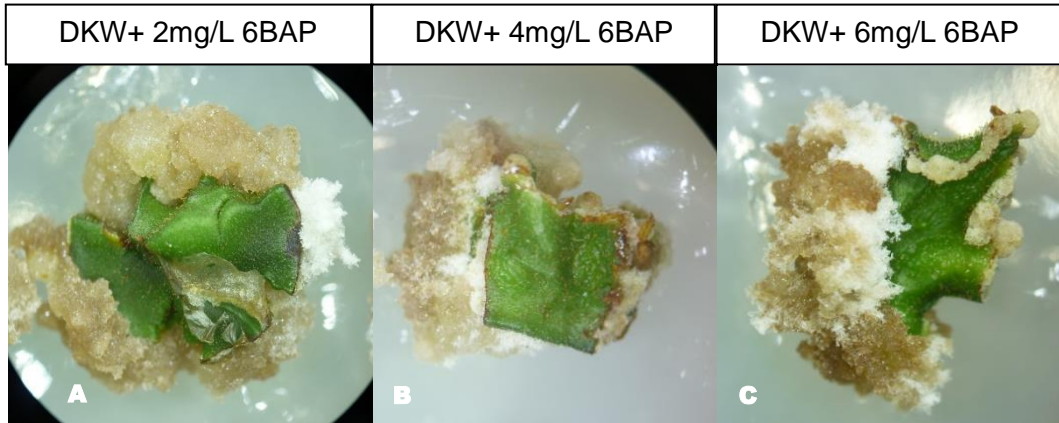


Figura 8. Callo en explantes de cotiledon 50 días después de su introducción *in vitro* en presencia de 6BAP.

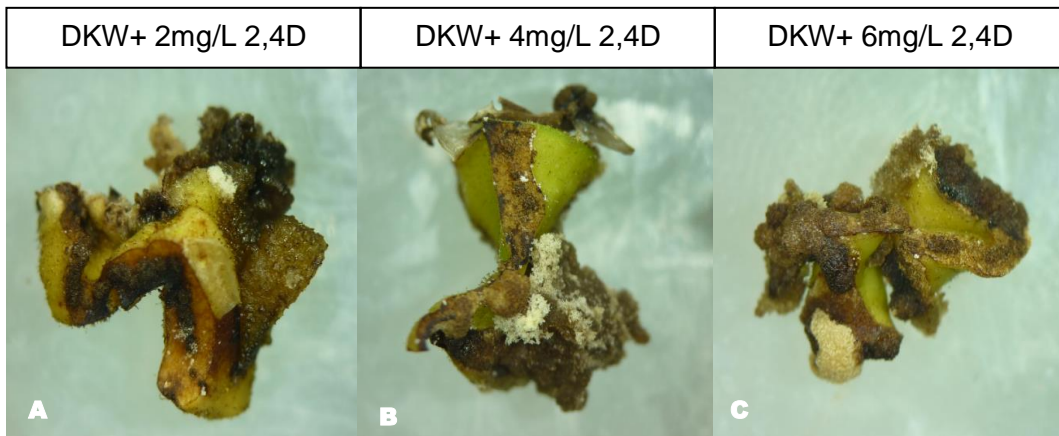


Figura 9. Callo en explantes de cotiledon 50 días después de su introducción *in vitro* en presencia de 2,4D.

