

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
CENTRO UNIVERSITARIO DEL SUR OCCIDENTE  
INGENIERIA EN AGRONOMÍA TROPICAL**



**TRABAJO DE GRADUACIÓN**

**Evaluación de combinaciones de Benciladenina y de ácido 2,4  
diclorofenoxiacético, para la inducción de callo friable a partir de cotiledones de  
*Theobroma cacao* L., Malvaceae “cacao criollo”, en cultivo *In vitro*.**

**T.P.A. Sadrác Neftaly Cifuentes Gramajo  
Carné 201441302**

**Mazatenango, octubre de 2020.**

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
CENTRO UNIVERSITARIO DEL SUR OCCIDENTE  
INGENIERIA EN AGRONOMÍA TROPICAL**



**TRABAJO DE GRADUACIÓN**

**Evaluación de combinaciones de Benciladenina y de ácido 2,4  
diclorofenoxiacético, para la inducción de callo friable a partir de cotiledones de  
*Theobroma cacao* L., Malvaceae “cacao criollo”, en cultivo *In vitro*.**

**T.P.A. Sadrác Neftaly Cifuentes Gramajo  
Carné 201441302**

**M.Sc. Martín Salvador Sánchez Cruz  
Asesor**

**Mazatenango, octubre de 2020.**

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA**  
**CENTRO UNIVERSITARIO DE SUROCCIDENTE**

Ing. Murphy Olimpo Paiz Recinos

Rector

Arq. Carlos Enrique Valladares Cerezo

Secretario General

**MIEMBROS DEL CONSEJO DIRECTIVO DEL CENTRO UNIVERSITARIO DE  
SUROCCIDENTE**

Dr. Guillermo Vinicio Tello Cano

Director

**REPRESENTANTES DE PROFESORES**

Dr. Reynaldo Humberto Alarcón Noguera

Secretario

Lic. Luis Carlos Muñoz López

Vocal

**REPRESENTANTE GRADUADO DEL CUNSUROC**

Lic. Vilser Josvin Ramírez Robles

Vocal

**REPRESENTANTES ESTUDIANTILES**

T.P.A. Angélica Magaly Domínguez Curiel

Vocal

PEM y TAE Rony Roderico Alonzo Solís

Vocal

## **COORDINACIÓN ACADÉMICA**

M.Sc. Héctor Rodolfo Fernández Cardona  
Coordinador Académico

M.Sc. Rafael Armando Fonseca Ralda  
Coordinador Carrera de Licenciatura en Administración de Empresas

Lic. Edín Aníbal Ortíz Lara  
Coordinador Carrera de Licenciatura en Trabajo Social

Ph.D. René Humberto López Cotí  
Coordinador de las Carreras de Pedagogía, Administración Educativa y  
Psicopedagogía

M.Sc. Víctor Manuel Nájera Toledo  
Coordinador Carrera de Ingeniería en Alimentos

M.Sc. Erick Alexander España Miranda  
Coordinador Carrera de Ingeniería en Agronomía Tropical

M.Sc. Karen Rebeca Pérez Cifuentes  
Coordinadora Carrera de Ingeniería en Gestión Ambiental Local

M.Sc. José David Barrillas Chang  
Coordinador Carrera de Licenciatura en Ciencias Jurídicas  
y Sociales, Abogacía y Notariado

Lic. José Felipe Martínez Domínguez  
Coordinador de Área Social Humanista

### **CARRERAS PLAN FIN DE SEMANA**

M.Sc. Tania Elvira Marroquín Vásquez  
Coordinadora de las Carreras de Pedagogía

Lic. Heinrich Herman León  
Coordinadora Carrera de Periodista Profesional y  
Licenciatura en Ciencias de la Comunicación

## **AGRADECIMIENTOS**

### **A mi madre**

Por ser mi apoyo incondicional durante el tiempo que tengo de vida, porque a pesar de que muchas veces no ha estado de acuerdo con mis decisiones o las elecciones que he tomado, siempre está ahí dispuesta a apoyarme.

### **A mis hermanos**

Porque a pesar de no tener el apoyo de un padre, ellos me han apoyado económicamente cada vez que lo he necesitado sin cuestionarme, lo cual para mi no solo es una muestra de amor si no una muestra de confianza.

### **A mis amigos**

Por estar cada uno de ellos en momentos diferentes de la vida y motivarme e inspirarme a seguir adelante, porque muchos de ellos y ellas me han dado palabras de aliento cuando he querido detenerme.

### **A mis catedráticos**

Por haberme impartido sus conocimientos, por el tiempo y la paciencia. Porque algunos fueron más allá de solo dar clase, sino que también me inspiraron a seguir adelante.

### **A mi universidad**

A la gloriosa y tricentenaria Universidad de San Carlos de Guatemala con sede en Mazatenango, Suchitepéquez. Porque me dio la oportunidad de unirme a la facultad de Agronomía.

### **A el Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícola**

Por permitirme usar el laboratorio de biotecnología para poder llevar a cabo la presente investigación.

## DEDICATORIA

Dedico mi trabajo de graduación a Randy, quién es para mí un hijo. Se la dedico porque es hoy en día el ser más querido que tengo, he visto como lo ha perdido todo y a pesar de eso él nunca ha perdido su sentido del humor. He estado ahí para sostenerlo y no importa que pase siempre quiero estar para apoyarlo, sin importar cuales sean sus decisiones en el futuro.

Él es mi fuente de inspiración para terminar la licenciatura, si algún día lee este documento quiero que sepa: Que nunca me he considerado inteligente, que la mayoría de veces no he entendido las cosas, pero que he aprendido que cuando uno no tiene la facilidad para aprender o adquirir algún conocimiento, lo importante es ser constante. Algo que también se debe hacer es rodearse de personas que nos inspiren y apoyen, porque muchas veces los problemas nublan nuestra mente y evitan que podamos aprender.

## ÍNDICE GENERAL

CONTENIDO	PÁGINA
RESUMEN .....	vi
ABSTRAC .....	vii
I. INTRODUCCIÓN .....	1
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	2
III. JUSTIFICACIÓN.....	4
IV. MARCO TEÓRICO .....	5
1. Marco Conceptual .....	5
1.1. Origen de la planta <i>Theobroma cacao</i> L. ....	5
1.2. Historia del <i>T. cacao</i> en Guatemala .....	5
1.3. Cacao de tipo criollo.....	5
1.4. Taxonomía .....	6
1.5. Importancia económica del cacao criollo.....	6
1.6. Cultivo de tejidos .....	6
1.7. Componentes inorgánicos del medio MS .....	7
1.8. Componentes orgánicos del medio MS.....	7
1.9. Hormonas vegetales .....	7
1.10. Ingredientes complejos.....	8
2. Marco Referencial .....	9
2.1. Cacaos criollos de Agrocadena El Patriarca .....	9
2.2. Variabilidad genética del <i>T. cacao</i> .....	9
2.3. Propagación asexual de <i>T. cacao</i> .....	9
2.4. Inducción de callos friables .....	9
2.5. Que es embriogénesis somática .....	10
2.6. Embriogénesis somática en <i>T. cacao</i> .....	10
2.7. Antecedentes “Inducción de callo en <i>T. cacao</i> de tipo forastero” .....	10
V. OBJETIVOS.....	12
1. Objetivo general .....	12

2.	Objetivos específicos.....	12
VI.	HIPÓTESIS.....	13
1.	Hipótesis para la variable de respuesta peso de callo.....	13
VII.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	14
1.	Materiales.....	14
1.1.	Equipo de laboratorio.....	14
1.2.	Medio Murashige and Skoog (MS).....	14
2.	Metodología.....	14
2.1.	Desinfección y esterilización de los materiales, equipo y cristalería.....	14
2.2.	Preparación de soluciones madre.....	15
2.3.	Preparación del medio de cultivo Murashige & Skoog.....	15
2.4.	Formulación de soluciones madre para el medio Murashige & Skoog.....	16
2.5.	Obtención de frutos de <i>T. cacao</i> .....	17
2.6.	Manejo de frutos.....	17
2.7.	Extracción y preparación de los cotiledones de semillas de <i>T. cacao</i> .....	17
2.8.	Siembra de tejidos para cultivo <i>In vitro</i> .....	18
3.	Ubicación del experimento.....	18
4.	Material experimental.....	18
4.1.	Manejo del experimento.....	19
4.2.	Diseño experimental.....	19
4.3.	Modelo estadístico.....	19
4.4.	Unidad experimental.....	20
4.5.	Tratamientos y aleatorización.....	20
4.6.	Grados de libertad.....	21
4.7.	Croquis del experimento.....	21
4.8.	Variables de respuesta.....	21
4.9.	Análisis de la información.....	22
VIII.	PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	23
1.	Pruebas en blanco para inducir callo en material de <i>T. cacao</i> criollo.....	23
2.	Peso de callo.....	26

3.	Volumen de callo en ml .....	29
IX.	CONCLUSIONES .....	34
X.	RECOMENDACIONES.....	35
XI.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	36
XII.	ANEXOS.....	39

## ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO	PÁGINA
1. Taxonomía de <i>T. cacao</i> L. Sistema APG IV (2016). .....	6
2. Fitohormonas empleadas para la inducción de callo no friable a partir de cotiledones de <i>T. cacao</i> . .....	11
3. Cálculos para la preparación de soluciones madre.....	16
4. Factores a evaluar para la inducción de callo friable en <i>T. cacao</i> . .....	20
5. Croquis del experimento inducción de callo en friable en <i>T. cacao</i> . .....	21
6. Resultados obtenidos del peso de callo friable. ....	27
7. Análisis de varianza para la variable peso de callo. ....	28
8. Comparador de medias para la variable peso de callo. ....	28
9. Comparación de medias del factor B dentro del nivel 2 del factor A. ....	29
10. Resultados obtenidos del volumen de callo friable. ....	30
11. Análisis de varianza para la variable volumen de callo. ....	31
12. Comparador de medias para la variable volumen de callo.....	31
13. Comparación de medias del factor B dentro del nivel 2 del factor A. ....	32
14. Componentes de medio de cultivo Murashige and Skoog. ....	39
15. Resultados de peso y volumen de callo friable sin modificar. ....	41

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>FIGURA</b>	<b>PÁGINA</b>
1. En una gradilla se colocaron los 48 tratamientos debidamente etiquetados. ....	19
2. Todos los tratamientos presentaron contaminación por bacterias. ....	23
3. Cultivo <i>In vitro</i> de <i>T. cacao</i> en medio líquida con rotación (A) y medio sólido estático (B). ....	24
4. Cambio del tejido de color blanco a verde durante la primera semana en oscuridad. ....	25
5. Tipos de callo formado en el tejido cotiledonar de <i>T. cacao</i> . ....	26
6. Siembra de las escisiones del cotiledón blanco de <i>T. cacao</i> criollo en las instalaciones del ICTA. ....	40
7. Callo formado 15 días después de la siembra. ....	40
8. Callo friable formado 30 días después de la siembra. ....	40

## RESUMEN

En la investigación se evaluó la combinación de dos fitohormonas, la citocinina Benciladenina (BAP) y la auxina ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D), las cuales actúan como reguladores de crecimiento, con el propósito de determinar que concentración provoca mayor formación de callo friable, a partir de escisiones de cotiledón de *T. cacao* de tipo criollo empleando el método de propagación denominado cultivo *In vitro*.

Se aplicaron 16 tratamientos preparados a base del medio Murashige and Skoog sólido más 10% de agua de coco, las concentraciones evaluadas fueron para la citocinina BAP (0.00, 0.01, 0.02 y 0.03 mg/l) y para la auxina 2,4-D (0.00, 0.05, 0.10 y 0.15 mg/l).

Se aceptó la hipótesis alternativa para los factores A (concentraciones de citocinina BAP) y B (concentraciones de auxina 2,4-D), tanto para la variable de respuesta peso de callo como la para variable de respuesta volumen de callo, lo que indica que por lo menos una interacción presenta un volumen y peso de callo diferente. Por lo tanto, se realizó una prueba de TUKEY al 1%, para ambas variables de respuesta.

Al realizar la prueba de TUKEY, se determinó que el tratamiento siete en el cual se combinaron 0.01 mg/l de citocinina y 0.10 mg/l de auxina y que es el testigo relativo, presentó un mayor peso 1.32 mg y un mayor volumen 2.31 ml de callo friable. También se comprobó que es indispensable la combinación de BAP y 2,4-D para producir callo friable, lo que se logra, aunque la combinación este en bajas concentraciones.

## ABSTRAC

The research evaluated the combination of two phytohormones, cytokinin Benzyladenine (BAP) and auxin 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), which act as growth regulators, in order to determine what higher provocative concentration friable callus formation, from cotyledon cleavages of Creole type T. cacao using the propagation method called In vitro culture.

16 treatments prepared based on Murashige medium and solid Skoog plus 10% coconut water were applied, the evaluations evaluated were for cytokinin BAP (0, 0.01, 0.02 and 0.03 mg / l) and for auxin 2,4-D (0, 0.05, 0.1 and 0.15 mg / l).

The alternative hypothesis for factors A (concentrations of cytokinin BAP) and B (auxin concentrations 2,4-D) is accepted, both for the callus weight response variable and the callus volume response variable, which indicates that at least one of the interactions has a different volume and weight of callus. Therefore, a 1% TUKEY test was performed for both response variables.

When performing the 1% TUKEY test, it was determined that treatment seven in which 0.01 mg / l of cytokinin and 0.1 mg / l of auxin were combined and that is the relative control, presented a higher weight of 1.32 mg and a higher volume 2.31 ml of friable callus. It was also proven that the combination of BAP and 2,4-D is essential to produce friable callus, which is achieved, although the combination is in low quantities.

## I. INTRODUCCIÓN

En la Costa Sur de Guatemala, durante los años 50 el *T. cacao* fue uno de los cultivos que tomó mucho auge, pero el incremento de la demanda en el mercado provocó que el cacao de tipo criollo fuera sustituido por híbridos provenientes de Costa Rica y Nicaragua, por tener un mayor rendimiento. Tiempo después entró en auge el cultivo de café, por lo que muchos agricultores abandonaron el cultivo de *T. cacao*, el que fue desapareciendo (López, 1991).

Actualmente la demanda de cacao en el mercado internacional se mantiene en continuo crecimiento, siendo los cacaos más demandados los de tipo criollo, por sus características organolépticas. En el año 2013 se estableció un jardín clonal de *T. cacao* de tipo criollo en la Granja experimental docente Zahorí del CUNSUROC, con materiales colectados en los departamentos de Alta Verapaz, Izabal, Petén, Suchitepéquez y el Quiché, con el fin de rescatarlos (Otzoy, 2008). El hallazgo más reciente se da en el presente año en el cual se logró la determinación de materiales de cacao criollo (cotiledón blanco) en la parcela Patriarca 1 en San Bernardino Suchitepéquez, de Agrocadena El Patriarca, en dicha actividad se determinaron tres árboles de material criollo (Cifuentes, 2019).

Para poder competir con un chocolate de calidad, es necesario tener plantaciones de calidad, misma que es atribuida a los cacaos criollos, pero debido a la escases de materiales, la clonación por medio de propagación *In vitro* constituye una opción viable para reproducir *T. cacao*, pues permitirá conservar materiales criollos y a su vez realizar estudios de mejoramiento genético. Por lo que en esta investigación se presenta el protocolo para inducir callo friable, empleando el medio de cultivo MS (Murashige and Skoog) sólido, más 10% de agua de coco y las fitohormonas BAP y 2,4-D.

## II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Agrocadena El Patriarca es un proyecto Agroecológico. En el que uno de sus ejes principales, es la potencialización del cultivo de *T. cacao* de tipo criollo, sin embargo, dentro de la parcela Patriarca 1, solo cuenta con tres árboles de este material, clasificados así por sus características físicas y morfológicas, los cuales poseen de 5 a 15 frutos con medidas de 15 cm de largo y 11 cm de diámetro en promedio. Estos materiales de tipo criollo son muy difíciles de encontrar en Guatemala (Otzoy, 2008). Han sido pocas las investigaciones que se han hecho dentro del país, con respecto al rescate de estos materiales, por lo que se desean rescatar propagándolos a través del cultivo *in vitro* de tejidos.

El cultivo de tejidos de *T. cacao* es difícil, actualmente los proyectos de investigación se han centrado en la propagación *In vitro* empleando pétalos y estaminodios como tejido, para inducir la formación de callos friables con los cuales se induce la embriogénesis somática (Calderón & Montes, 2017). Sin embargo en el laboratorio de Biotecnología del CUNSUROC en una experiencia previa se observó que la combinación de las citocininas BAP 0.01 mg/l con 2,4-D 0.10 mg/l causan abundante proliferación de callo no friable, en el medio de cultivo sólido Murashige & Skoog modificado con 10% de agua de coco, a partir de escisiones de cotiledón de *T. cacao* de tipo forastero (Sánchez, 2019). Lo que es relevante debido a que en los protocolos actuales el volumen de callo logrado es bajo.

Los protocolos actuales de propagación clonal del *T. cacao*, inducen la embriogénesis mediada por callo a partir de explantes de pétalos o de estaminodios, pero el callo inducido es pequeño y por lo tanto el número de plantas formadas es bajo, el cual es de 20 plantas por estaminodio (Versión Beta, 2013). Teniendo la experiencia previa de haber obtenido abundante callo no friable en medio sólido a partir de un material de *T. cacao* de tipo forastero y que no existe más información sobre la inducción de callo friable a partir de escisiones de cotiledón la pregunta siguiente es: ¿Se puede inducir la formación de callo friable, a partir de escisiones de cotiledones de semillas maduras de *T. cacao* de tipo criollo, empleando las sales nutritivas de Murashige & Skoog modificado

con 10% de agua de coco y diferentes concentraciones de auxinas y citocininas como reguladores de crecimiento?

### III. JUSTIFICACIÓN

La propagación *In vitro* de *T. cacao* de tipo criollo, empleando escisiones de cotiledón es posible mediante la combinación de la citocinina BAP y la Auxina 2,4-D en bajas concentraciones, con lo que se logra la inducción de callo friable abundante en un tiempo de 30 días después de realizado la siembra del tejido.

Este hallazgo muestra como resultado que es posible trabajar en un protocolo que permita la propagación masiva del *T. cacao* de tipo criollo, con lo que se podrá rescatar estos materiales, los cuales en la actualidad se encuentran en peligro de desaparición, debido a que los agricultores no creen en su potencial y que no han considerado la posibilidad de sacar al mercado materiales elite.

Los resultados generados en la presente investigación son válidos para el material de *T. cacao* colectado en la parcela Patriarca 1 de Agrocadena El Patriarca denominado PC2 (Patriarca Criollo número 2), debido a que algunas investigaciones han demostrado que al trabajar con diferentes materiales de *T. cacao*, los resultados pueden ser diferentes, aunque se emplee el mismo protocolo. Por lo que se deben seguir realizando investigaciones.

Esta es la primera investigación para la propagación *In vitro* de *T. cacao* que se realiza empleando escisiones de cotiledón, en la que se obtienen resultados positivos. Al trabajar con este tipo de tejido, se asegura que el material clonado tendrá las características idénticas a la planta madre, con lo que se garantiza que una vez avanzado a la etapa de producción en campo estos materiales presenten un mayor número de granos blancos en comparación con materiales que son clonados por varetas, lo cual es un avance en cuanto a la tecnología de clonación.

## IV. MARCO TEÓRICO

### 1. Marco Conceptual

#### 1.1. Origen de la planta *Theobroma cacao* L.

El *T. cacao* es una planta de origen amazónico así lo demuestran investigaciones recientes basadas en análisis de ADN en los cuales se encontró Teobromina en restos arqueológicos en países como Perú, Brasil y Ecuador (Ordoñez & Salous, 2019).

La calidad del material encontrado por los españoles en México y luego Mesoamérica, fue sin duda una de las razones por las que más adelante se popularizó tanto, en esta zona se encuentran los materiales criollos que más influencia tuvieron en el desarrollo del cultivo, pues ha sido en el pasado la principal fuente de material de mejoramiento para la mayoría de las áreas donde hoy en día se produce cacao de calidad (Enríquez, 1986).

#### 1.2. Historia del *T. cacao* en Guatemala

El *T. cacao* es un cultivo que se conoce desde la cosmovisión maya y que está plasmado en el Popol Vuh desde la creación del hombre situándolo en Mesoamérica, lo que desde luego incluye a Guatemala.

En el año 1990 se realizó un censo en el cual se determinó que el 63% de la plantación existente pertenecía a materiales de *T. cacao* antiguos o criollos (López, 1991).

#### 1.3. Cacao de tipo criollo

El *T. cacao* de tipo criollo o acriollado ha sido cultivado en América Central y México. Son descritos como plantas poco productivas susceptibles a plagas y enfermedades tales como la Moniliasis. Las flores presentan estaminoides de color rosa pálido. Los frutos son verdes durante su desarrollo y amarillos cuando maduran, son largos y tienen los surcos bien pronunciados, el pericarpio rugoso y delgado. Sin embargo, la característica más importante son los granos, los cuales suelen ser redondos y de

cotiledones blancos. Los caracteres del grano, forma y color de los cotiledones son los más importantes (Otzoy, 2008).

#### 1.4. Taxonomía

Cuadro 1. Taxonomía de *T. cacao* L. Sistema APG IV (2016).

Categoría	Taxón
Clase	Equisetopsida C. Agardh
Sub clase	Magnoliidae Novák ex takht.
Súper Orden	Rosanae Takht
Orden	Malvales Juss.
Familia	Malvaceae Juss.
Género	Theobroma L.
Especie	<i>T. cacao</i> L.