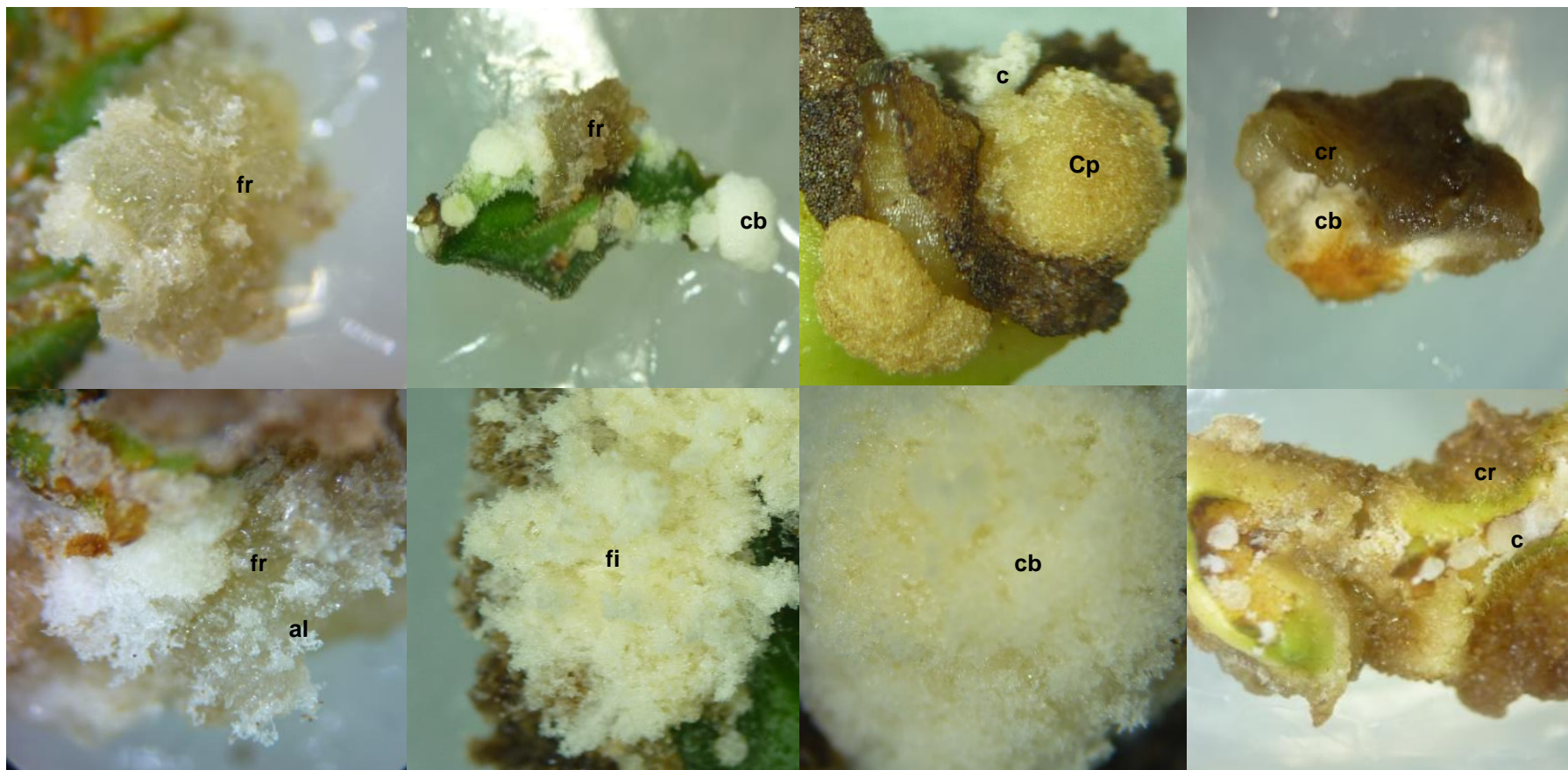


Figura 10. Tipos de callo fomados a partir de explantes de cotiledón. fr, callo friable. cb, callo compacto blanco. cp, callo compacto pardo cr, callo cremoso. al, células alargadas de callo friable. fi, callo blanco con formaciones alargadas.