**Fuente: *Theobroma cacao* L. (2019).**

#### 1.5. Importancia económica del cacao criollo

El cacao criollo es considerado como la variedad de mejor calidad por sus características de sabor único, pero cuenta solamente con el 5% de la cuota en el mercado mundial (CENSALUD, 2019).

Como una generalización, los granos de cacao finos o de sabor se producen a partir de variedades de árboles de cacao criollo o trinitario, mientras que los granos de cacao a granel (u ordinarios) provienen de los árboles de tipo forastero (Cacao Fino o de Sabor, 2019).

#### 1.6. Cultivo de tejidos

Es una técnica que permite la propagación vegetativa bajo condiciones artificiales, con lo que se logra la reproducción de plantas con las características idénticas a la de la planta madre. Para ello se extraen células tejidos u órganos los cuales se cultivan en

medios preparados a base de componentes inorgánicos, orgánicos y de ser necesario hormonas (Usui, Okabe, Pernillo, & Ramirez, 1990).

Los principales fines del cultivo de tejidos vegetales son tres: el primero es la micro propagación masiva, el segundo es el mejoramiento genético y el tercero es la producción de metabolitos secundarios (Usui, Okabe, Pernillo, & Ramírez, 1990).

### **1.7. Componentes inorgánicos del medio MS**

Los componentes inorgánicos del medio Murashige and skoog (MS) son importantes para el crecimiento de las plantas. Si se escasean estos elementos, aparecen los síntomas característicos correspondientes a la deficiencia de cada elemento. (Nitrógeno, Fósforo, Potasio, Calcio, Magnesio, Hierro y microelementos Manganeso, Cobre, Zinc, Molibdeno y Boro) (Usui, Okabe, Pernillo, & Ramírez, 1990).

### **1.8. Componentes orgánicos del medio MS**

Vitaminas (Tiamina, Pyridoxina y ácido nicotínico), Mio-iositol (producción de células y diferenciación), Aminoácidos y componente Naturales (agua de coco, caseína hidrolizada y extracto de malta) (Usui, Okabe, Pernillo, & Ramírez, 1990).

### **1.9. Hormonas vegetales**

Son reguladores de crecimiento vegetal, se emplean para diferentes fines agrícolas dentro de los cuales se encuentra el cultivo *In vitro*. Para inducir la citocinesis se suelen combinar las citocininas y las auxinas las cuales promueven la formación de callo (Raven, Evert, & Eichhorn, 1992).

Combinando BAP y 2,4-D se logra la inducción de callo friable en *Anthurium andraeanum* L. conocido comúnmente como anturio (Ruíz, 2000). También Combinando BAP y 2,4-D se logra la inducción de callo en láminas foliares de *Moringa oleífera* (Artiga Suarez, 2012).

### **1.10. Ingredientes complejos**

Existen sustancias naturales de composición indefinidas que se emplean para enriquecer o favorecer el cultivo *In vitro* de tejidos. Las más conocidas son el extracto de malta, agua de coco, extracto de levadura, pulpa de banano, caseína hidrolizada, jugo de naranja y tomate (Abdelnour & Vincent, 1994).

## **2. Marco Referencial**

### **2.1. Cacaos criollos de Agrocadena El Patriarca**

Durante el censo realizado en la parcela Patriarca 1, se determinaron tres plantas de *T. cacao* de material criollo las cuales se identificaron con el código PC1, PC2 y PC3 donde PC es Patriarca Criollo, con un porcentaje de grano Blanco del 50%, punta acentuada, surcos no pronunciados, corteza muy poco rugosa, frutos de 15 cm de largo y diámetro de once centímetros en promedio, semillas con cotiledones de blanco a rosado. No se pudo realizar un estudio más a profundidad debido a que los árboles solo tenían de cinco a 15 frutos en total, de los cuales el 80% presentaba problemas de ataque por ardillas (Cifuentes, 2019).

### **2.2. Variabilidad genética del *T. cacao***

El *T. cacao* es una planta que tiene gran diversidad genética por lo cual se van perdiendo muchos materiales con el paso del tiempo debido al alto intercambio de genes (Ruíz, 2014). Esto sucede puesto a que la reproducción se da por polinización cruzada, los materiales que se ven más afectados son los criollos debido a que se encuentran en menores poblaciones tal es el caso de los cacaos de Piura, Perú (Quiñónez, Espinoza, Yovera, Cuchilla, & Castro, 2018).

### **2.3. Propagación asexual de *T. cacao***

Las plantas de *T. cacao* se pueden reproducir de forma sexual y asexual (Somarriba, y otros, 2011). Se han realizado prácticas en las que se ha podido propagar por esquejes y micro esquejes, bajo diferentes sistemas de manejo. En la actualidad se han realizado numerosas investigaciones para la propagación *in vitro* de *T. cacao*, buscando la mayoría inducir callos friables en diferentes tejidos u órganos de la planta.

### **2.4. Inducción de callos friables**

La característica general del crecimiento de callos, abarca una compleja relación entre el material usado para iniciar los callos, la composición del medio, y las condiciones

experimentales durante el período de incubación. Algunos desarrollos de callos son fuertemente lignificados y duros en textura, los que no se pueden separar fácilmente en pequeños fragmentos. Por el contrario, los callos frágiles se separan fácilmente y se les denomina callos friables, frágiles (“frieble cultures”) (Dodds & Lorin, 1982).

Los callos pueden ser amarillentos, blancos, verdes, o coloreados con antocianinas. La pigmentación será en todo el callo, o en algunas regiones sin pigmentar. Su anatomía, es de variación considerable a lo largo de la diferenciación celular (Dodds & Lorin, 1982).

Los primeros estudiosos asumieron que el cultivo de callos derivados de órganos que contienen clorofila podrá ser autotróficos en su nutrición. Los callos con clorofila, de cualquier manera, son dependientes de azúcar exógeno para continuar creciendo, aún con adecuada intensidad de luz (Dodds & Lorin, 1982).

## **2.5. Que es embriogénesis somática**

Formación de un embrión somático a partir de células somáticas que no son el producto de la fusión de gametos. Esta terminología fue utilizada por Tokin en 1963 para describir la formación de un individuo a partir de una o varias células somáticas. La embriogénesis somática puede acompañarse de un fenómeno llamado callo génesis o formación de un callo, el cual es un conjunto organizado de células capaces de dividirse, pudiendo ser meristemáticas o embriogénicas. Es el resultado de la totipotencialidad. (Esquivel & Vincent, 1994).

## **2.6. Embriogénesis somática en *T. cacao***

La investigación más reciente sobre propagación de *T. cacao* demostró que para la primera etapa de cultivo *In vitro* es necesario aplicar 2,4-D en concentraciones de uno a 2 ml L<sup>-1</sup> (Calderón & Montes, 2017).

## **2.7. Antecedentes “Inducción de callo en *T. cacao* de tipo forastero”**

Se realizó un ensayo para determinar la combinación de auxina y citocinina que induzcan una respuesta más pronta en cuanto a la formación de callo. El medio de cultivo

empleado fue MS sólido más 10% de agua de coco, pH de 5.7, se realizaron 20 unidades por tratamiento para un total de 80 unidades (Castillo, 2019).

El ensayo estuvo a cargo de Estudiantes del Curso de Biotecnología de la carrera de Agronomía del CUNSUROC, en el que se tomaron las variables de respuesta peso y volumen de callo 20 días después de la siembra.

Las condiciones para el manejo de este ensayo fueron de temperatura de 28°C, humedad relativa del 83%, un periodo de luminosidad de 16 horas y ocho horas de oscuridad. La siembra se realizó en tubos de ensayo sellados con algodón y papel aluminio.

**Cuadro 2. Fitohormonas empleadas para la inducción de callo no friable a partir de cotiledones de *T. cacao*.**

Tratamiento	Citocinina 0.01 mg/l	Auxina 0.1 mg/l
MS1	TDZ	2,4-D
MS2	BAP	2,4-D
MS3	TDZ	ANA
MS4	BAP	ANA

**Nota: Se determinó que el mejor tratamiento fue el MS2.**

En el ensayo se determinó que el mejor tratamiento fue el MS2 en el que se combinaron las fitohormonas BAP al 0.01 mg/l con 2,4-D al 0.1 mg/l. En el cual se observó la formación de callo una semana después de la siembra, las variables de respuesta fueron tomadas 20 días después de la siembra, el volumen de callo fue 0.5 ml y un peso de 4 mg y visualmente un alto porcentaje de contaminación debido a la baja calidad de las instalaciones del laboratorio.

## V. OBJETIVOS

### 1. Objetivo general

Evaluar dieciséis combinaciones de citocinina BAP (Benciladenina) y de auxina 2,4-D (ácido 2,4 diclorofenoxiacético) para inducir callos friables en cotiledones de *T. cacao* de tipo criollo en medio Murashige and Skoog sólido.

### 2. Objetivos específicos

- 2.1. Comprobar si se induce la formación de callo a partir de cotiledones en de *T. cacao* de tipo criollo.
- 2.2. Determinar la combinación de BAP y 2,4-D que induzcan un mayor peso y volumen de callo friable.
- 2.3. Establecer las bases de la primera etapa para un nuevo protocolo de cultivo *In vitro* de *T. cacao* de tipo criollo mediante el uso de cotiledones.

## VI. HIPÓTESIS

### 1. Hipótesis para la variable de respuesta peso de callo

Ha1: Por lo menos una concentración de BAP tendrá un peso de callo diferente.

Ha2: Por lo menos una concentración de 2,4-D tendrá un peso de callo diferente.

Ha3: Por lo menos una combinación de BAP y 2,4-D tendrá un peso de callo diferente.

### 2. Hipótesis para la variable de respuesta volumen de callo

Ha1: Por lo menos una concentración de BAP producirá un volumen de callo diferente.

Ha2: Por lo menos una concentración de 2,4-D producirá un volumen de callo diferente.

Ha3: Por lo menos una combinación de BAP y 2,4-D producirá un volumen de callo diferente.

## VII. MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. Materiales

Para llevar a cabo el cultivo *In vitro* de *T. cacao* se emplearon los siguientes Materiales: Tijera podadora, frutos de *T. cacao*, bolsas de papel esterilizadas, cuchillo, pinzas, alcohol al 95% y tubos de ensayo.

#### 1.1. Equipo de laboratorio

Para trabajar bajo las condiciones asépticas adecuadas se empleó el siguiente equipo: Campa de flujo laminar, auto clave, agitador magnético, balanza analítica, potenciómetro (medidor de pH), rotador, refrigerador, potenciómetro y estereoscopio.

#### 1.2. Medio Murashige and Skoog (MS)

Para elaborar el medio MS, se emplearon los siguientes materiales: Beaker, pipetas, probetas, picetas, balones aforados, erlenmeyer, espátulas, papel aluminio, agua destilada, guantes de látex y frascos de 500 ml, azúcar, agua de *Cocos nucifera* y sales minerales (ver cuadro 3). Se adicionaron las fitohormonas vegetales Benciladenina y ácido 2,4 diclorofenoxiacético.

### 2. Metodología

#### 2.1. Desinfección y esterilización de los materiales, equipo y cristalería

Las soluciones para la desinfección de las superficies que se utilizaron son el hipoclorito de sodio al 0.5 % y el alcohol etílico al 70 %.

- a. Para preparar 500 ml de hipoclorito de sodio al 0.5 %, se agregó a un beaker 450 ml de agua, en el que se diluyó 50 ml de un producto comercial que contenía 5 % de hipoclorito de sodio.
- b. Para preparar un litro de alcohol etílico al 70%, se mezclaron 736 ml de alcohol etílico al 95 % y 264 ml de agua.

Toda la cristalería, pinzas, papel mayordomo y cuchillos se esterilizaron en la autoclave a una presión de 15 PSI y 121 °C durante un tiempo promedio de 15 minutos.

## **2.2. Preparación de soluciones madre**

Se prepararon un total de siete soluciones madre, cada solución madre se realizó por separado.

- a. Se utilizó papel aluminio y espátulas esterilizadas para pesar los reactivos indicados en la penúltima columna (ver Cuadro 1).
- b. Con un agitador magnético se mantuvo rotación constante al mezclar los reactivos dentro de un beaker de 500 ml, el cual contenía 250 ml de agua destilada.
- c. Al finalizar la mezcla se guardó en un frasco de vidrio y se esterilizó a 15 PSI por 20 minutos.
- d. Se esperó un aproximado de tres horas para que alcanzara la temperatura ambiente y luego se refrigeró para evitar daños posteriores o contaminación.

## **2.3. Preparación del medio de cultivo Murashige & Skoog**

- a. Sobre un agitador magnético se colocó un beaker de 1000 ml en el que se agregaron las soluciones madre según los volúmenes indicados en la última columna (ver *cuadro 3*). incluida el azúcar y el agua de coco.
- b. Luego se vertieron 60 ml del medio MS en 16 beakers diferentes.
- c. Se agregaron los reguladores de crecimiento BAP (0.00, 0.01, 0.02 y 0.03 mg/l) y 2,4-D (0.00, 0.05, 0.10 y 0.15 mg/l). Al final se agregó el gel.
- d. La agitación fue constante durante todo el proceso. Para regular el pH a 5.7 se empleó HCl 1 N.
- e. Ya teniendo establecido el pH de la solución, se colocarán 20 ml del medio/tubo de ensayo, se taparon empleando nylon y luego se esterilizaron usando la autoclave a 15 PSI.

## 2.4. Formulación de soluciones madre para el medio Murashige & Skoog

**Cuadro 3. Cálculos para la preparación de soluciones madre.**

No. Sol. Madre	Reactivo	Mg/l	Gr	Usar
1	Mg SO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	370	1.1563	20 ml
	Ca Cl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	440	1.3750	
2	K NO <sub>3</sub>	1,900	5.9375	20 ml
	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1,650	5.1563	
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170	0.5313	
3	FeSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	27.8	0.0869	20 ml
	Na <sub>2</sub> EDTA	37.3	0.1166	
	Mn SO <sub>4</sub> 4 H <sub>2</sub> O	22.3	0.0697	
4	Zn SO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	8.6	0.0269	20 ml
	KI	0.83	0.0026	
	H <sub>2</sub> BO <sub>3</sub>	6.2	0.0194	
	Na <sub>2</sub> Mo O <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O	0.25	0.0313	
5	Cu SO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O	0.025	0.0031	0.5 ml
	Co Cl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	0.025	0.0031	
6	Mio-inositol	100	0.3125	20 ml
	Glicina	2	0.0063	
	Ácido nicotínico	0.5	0.0625	
7	Piridoxina	0.5	0.0625	0.5 ml
	Tiamina	0.1	0.0125	
	Azúcar		7.5 g	
	Agua de coco		25ml	
	Gel		6 g	

**Nota: En la última columna de la tabla se indica la cantidad de cada solución madre a utilizar para preparar un litro de solución MS.**

## **2.5. Obtención de frutos de *T. cacao***

Los frutos se colectaron en horarios de 8:00 am a 10:00 am en la parcela Patriarca 1 ubicada en el municipio de San Bernardino, Suchitepéquez. Con la Ayuda de una tijera para podar previamente esterilizada con alcohol al 90%.

Se cortaron tres frutos de *T. cacao* del árbol PC2 (Patriarca Criollo número 2) debido a que en el PC1 Y PC3 no se encontraron frutos maduros no fue posible trabajar con estos materiales. Se guardaron en una bolsa de papel esterilizado y al día siguiente se trasladaron a las instalaciones del laboratorio de Biotecnología del Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícola, ubicado en Bárcenas Villa Nueva, de la Ciudad Capital.

## **2.6. Manejo de frutos**

- a. Empleando agua del grifo y jabón antibacterial se lavaron los frutos para eliminar los residuos, luego se secaron utilizando toallas de papel esterilizadas.
- b. Se rociaron los frutos con alcohol al 75% y se ingresaron de inmediato a la campana de flujo laminar.
- c. Para desinfectar por completo los frutos se flamearon tres veces usando alcohol al 90%, el fuego se consume en un promedio de dos minutos en cada repetición.

## **2.7. Extracción y preparación de los cotiledones de semillas de *T. cacao***

- a. Con la ayuda de un cuchillo afilado estéril se abrió el fruto realizando un corte transversal a manera de dejar descubiertas todas las semillas.
- b. Se colocó una hoja de papel mayordomo esterilizada en medio de la campana de flujo laminar, con la ayuda de una pinza y un bisturí se extrajo una semilla a la cual se le eliminó el mucílago utilizando papel mayordomo.
- c. Una vez eliminado todo el mucílago las semillas, fueron más fáciles de manipular con las pinzas; para verificar que se tratara de una semilla 100% blanca se realizó un corte de 1 mm en la punta de la misma.

- d. Es normal encontrar muchas semillas que no son 100% blancas por lo cual el procedimiento en los incisos b y c se debe realizar de manera individual para cada una.

### **2.8. Siembra de tejidos para cultivo *In vitro***

- a. Cuando se logró obtener una semilla 100% blanca lo inmediato fue sujetarla con la ayuda de una pinza previamente flameaba y con la ayuda de un bisturí también flameado.
- b. Se cortaron cinco rodajas del centro de la semilla de dos milímetros de grosor, se eliminó el tegumento y la nucela con la ayuda del bisturí y usando otro bisturí se cortó cada rodaja en cuatro partes homogéneas de tres por tres milímetros, con lo que por cada semilla se obtuvieron 20 secciones de tejido por lo tanto se usaron tres semillas para obtener las 48 secciones de tejido.
- c. De inmediato se sembraron las secciones de tejido en los tubos de ensayo con los medios de cultivos para evitar que entraran en oxidación. Para ello fue necesario flamear la boca del tubo por unos segundos introducir el tejido y nuevamente flamear la boca del tubo previo a sellarlo.

### **3. Ubicación del experimento**

El experimento se inició en el laboratorio de Biotecnología del CUNSUROC, debido a la alta contaminación que se presentó, fue necesario repetirlo en las instalaciones del laboratorio de Biotecnología del ICTA (Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícola), ubicado en Bárcenas, Villa nueva del departamento de Guatemala, bajo el apoyo de la M.Sc. Aura Helena Succhini, el experimento permaneció en dichas instalaciones hasta el día de la colecta de los resultados.

### **4. Material experimental**

El material experimental estuvo conformado por las 48 secciones de tejido obtenidas de semillas 100% blancas de frutos de *T. cacao* de tipo criollo. Como medio de cultivo se empleó el MS sólido modificado con agua de coco y fitohormonas BAP + 2,4-D.

#### 4.1. Manejo del experimento

- Fase de crecimiento (PCG – Primary callus growth): Temperatura de 28 °C, 33% de humedad relativa, oscuridad continúa por ocho días. A partir del día nueve el fotoperiodo fue de 16 horas luz y ocho de oscuridad.
- Fase de callo secundario (SCG – Secondary callus growth): Se mantuvieron las condiciones de la primera fase. A los 15 días se renovó el medio de cultivo.
  - La observación del cultivo se realizó una vez por semana.
  - Las variables de respuesta peso y volumen de callo friable se colectaron 30 días después de la siembra.



Figura 1. En una gradilla se colocaron los 48 tratamientos debidamente etiquetados.

#### 4.2. Diseño experimental

Debido a que las condiciones para cada unidad experimental fueron homogéneas y controlables se utilizó un diseño bifactorial completamente al azar con arreglo combinatorio.

#### 4.3. Modelo estadístico

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + B_j + (AB)_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

En donde:

$Y_{ijk}$  = efecto de la  $ijk$  – ésima unidad experimental.

$\mu$  = Media general.

$A_i$  = Efecto de la  $i$  – ésima concentración de BAP.

$B_j$  = Efecto de la  $j$  – ésima concentración de 2,4-D.

$AB_{ij}$  = Interacción de la  $i$  – ésima concentración de BAP y la  $j$  – ésima concentración de 2,4-D.

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

#### 4.4. Unidad experimental

Cada unidad experimental estuvo conformada por una escisión de tejido de 3x3mm introducido en un tubo de ensayo en el cual se introdujeron 20 ml de la solución preparada con BAP (0.00, 0.01, 0.02 y 0.03 mg/l) y 2,4-D (0.00, 0.05, 0.10 y 0.15 mg/l), Sembrando una rodaja de cotiledón por frasco. El medio de cultivo empleado fue Murashige & Skoog sólido. Se trabajaron 16 tratamientos y tres repeticiones para un total de 48 unidades experimentales.

#### 4.5. Tratamientos y aleatorización

**Cuadro 4. Factores a evaluar para la inducción de callo friable en *T. cacao*.**

Factor A			Factor B		Tratamiento
A1	BAP mg/l	0.00	B1	2,4-D 0.00 mg/l	1
			B2	2,4-D 0.05 mg/l	2
			B3	2,4-D 0.10 mg/l	3
			B4	2,4-D 0.15 mg/l	4
A2	BAP mg/l	0.01	B1	2,4-D 0.00 mg/l	5
			B2	2,4-D 0.05 mg/l	6
			B3	2,4-D 0.10 mg/l	7
			B4	2,4-D 0.15 mg/l	8
A3	BAP mg/l	0.02	B1	2,4-D 0.00 mg/l	9
			B2	2,4-D 0.05 mg/l	10
			B3	2,4-D 0.10 mg/l	11
			B4	2,4-D 0.15 mg/l	12
A4	BAP mg/l	0.03	B1	2,4-D 0.00 mg/l	13
			B2	2,4-D 0.05 mg/l	14
			B3	2,4-D 0.10 mg/l	15
			B4	2,4-D 0.15 mg/l	16

**Nota: El factor A corresponde a las concentraciones de BAP y el factor B corresponde a las concentraciones de 2,4-D.**

Se manejaron 16 tratamientos y se realizaron tres repeticiones por tratamiento. Testigo absoluto (no se usarán reguladores de crecimiento A1 más B1), Testigo relativo (se usarán la concentración de BAP y 2,4-D que indujeron callo no friable en medio sólido A2 más B3).