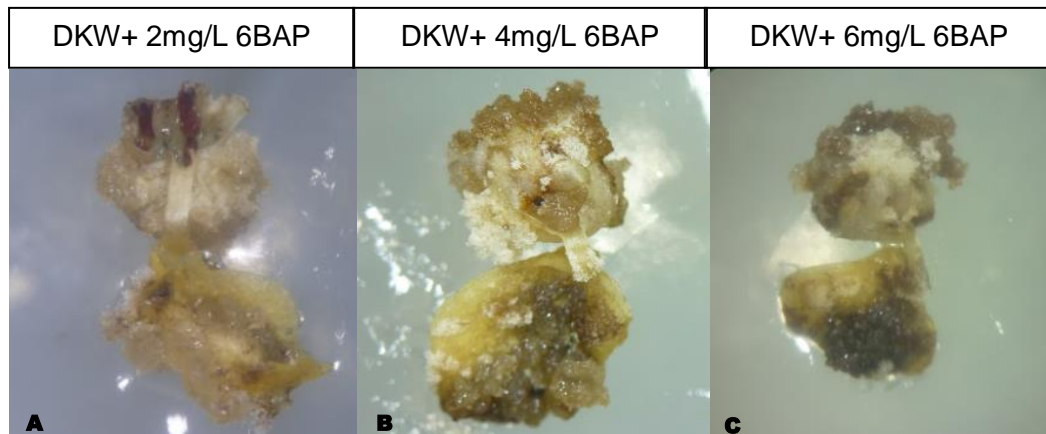


Figura 11. Formación de callo en pétalos a los 50 días de su introducción *in vitro* en presencia de 6BAP.

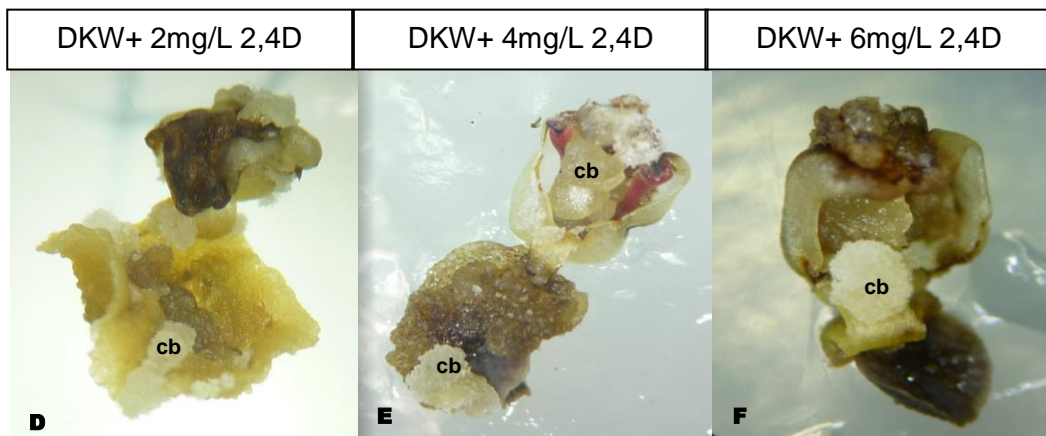


Figura 12. Formación de callo en pétalos a los 50 días de su introducción *in vitro* en presencia de 2,4D. cb, formaciones redondeadas de callo compacto blanco.

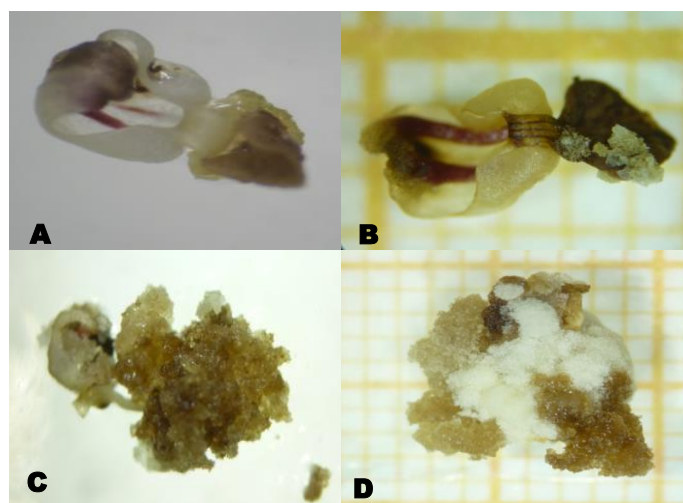


Figura 13. Estado de proliferación de callo en pétalos. A, Estado de Proliferación 0. B, Estado de Proliferación 1. C, Estado de Proliferación 2. D, Estado de Proliferación 3