#### 4.6. Grados de libertad

Para calcular los grados de libertad se usó la formula  $G.L = (A*B) * (R-1)$  donde A y B son los factores a evaluar y R es el número de repeticiones.  $G.L = (4*4) * (3-1) = 32$

#### 4.7. Croquis del experimento

Para la distribución de los tratamientos se empleó el método de la tómbola, los resultados se presentan a continuación (ver cuadro 7).

**Cuadro 5. Croquis del experimento inducción de callo en friable en *T. cacao*.**

T14 R3	T4 R2	T11 R3	T8 R3	T12 R1	T10 R1
T2 R2	T16 R1	T1 R1	T5 R2	T3 R2	T16 R2
T7 R1	T15 R1	T3 R2	T3 R1	T4 R1	T9 R3
T15 R3	T6 R1	T5 R1	T4 R3	T3 R1	T13 R3
T11 R2	T3 R3	T1 R2	T2 R1	T9 R1	T10 R3
T12 R2	T15 R2	T2 R3	T5 R3	T7 R2	T8 R1
T12 R3	T1 R3	T11 R1	T7 R3	T10 R2	T6 R3
T9 R2	T14 R3	T6 R3	T14 R1	T6 R2	T8 R2

**Nota: Se manejaron tres repeticiones y 16 tratamientos, con un diseño completamente aleatorio con arreglo bifactorial combinatorio.**

#### 4.8. Variables de respuesta

- a. Peso de callo: Se usó una balanza analítica para calcular el peso en gramos del callo formado, el cual es una variable cuantitativa continua. La variable de respuesta fue colectada en las instalaciones del ICTA en Bárcenas, Villanueva. Para poder pesar

el callo friable se lavaron los restos de medio de cultivo adheridos al tejido utilizando una piceta con agua esterilizada, el tejido se secó utilizando papel mayordomo también esterilizado, el cual finalmente fue pesado. Se pesaron las 48 unidades experimentales una por una, teniendo como parámetro que el tejido presentara tonalidades de color café y que fuera frágil al tacto.

- b. Volumen de callos en ml: Se empleó una probeta de 5 ml a la que se le agregaron 2 ml de agua destilada esterilizada para medir el volumen de callo la cual es una variable cuantitativa continua. La variable de respuesta fue colectada en las instalaciones del ICTA en Bárcenas, Villanueva. Esta variable se calculó por diferencia de volumen.

#### **4.9. Análisis de la información**

Previo a realizar un análisis de varianza para los resultados obtenidos se transformaron los datos de las variables de respuesta peso y volumen de callo empleando la fórmula  $\sqrt{x+1}$ , debido a que algunos tratamientos eran iguales a cero. Posterior a ello la tabulación de los resultados se realizó empleando el software Excel y finalmente para realizar las pruebas de medias se utilizó el programa ANDEVA Nuevo León.

## VIII. PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

### 1. Pruebas en blanco para inducir callo en material de *T. cacao* criollo

Para iniciar la investigación, se tenía como antecedente que al combinar la citocinina BAP en concentración de 0.01 mg/l con la auxina 2,4-D en concentración de 0.10 mg/l, se logra la formación de callo no friable abundante 15 días después de la siembra; bajo condiciones de pH 5.7, medio MS sólido más agua de coco y escisiones cotiledón de semillas maduras de *T. cacao* de tipo forastero, bajo condiciones no controladas.

Para la primera prueba en blanco, se empleó el medio de cultivo MS líquido, más agua de coco, con un pH de 5.7, el que se mantuvo en agitación del 15 al 26 de abril, en las instalaciones del laboratorio de Biotecnología del centro universitario CUNSUROC. Se prepararon los tratamientos el 1 de mayo con 16 combinaciones de fitohormonas (ver Cuadro 4). Se trasladaron los tratamientos el martes 02 de mayo a las instalaciones del ICTA en Bárcenas, Villa nueva. Donde se llevó a cabo la siembra del tejido en frascos con 30 ml del medio de cultivo. Luego se colocaron en la sala de incubación a una temperatura de 28°C y un fotoperiodo de 16 horas luz y ocho horas de oscuridad.



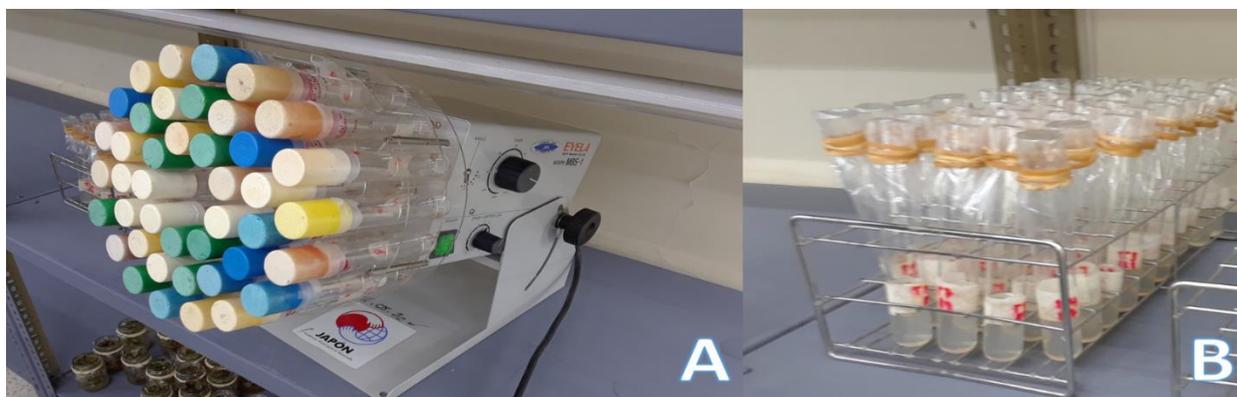
**Figura 2. Todos los tratamientos presentaron contaminación por bacterias.**

Sin embargo, ocho días después de la siembra, el 8 de mayo se retiró el material de las instalaciones del ICTA, debido a que presentaron contaminación por un patógeno de coloración rojiza (ver Figura 2), lo cual es una coloración típica de hongos del género *Fusarium* spp. (Duarte, Echevarría, & Martínez, 2016). La contaminación sucedió debido

a que se utilizó agua destilada no estéril, para contener las escisiones de cotiledón previo a realizar la siembra.

Para evitar percances, la prueba dos se realizó desde su inicio en las instalaciones del ICTA. Porque es más práctico preparar los medios en dicho laboratorio que transportarlos, además el laboratorio tiene todas las facilidades para elaborar los medios y la siembra sin contaminación, ni otro tipo de contratiempos.

Por lo cual las soluciones madre y los medios de cultivo se prepararon el 15 de mayo; El 22 de mayo se realizó la siembra trabajando bajo los parámetros de la primera prueba en blanco, con la modificación de que se trabajó con y sin rotación (ver Figura 3), esta vez bajo condiciones controladas.



**Figura 3. Cultivo *In vitro* de *T. cacao* en medio líquida con rotación (A) y medio sólido estático (B).**

En este nuevo intento por formar callo friable, en el tejido de cotiledón se sembró de *T. cacao* de tipo criollo, los tratamientos no presentaron contaminación, sin embargo, pasada la semana el tejido en medio líquido presentó oxidación, lo que provocó la muerte de las células y tejido completo, debido a que el tejido, quedó sumergido en el medio de cultivo (Azofeifa, 2009). El tejido en medio sólido no se oxidó, sin embargo, no presentó cambios o índices de formación de callo.

Basados en la prueba uno y dos, se realizó una tercera prueba el 29 de mayo, en la cual se trabajó con medio sólido. Debido a que el tejido en medio líquido presentó oxidación.

Como el tejido no presentó cambios en la segunda prueba en blanco, se decidió cambiar el fotoperiodo, sometiéndolo a oscuridad continua a partir del día de la siembra.

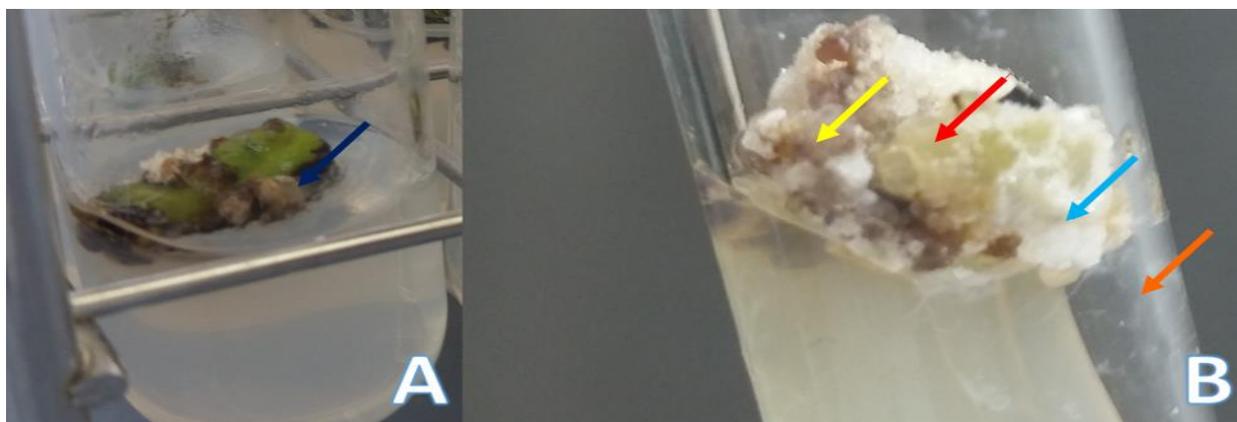


**Figura 4. Cambio del tejido de color blanco a verde durante la primera semana en oscuridad.**

Ocho días después de la siembra el 05 de junio, el tejido presentó cambios en la pigmentación de blanco a un tono verdoso amarillento (ver Figura 4), esto ha sucedido en otras investigaciones como resultado de la presencia de plastidios en las células meristemáticas, los cuales en la oscuridad se transforman en etioplastos y al someterlos de nuevo a la luz se transforman en cloroplastos, evitando la oxidación del tejido debido a que absorbe la luz a la que es sometido (Pérez, Cabrera, Delgado, Hernández, & Armas, 2007).

El tejido también aumentó su volumen, como resultado natural, debido a la absorción de humedad presente en el medio de cultivo (Segretín, 2015).

Debido al cambio de pigmentación que sufrió el tejido, se decidió retomar el fotoperiodo de 16 horas luz y ocho horas de oscuridad, lo que confirmó la existencia de etioplastos, pues el tejido días después de someterlo a la luz, alcanzó una pigmentación verde más intensa, que indica la presencia de cloroplastos. Siendo así que el 12 de junio, 15 días después de la siembra, se logró inducir callo no friable, el cual es de pigmentación blanca translúcida y de dura consistencia (ver Figura 5) flecha azul.



**Figura 5. Tipos de callo formado en el tejido cotiledonar de *T. cacao*.**

En la figura 5, el callo no friable (A) flecha azul; Callo friable (B) flecha amarilla, la flecha anaranjada señala el consumo de medio, la flecha celeste el callo inicial blanco y la flecha roja un callo secundario amarillento.

El 26 de junio fue necesario tomar las variables de respuesta, porque se consideró que el callo había alcanzado las características observables de un callo friable (ver Figura 5), las cuales son de callo frágil y abundante, con tonalidades de blanco, amarillento y marrón, esto se deduce de investigaciones similares realizadas en otros países, como es el caso de Colombia en el que a partir de un callo granular café de textura friable, que al dejarlo envejecer formó embriones independientes, empleando como tejido estaminoides (Urrea, Atehortúa, & Gallego, 2011).

## 2. Peso de callo

Los resultados de peso de callo friable fueron colectados 30 días después de la siembra.

No todos los tratamientos presentaron formación de callo, por lo tanto, fue necesario emplear la fórmula  $\sqrt{x+1}$  para convertirlos y poder someterlos a un análisis de varianza con el fin de cumplir con los supuestos del ANDEVA; los datos originales están en los anexos (ver Cuadro 1) y los valores convertidos se presentan a continuación (ver Cuadro 6).

**Cuadro 6. Resultados obtenidos del peso de callo friable.**

Tratamientos	Factores		Repeticiones		
	No.	A	B	1	2
T1	BAP 0	2,4-D 0	1	1	1
T2	BAP 0	2,4-D 0.05	1	1	1
T3	BAP 0	2,4-D 0.1	1	1	1
T4	BAP 0	2,4-D 0.15	1	1	1
T5	BAP 0.01	2,4-D 0	1	1	1
T6	BAP 0.01	2,4-D 0.05	1.22	1.18	1.22
T7	BAP 0.01	2,4-D 0.1	1.34	1.34	1.26
T8	BAP 0.01	2,4-D 0.15	1.18	1.22	1.18
T9	BAP 0.02	2,4-D 0	1	1	1
T10	BAP 0.02	2,4-D 0.05	1.22	1.18	1.22
T11	BAP 0.02	2,4-D 0.1	1.14	1.22	1.26
T12	BAP 0.02	2,4-D 0.15	1.26	1.18	1.14
T13	BAP 0.03	2,4-D 0	1	1	1
T14	BAP 0.03	2,4-D 0.05	1.22	1.26	1.22
T15	BAP 0.03	2,4-D 0.1	1.26	1.26	1.3
T16	BAP 0.03	2,4-D 0.15	1.3	1.26	1.18

**Nota: Los resultados fueron colectados un mes después de la siembra y convertidos usando la fórmula  $\sqrt{x+1}$  debido a que no todos los tratamientos formaron callo.**

Se realizó un análisis de varianza para la variable de respuesta peso de callo, el que demostró que son altamente significativos el factor A, B y la interacción entre ambos. Por lo tanto, se aceptan las tres hipótesis alternativas.

Las hipótesis alternativas indican que: Por lo menos una concentración de BAP tiene un peso de callo diferente, que por lo menos una concentración de 2,4-D tiene un peso

de callo diferente y que por lo menos una combinación de BAP y 2,4-D tiene un peso de callo diferente.

Debido a que el coeficiente de variación es de 2.80%, indica que se realizó un buen manejo del experimento, lo que hace confiables los resultados obtenidos (ver Cuadro 7).

**Cuadro 7. Análisis de varianza para la variable peso de callo.**

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	F	PF
Factor A	3	0.277321	0.092440	92.4360	0.0001**
Factor B	3	0.280514	0.093505	93.5002	0.0001**
Interacción	9	0.109375	0.012153	12.1522	0.0001**
Error	32	0.032001	0.001000		
Total	47	0.699211			
C.V.	2.80%				

**Nota: El análisis demostró que son altamente significativos el factor A, B y la interacción entre ambos.**

Debido a que existen diferencias altamente significativas en el factor A, B y la interacción, se procedió a realizar una prueba múltiple de medias de TUKEY al 1% de significancia para la interacción (ver Cuadro 8).

**Cuadro 8. Comparador de medias para la variable peso de callo.**

Factor A	Factor B				Media
	1	2	3	4	
1	1	1	1	1	1
2	1	1.2067	1.3133	1.1933	1.1783
3	1	1.2067	1.2067	1.1933	1.1517
4	1	1.2333	1.2733	1.2467	1.1883
Media	1	1.1617	1.1983	1.1583	1.1296

**Nota: Esta tabla se elabora en base a las medias del factor A y el Factor B.**

En el cuadro anterior se puede evidenciar, que al no existir la combinación de las fitohormonas BAP y 2,4-D no se induce la formación de callo friable.

**Cuadro 9. Comparación de medias del factor B dentro del nivel 2 del factor A.**

Nivel	Media		Testigo
3	1.3133	A	Relativo
2	1.2067		B
4	1.1933		B
1	1		C Absoluto
Nivel de significancia	0.01		
TUKEY	0.0873		
Valores de tablas	Q(0.05)=3.83	Q(0.01)=4.78	

**Nota: El factor B presenta un mayor peso de callo en interacción con el nivel 2 del factor A.**

Mediante la prueba de TUKEY al 1% se demostró que se obtiene el mayor peso de callo al combinar BAP al 0.01 mg/l y 2,4-D al 0.10 mg/l, esta combinación pertenece al testigo relativo.

### 3. Volumen de callo en ml

Los resultados de volumen de callo friable fueron colectados 30 días después de la siembra.

No todos los tratamientos presentaron formación de callo, por lo tanto, fue necesario emplear la fórmula  $\sqrt{x+1}$  para convertirlos y poder someterlos a una análisis de varianza con el fin de cumplir con los supuestos del ANDEVA; los datos originales están en los anexos (ver Cuadro 1) y los valores convertidos se presentan a continuación (ver Cuadro 10).

**Cuadro 10. Resultados obtenidos del volumen de callo friable.**

Tratamientos	Factores		Repeticiones		
	No.	A	B	1	2
T1	BAP 0	2,4-D 0	1	1	1
T2	BAP 0	2,4-D 0.05	1	1	1
T3	BAP 0	2,4-D 0.1	1	1	1
T4	BAP 0	2,4-D 0.15	1	1	1
T5	BAP 0.01	2,4-D 0	1	1	1
T6	BAP 0.01	2,4-D 0.05	1.73	2	1.73
T7	BAP 0.01	2,4-D 0.1	2.24	2.45	2.24
T8	BAP 0.01	2,4-D 0.15	1.73	2.12	1.73
T9	BAP 0.02	2,4-D 0	1	1	1
T10	BAP 0.02	2,4-D 0.05	2	1.73	2
T11	BAP 0.02	2,4-D 0.1	2	2	2
T12	BAP 0.02	2,4-D 0.15	1.73	1.73	1.73
T13	BAP 0.03	2,4-D 0	1	1	1
T14	BAP 0.03	2,4-D 0.05	2	2.24	2
T15	BAP 0.03	2,4-D 0.1	1.73	2	2.24
T16	BAP 0.03	2,4-D 0.15	2	1.73	2

**Nota: Los resultados fueron colectados un mes después de la siembra.**

Se realizó un análisis de varianza para la variable de respuesta volumen de callo, el que demostró que son altamente significativos el factor A, B y la interacción entre ambos. Por lo tanto, se aceptan las tres hipótesis alternativas.

Las hipótesis alternativas nos indican que: Por lo menos una concentración de BAP tiene un volumen de callo diferente, que por lo menos una concentración de 2,4-D tiene un volumen de callo diferente y que por lo menos una combinación de BAP y 2,4-D tiene un volumen de callo diferente.

Debido a que el coeficiente de variación es de 7.67%, indica que se realizó un buen manejo del experimento, lo que hace confiables los resultados obtenidos (ver Cuadro 11).

**Cuadro 11. Análisis de varianza para la variable volumen de callo.**

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	F	PF
Factor A	3	4.692780	1.564260	112.4380	0.0001**
Factor B	3	4.877304	1.625768	116.8592	0.0001**
Interacción	9	1.921242	0.213471	15.3442	0.0001**
Error	32	0.445190	0.013912		
Total	47	11.936516			
C.V.	7.67%				

**Nota: El análisis demostró que son altamente significativos el factor A, B y la interacción entre ambos.**

Debido a que existen diferencias altamente significativas en el factor A, B y la interacción, se procedió a realizar una prueba múltiple de medias de TUKEY al 1% de significancia para la interacción (ver Cuadro 12).

**Cuadro 12. Comparador de medias para la variable volumen de callo.**

Factor A	Factor B				Media
	1	2	3	4	
1	1	1	1	1	1
2	1	1.82	2.31	1.31	1.7475
3	1	1.91	2	2	1.66
4	1	2	1.99	1.99	1.745
Media	1	1.7025	1.825	1.625	1.5381

**Nota: Esta tabla se elabora en base a las medias del factor A y el factor B.**

En el cuadro anterior se puede evidenciar, que al no existir la combinación de las fitohormonas BAP y 2,4-D no se induce la formación de callo friable.

**Cuadro 13. Comparación de medias del factor B dentro del nivel 2 del factor A.**

Nivel	Media		Testigo
3	2.31	A	Relativo
4	1.86		B
2	1.82		B
1	1		C Absoluto
Nivel de significancia	0.01		
TUKEY	0.3255		
Valores de tablas	Q(0.05)=3.83	Q(0.01)=4.78	

**Nota: El factor B presenta un mayor volumen de callo en interacción con el nivel 3 del factor A.**

Mediante la prueba de TUKEY al 1% se demostró que se obtiene el mayor volumen de callo al combinar BAP al 0.01 mg/l y 2,4-D al 0.10 mg/l, esta combinación pertenece al testigo relativo.

Las variables de respuesta peso y volumen de callo friable, presentaron resultados similares, debido a que están estrechamente correlacionadas, su coeficiente de correlación es  $R^2= 0.9946$ , lo que indica que a mayor peso se tendrá un mayor volumen de callo friable.

Al someter los resultados de peso (ver Cuadro 9) y volumen de callo (ver Cuadro 13), a pruebas de medias de TUKEY al 1%, se demostró que el mejor tratamiento es el siete, en el que se combinaron las fitohormonas BAP al 0.01 mg/l y 2,4-D al 0.10 mg/l, las cuales fueron la base para realizar la investigación, teniéndolas como testigo relativo.

La investigación también permite saber, que aún en bajas concentraciones, las combinaciones de dichas fitohormonas inducen la formación de callo friable. Esto se ha

evidenciado en otras investigaciones, en las que se ha demostrado que la combinación de BAP y 2,4-D induce una mayor formación de callo, que otras combinaciones de fitohormonas (Artiga Suarez, 2012).