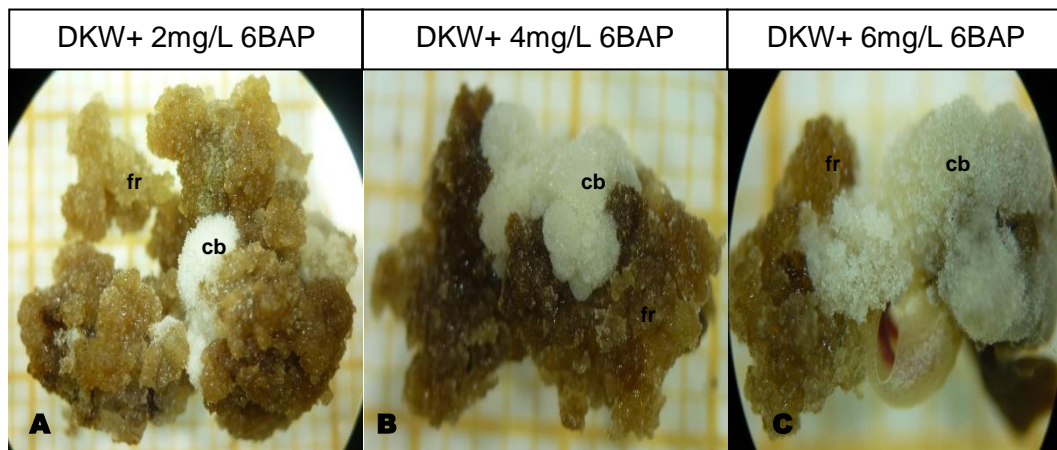


Figura 14. Callo en pétalos 80 días después de su introducción *in vitro* en presencia de 6BAP. fr, callo friable. cb, callo compacto blanco.

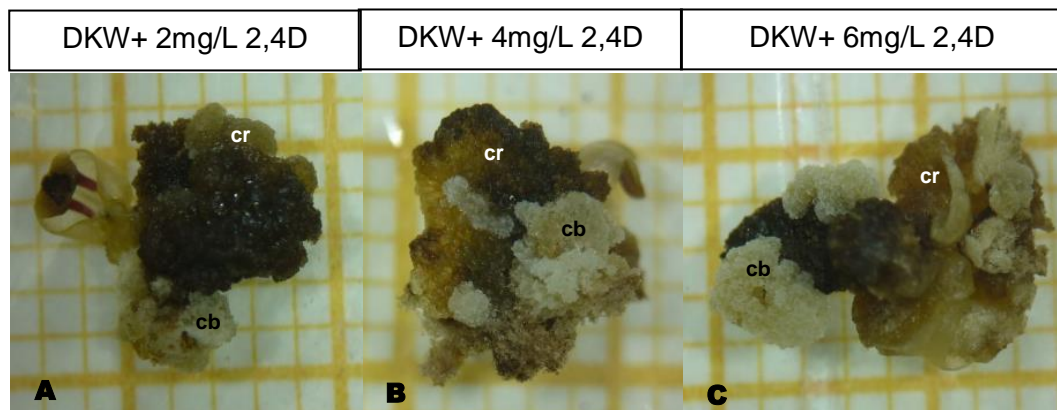


Figura 15. Callo en pétalos 80 días después de su introducción *in vitro* en presencia de 2,4D. cr, callo cremoso. cb, callo compacto blanco. crn, callo cremoso necrosado.



Figura 16. Tinción con azul de Evans al 0.5% de células de callo friable y compacto (400X). A. Células de callo compacto. nv, células no viables. B Células de callo friable. v, Células viables con inclusiones citoplasmáticas.