A pesar del éxito obtenido en esta investigación, es importante considerar que los resultados pueden ser diferentes al trabajar con otro material. Esto puede suceder, debido a que existen diferentes grupos genéticos de *T. cacao*, por lo tanto, su comportamiento suele ser diferente. Esto se deduce, de la manera en la que presentaron la adaptabilidad algunos materiales de *T. cacao* de tipo criollo, en granja docente Zahorí en Cuyotenango, Suchitepéquez (Otzoy, 2008).

## IX. CONCLUSIONES

1. Debido a la falta de pigmentación del tejido criollo de *T. cacao*, es necesario que los primeros ocho días de su cultivo sea bajo condiciones de oscuridad, periodo en el que se forman etioplastos a partir de platidios, lo que protege el tejido de daños ocasionados por la luz. Luego es necesario cambiar a un fotoperiodo de 16 horas luz y ocho horas de oscuridad, con lo que en un lapso de ocho días el tejido forma cloroplastos que facilitan la formación de callo no friable.
2. La formación de callo solo fue posible en los tratamientos en los que se combinaron la citocinina Benciladenina en concentraciones de 0.01, 0.02 y 0.03 mg/l y la auxina ácido 2,4 diclorofenoxiacético 0.05, 0.10 y 0.15 mg/l.
3. Se determinó que existe una correlación de  $R^2=0.9946$  entre las variables de repuesta peso y volumen de callo friable, lo que demuestra que están directamente relacionadas.
4. El proceso de formación de callo se dio en tres etapas: callo no friable inicial de color blanco, callo secundario blanco y la formación de callo friable a partir del callo secundario se logró 30 días después de la siembra, con lo que se procedió a realizar un ANDEVA, que demostró diferencias altamente significativas para ambas variables de respuesta y para la interacción.
5. Mediante una prueba de TUKEY al 1% para la interacción de cada variable de respuesta por separado, se determinó que el mejor tratamiento es el siete, que corresponde al testigo relativo, en el que se combinaron BAP al 0.01 mg/l y 2,4-D al 0.10 mg/l, con lo que se produjo un peso 1.32 mg y un volumen 2.31 ml de callo friable.
6. La prueba de TUKEY al 1% también demostró, que concentraciones por encima o por debajo del testigo relativo (BAP al 0.01 mg/l y 2,4-D al 0.10 %), tienden a generar un peso y volumen de callo friable homogéneo.

## X. RECOMENDACIONES

1. Para lograr la formación de callo en escisiones de cotiledón de *T. cacao* de tipo criollo, es necesario que los primeros días el cultivo se mantenga bajo condiciones de oscuridad, para futuras investigaciones deberán considerar el factor luz, debido a que influye directamente sobre los resultados
2. Debido a la correlación que existe entre las variables de repuesta, es mejor utilizar como variable solo el volumen de callo, pues es posible esterilizar todas las herramientas que se necesitan para medir esta variable. Lo que permitirá utilizar el mismo callo para la siguiente fase.
3. Se indujeron tres tipos de callo según su color (blanco, amarillo y marrón), se debe de considerar en una futura investigación, tomar estos cambios de color como parámetros para realizar la renovación del medio de cultivo. También se debe considerar dejar envejecer el callo friable (marrón) y renovar el medio de cultivo con frecuencia o empleando un mayor volumen de medio, esto en base a que durante el experimento se observó consumo del mismo.
4. Debido a que en concentraciones inferiores a las del testigo relativo se da la formación de callo friable, se puede evaluar en la citocinina BAP concentraciones que estén entre 0.00 y 0.01 mg/l y la auxina 2,4-D concentraciones que estén entre 0.00 y 0.10 mg/l. Para favorecer de manera previa en la segunda fase, la formación de embriones, y evitar que en la tercera fase se inhiba la formación de raíces.

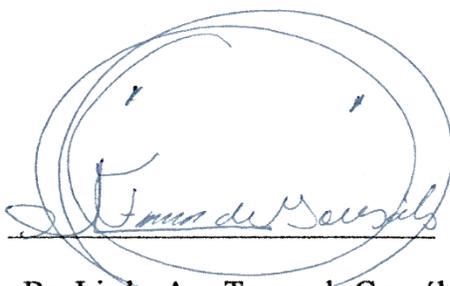
## XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abdelnour Esquivel, A., & Vincent Escalant , J. (1994). *Conceptos Basicos del cultivo de tejidos vegetales*. IICA, Costa Rica.
2. Artiga Suarez, M. E. (2012). Efecto del BAP y 2,4-D en la inducción in vitro de tejido callogénico a partir de láminas foliares, segmentos nodales y vitro-explantos hipocotiledonares y radiculares de Moringa oleífera. Honduras: Zamorano
3. Azofeifa, Á. (2009). Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes usados In vitro. *Agronomía Mesoamerica*, 20(1), 155.
4. *Cacao Fino o de Sabor*. (22 de Febrero de 2019). Recuperado el 23 de Febrero de 2019, de Organización Internacional del Cacao: <https://www.icco.org/about-cocoa/fine-or-flavour-cocoa.html>
5. Calderón Acuña, H. O., & Montes de Godoy , M. E. (2017 ). *Micro propagación de variedades nativas de cacao (Theobroma cacao) mediante embriogénesis somática*. Producción Agropecuaria y Desarrollo Sostenible. El Salvador.
6. CENSALUD. (19 de Febrero de 2019). *Tendencias del mercado mundial*. Obtenido de Mercado Mundial para Cacao amigable con la biodiversidad: [https://censalud.ues.edu.sv/CDOC-Deployment/documentos/Mercado\\_Mundial\\_para\\_Cacao\\_Amigable\\_con\\_la\\_biodiversidad.pdf](https://censalud.ues.edu.sv/CDOC-Deployment/documentos/Mercado_Mundial_para_Cacao_Amigable_con_la_biodiversidad.pdf)
7. Cifuentes Gramajo, S. N. (2019). *Informe final de servicios realizados en Agro cadena El Patriarca, en San Bernardino Suchitepéquez y Champerico Retalhuleu*. (Informe EPS Ingeniero Agronomo). Mazatenango, Suchitepéquez. USAC. CUNSUROC. Guatemala.
8. Dodds, J., & Lorin, W. (1982). *Experiments in plant Tissue Culture*. USA.
9. Duarte Leal, Y., Echevarría Hernández, A., & Martínez Coca, B. (2016). Identificación y caracterización de aislamientos de Fusarium spp. presentes en garbanzo (*Cicer arietinum* L.) en Cuba. *Revista Protección vegetal*.. 31(3).
10. Enríquez, G. (1986). *Curso sobre el cultivo del cacao*. Costa Rica: Centro Interamericano de Documentación e información Agrícola. Recuperado el 22 de Febrero de 2019, de

<https://books.google.com.gt/books?id=eZgOAQAAIAAJ&pg=PA7&dq=origen+del+theobroma+cacao&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwjzk72wu-HgAhWvslkKHYuyBPoQ6AEIJzAA#v=onepage&q&f=true>

11. Esquivel, A., & Vincent Escalant, J. (1994). *Conceptos básicos del cultivo de tejidos vegetales*. Costa Rica: CATIE.
12. López Cabrera, E. A. (1991). Diagnóstico de la situación del cacao en Guatemala. Guatemala: IICA.
13. Ordoñez Araque, R., & El Salous, A. (2019). *Historia ancestral del cacao. Año 3500 a.C. a 1700 d.C.* Ecuador: Ediciones Grupo Compás 2019.
14. Otzoy Rosales, M. R. (2008). Búsqueda, rescate, caracterización agromorfológica, botánica, molecular y conservación de cacao (*Theobroma cacao* L.) tipo criollo, de los departamentos de Alta Verapaz, Izabal, Petén, Suchitepéquez y el Quiché. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONCYT), Secretaria Nacional de Ciencia y Tecnología (SENACYT), Fondo Nacional de Ciencia y Tecnología (FONACYT), Centro Universitario de Sur Occidente (CUNSUROC) y Universidad de San Carlos de Guatemala (USAC), Guatemala.
15. Pérez, M., Cabrera, Y., Delgado, M., Hernández, C., & Armas, R. (2007). Empleo de reguladores de crecimiento para la formación de cloroplastos en callos de arroz (variedad Jucarito-104) cultivados en luz y oscuridad. *Biotecnología Vegetal*, 7(1). Recuperado el 02 de Febrero de 2020, de <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/349>
16. Quiñónez, M., Espinoza, E., Yovera, F., Cuchilla, Y., & Castro, D. (2018). *Identificación, georeferenciación y caracterización morfológica de T. cacao L.* Obtenido de The Biologist. Perú.
17. Raven, P., Evert, R., & Eichhorn, S. (1992). *Biología de las plantas*. España: Reverté S.A.
18. Ruíz Erazo, X. A. (2014). Diversidad genética de *Theobroma cacao* L. con marcadores moleculares de microsatelites. Universidad Nacional de Colombia, Colombia.
19. Ruíz Ruíz, B. J. (2000). Efecto del BAP y 2,4-D en la inducción de organogénesis indirecta in vitro de *Anthurium andraeanum* L. Honduras: Zamorano.

20. Segretín, M. E. (2015). *Los cultivos celulares y sus aplicaciones II (cultivos de células vegetales)*. ArgenBio. INGEBI-CONICET - Dpto. FB MyC, FCEyN-UBA. Recuperado el 15 de septiembre del 2019, de <http://www.argenbio.org/adc/uploads/pdf/Cultivos%20celulares%20II%20Euge.pdf>.
21. Somarriba Chavez, E., Astorga Domián, C., Vásquez Morera, N., Cerda Bustillos, R., Orozco Aguilar, L., Quesada Chaverri, F., . . . Fins, L. (2011). *Grafting and other methods for the asexual Propagation of Cacao*. (CATIE) Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza , Costa Rica.
22. *Theobroma cacao L.* (2019). Recuperado el 01 de Marzo de 2019, de TROPICOS: <http://www.tropicos.org/Name/30400642>
23. Urrea Trujillo, A. I., Atehortúa Garcés, L., & Gallego Rúa, A. M. (2011). Regeneración vía embriogénesis somática de una variedad colombiana élite de *Theobroma cacao L.* *Revista Colombiana de Biotecnología*, 13, 39 - 50. doi:10.15446/rev.colomb.biote
24. Usui, K., Okabe, K., Pernillo, R., & Ramírez, A. (1990). *Principios básicos del cultivo de tejidos vegetales*. Guatemala.
25. Versión Beta. (07 de Agosto de 2013). *Investigación de Biotecnología en el Cacao*. Antioquia, Colombia. Recuperado el 22 de Febrero de 2019, de <https://www.youtube.com/watch?v=ahcNI6sEdsc>



Vo. Bo. Licda. Ana Teresa de González

Bibliotecaria CUNSUROC.



## XII. ANEXOS

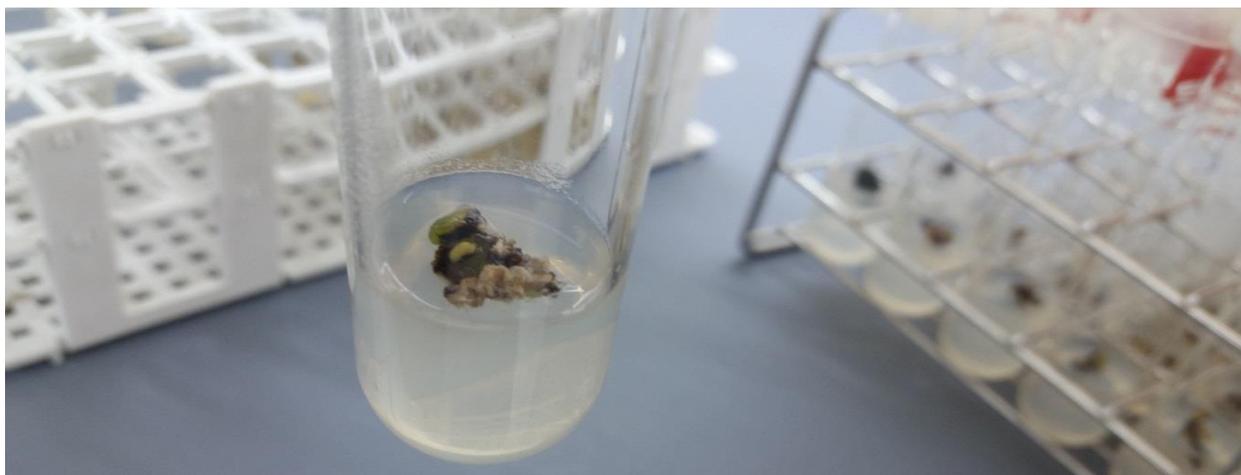
**Cuadro 14. Componentes de medio de cultivo Murashige and Skoog.**

Componentes	g/l	mg/l
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0.37	370
CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	0.44	440
KNO <sub>3</sub>	1.9	1,900
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1.65	1,650
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.17	170
FeSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0.0278	27.8
Na <sub>2</sub> EDTA	0.0373	37.3
MnSO <sub>4</sub> 4H <sub>2</sub> O	0.0223	22.3
ZnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0.0086	8.6
CuSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O	0.000025	0.025
CoCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	0.000025	0.025
KI	0.00083	0.83
H <sub>3</sub> Bo <sub>3</sub>	0.0062	6.2
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O	0.00025	0.25
Sucrosa	30	3%
Mio-inositol	0.1	100
Ácido nicotínico	0.0005	0.5
Piridoxina HCl	0.0005	0.5
Tiamina HCl	0.0001	0.1
Glicina	0.002	2
pH	5.7	5.7

**Nota: La tabla de componentes de Murashige and Skoog permite elaborar la solución madre si no se cuenta con el producto comercial. Fuente: (Usui, Okabe, Pernillo, & Ramírez, 1990).**



**Figura 6. Siembra de las escisiones del cotiledón blanco de *T. cacao* criollo en las instalaciones del ICTA.**



**Figura 7. Callo formado 15 días después de la siembra.**



**Figura 8. Callo friable formado 30 días después de la siembra.**

En la figura 8 se puede observar tejido en diferentes tonalidades que van de blanco, amarillento y café o marrón. También se puede apreciar las diferentes texturas.

**Cuadro 15. Resultados de peso y volumen de callo friable sin modificar.**

Repetición 1				Repetición 2				Repetición 3			
No. trat	Callo	Peso gr	Vol ml	No. trat	Callo	Peso gr	Vol ml	No. trat	Callo	Peso gr	Vol ml
1	No			1	No			1	No		
2	No			2	No			2	No		
3	No			3	No			3	No		
4	No			4	No			4	No		
5	No			5	No			5	No		
6	Si	0.5	2	6	Si	0.4	3	6	Si	0.5	2
7	Si	0.8	5	7	Si	0.8	5	7	Si	0.6	4
8	Si	0.4	2	8	Si	0.5	3.5	8	Si	0.4	2
9	No			9	No			9	No		
10	Si	0.5	3	10	Si	0.4	2	10	Si	0.3	2
11	Si	0.3	2	11	Si	0.5	3	11	Si	0.5	3
12	Si	0.6	4	12	Si	0.4	2	12	Si	0.6	4
13	No			13	No			13	No		
14	Si	0.5	3	14	Si	0.6	3	14	Si	0.4	2
15	Si	0.6	4	15	Si	0.6	4	15	Si	0.5	3
16	Si	0.7	4	16	Si	0.6	4	16	Si	0.7	4

**Nota: Se presentan los resultados sin modificar de peso y volumen de callo friable del tratamiento 1 al 16.**



CENTRO UNIVERSITARIO DE SUROCCIDENTE  
AGRONOMÍA TROPICAL  
Mazatenango, Suchitepéquez, gt

Mazatenango, 16 de octubre de 2020.

Honorable Consejo Directivo:  
Centro Universitario del Suroccidente.  
Universidad de San Carlos de Guatemala.  
Su despacho.

Respetables Miembros del Consejo Directivo:

De conformidad con las normas establecidas en la Ley Orgánica de la Universidad de San Carlos de Guatemala, tengo el honor de someter a vuestra consideración el Trabajo de Graduación titulado: **“Evaluación de combinaciones de Benciladenina y de ácido 2,4 diclorofenoxiacético, para la inducción de callo friable a partir de cotiledones de *Theobroma cacao* L. Malvaceae “cacao criollo”, en cultivo *In vitro*.”**; presentado como requisito previo a optar el título de Ingeniero Agrónomo, en el grado académico de Licenciado en Ciencias Agrícolas.

Sin otro particular, me suscribo.

Atentamente.

**“ID Y ENSEÑAD A TODOS”**

T.P.A. Sadrác Neftaly Cifuentes Gramajo

Carné: 201441302



CENTRO UNIVERSITARIO DE SUROCCIDENTE  
**AGRONOMÍA TROPICAL**  
Mazatenango, Suchitepéquez, gt

Mazatenango, 13 de octubre de 2020.

M.Sc. Erick Alexander España Miranda  
Coordinador Carrera de Agronomía Tropical.  
Centro Universitario del Suroccidente.  
Universidad de San Carlos de Guatemala.

Respetable Maestro España:

Por este medio me dirijo a usted, deseando que se encuentre gozando de buena salud.

El motivo de la presente es para informar que luego de haber aprobado el EPSAT en la carrera de Agronomía Tropical, solicito poder realizar el trabajo de graduación, para proseguir con el debido proceso de graduación.

Agradeciendo de antemano la atención prestada a la presente y sin otro particular me suscribo.

Atentamente.

***“ID Y ENSEÑAD A TODOS”***

T.P.A. Sadrac Neftaly Cifuentes Gramajo.  
201441302  
Estudiante de la Carrera de Agronomía Tropical.



CENTRO UNIVERSITARIO DE SUROCCIDENTE  
**AGRONOMÍA TROPICAL**  
Mazatenango, Suchitepéquez, gt

Mazatenango, 14 de octubre de 2020.

M.Sc. Erick Alexander España Miranda  
Coordinador Carrera de Agronomía Tropical.  
Centro Universitario del Suroccidente.  
Universidad de San Carlos de Guatemala.

Respetable Maestro España:

Por este medio me dirijo a usted, deseando que se encuentre gozando de buena salud.

El motivo de la presente es para informar que luego de haber asesorado y revisado el Trabajo de Graduación titulado: **“Evaluación de combinaciones de Benciladenina y de ácido 2,4 diclorofenoxiacético, para la inducción de callo friable a partir de cotiledones de *Theobroma cacao* L. Malvaceae “cacao criollo”, en cultivo *In vitro*.”**; presentado por el estudiante Sadrác Neftaly Cifuentes Gramajo quien se identifica con número de carné 201441302 de la carrera de Agronomía Tropical, y de conformidad con lo establecido en el reglamento de Trabajo de Graduación, doy visto bueno y aprobación, para que el estudiante pueda continuar con el trámite correspondiente.

Agradeciendo de antemano la atención prestada a la presente y sin otro particular me suscribo.

Atentamente.

**“ID Y ENSEÑAD A TODOS”**

M.Sc. Martín Salvador Sánchez Cruz  
Profesor Asesor y Supervisor



CENTRO UNIVERSITARIO DE SUROCCIDENTE  
AGRONOMÍA TROPICAL  
Mazatenango, Suchitepéquez, gt

Mazatenango, 16 de octubre de 2020.

Doctor  
Guillermo Vinicio Tello Cano.  
Director Centro Universitario del Suroccidente.  
Universidad de San Carlos de Guatemala.  
Su despacho.

Señor Director:

De manera atenta, me dirijo a usted para informar que el estudiante Sadrác Neftaly Cifuentes Gramajo, quien se identifica con número de carné 201441302 de la carrera de Agronomía Tropical, ha concluido su trabajo de graduación titulado: **“Evaluación de combinaciones de Benciladenina y de ácido 2,4 diclorofenoxiacético, para la inducción de callo friable a partir de cotiledones de *Theobroma cacao* L. Malvaceae “cacao criollo”, en cultivo *In vitro*”**; el cuál fue asesorado, revisado y con dictamen favorable del Ingeniero Agrónomo M.Sc. Martín Salvador Sánchez Cruz.

Como coordinador de la carrera de Agronomía Tropical, hago constar que el estudiante Sadrác Neftaly Cifuentes Gramajo, ha cumplido con el normativo de Trabajo de Graduación, razón por la que someto a consideración el documento presentado por el estudiante, para que continúe con el trámite correspondiente.

Sin otro particular, me suscribo.

Atentamente.

*“Id y Enseñad a Todos”*



Ing. Agr. M.Sc. Erick Alexander España Miranda.  
Coordinador de Carrera.





UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
CENTRO UNIVERSITARIO DEL SUR OCCIDENTE  
MAZATENANGO, SUCHITEPEQUEZ  
DIRECCIÓN DEL CENTRO UNIVERSITARIO

## CUNSUROC/USAC-I-03-2020

DIRECCION DEL CENTRO UNIVERSITARIO DEL SUROCCIDENTE, Mazatenango,  
Suchitepéquez, veintiuno de octubre de dos mil veinte-----

Encontrándose agregados al expediente los dictámenes del asesor y revisor, SE AUTORIZA LA IMPRESIÓN DEL TRABAJO DE GRADUACIÓN TITULADO: “EVALUACIÓN DE COMBINACIONES DE BENCILADENINA Y DE ÁCIDO 2,4 DICLOROFENOXIACÉTICO, PARA LA INDUCCIÓN DE CALLO FRIABLE A PARTIR DE COTILEDONES DE *THEOBROMA CACAO* L., MALVACEAE “cacao criollo”, EN CULTIVO *IN VITRO*”, del estudiante: TPA. Sadrác Neftaly Cifuentes Gramajo, carné 201441302 CUI: 2569 02933 1109 de la carrera Ingeniería en Agronomía Tropical.

“ID Y ENSEÑAD A TODOS”

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Guillermo Vinicio Tello Cano".

Dr. Guillermo Vinicio Tello Cano  
Director



/gris