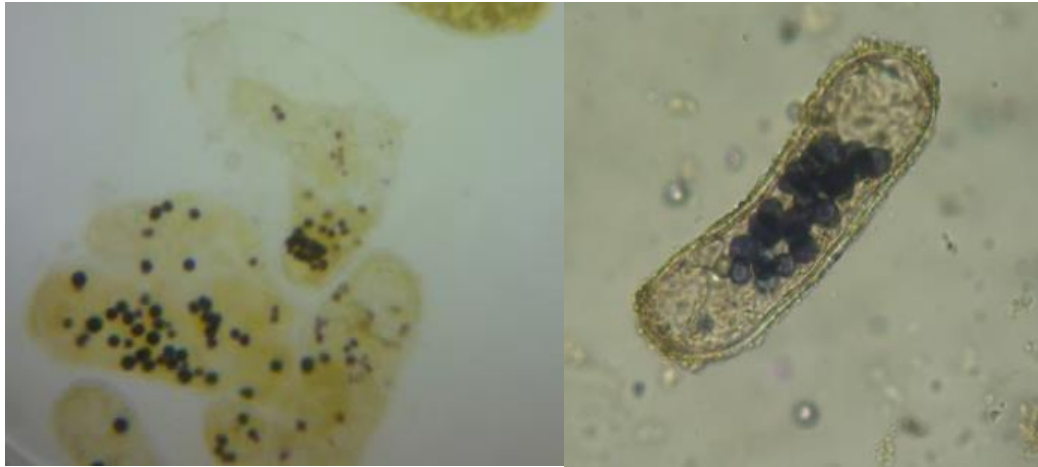


Figura 17. Células embriogénicas teñidas con lugol (400X). A. Conglomerado de células embriogénicas. B Célula embriogénica con gránulos de almidón en el citoplasma

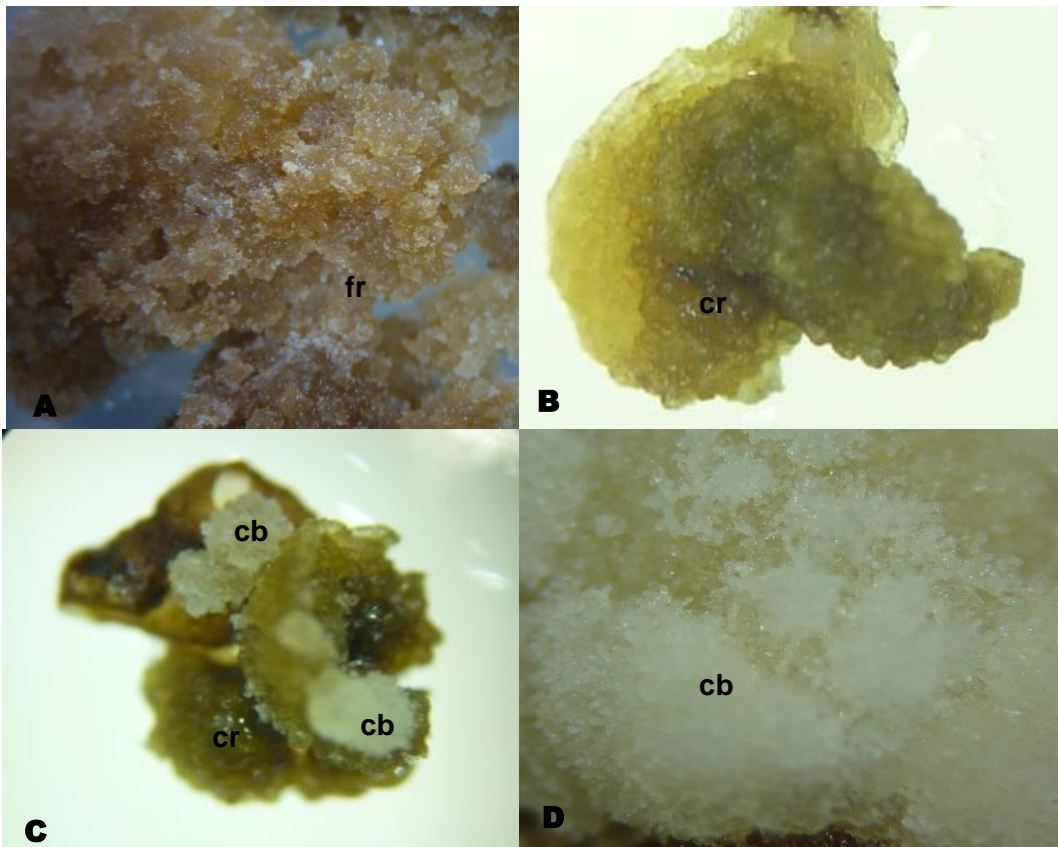


Figura 18. Tipos de callo formados a partir de pétalos. fr, callo friable. cb, callo compacto blanco. cr, callo cremoso.