



**Propagación clonal:**  
Embriogénesis somática y  
enraizamiento de estaquillas,  
dos aliados para la producción  
de cacao en San Martín



**Propagación clonal:**  
Embriogénesis somática y  
enraizamiento de estaquillas,  
dos aliados para la producción  
de cacao en San Martín



## PROPAGACIÓN CLONAL: EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA Y ENRAIZAMIENTO DE ESTAQUILLAS, DOS ALIADOS PARA LA PRODUCCIÓN DE CACAO EN SAN MARTÍN

Publicación del proyecto "Cacao NorAmazónico Sostenible", en el marco del Programa SeCompetitivo de la Cooperación Suiza - SECO y facilitado por Helvetas Swiss Intercooperation - PERU e implementado por la Asociación Peruana de Productores de Cacao - APPCACAO.

### **Autores**

Altamirano Salazar Alexander<sup>1</sup>  
Gárate Navarro Mar Asunción<sup>1</sup>  
Paz Urrelo Jorge Luis<sup>2</sup>  
Valles Ramírez Ayda Karin<sup>2</sup>  
Delgado Haya Henri<sup>2</sup>  
Rodríguez García Juliana<sup>2</sup>

### **Editado**

Iván Miffli Bresciani  
José Enrique Delgado Mesía

### **Coordinador General del Proyecto**

Luis Mendoza

### **Asociación Peruana de Productores de Cacao - APPCACAO**

Jr. Sáenz Peña N° 525 - Int. 605,  
Magdalena del Mar - Lima T: +51 1 5666067  
E: imagen@appcacao.org / gerencia@appcacao.org  
www.appcacao.org

### **Instituto Nacional de Innovación Agraria - INIA**

Av. La Molina N° 1981  
La Molina - Lima T: +51 1 240-2100 / 240-2350  
E: informes@inia.gob.pe  
www.inia.gob.pe  
Jorge Ganoza Roncal - Jefe Nacional

### **Helvetas Swiss Intercooperation - PERU - Programa SeCompetitivo**

Av. Ricardo Palma N° 857, Miraflores- Lima 18- Perú.  
Correo-e: peru@helvetas.org / www.helvetas.org/es/peru  
Luis Rosa-Pérez Tuesta, Director Nacional  
Iván Miffli Bresciani, Coordinador Nacional de Cadenas de Valor  
Fabiola Panduro Barreto, Asesora de Seguimiento, Monitoreo y Gestión del Conocimiento  
José Enrique Delgado Mesía, Coordinador Regional de San Martín

### **Cooperación Suiza-SECO**

www.cooperacionsuiza.pe/seco  
Alain Bühlmann, Director de la Cooperación Suiza-SECO  
Mauricio Chiaravalli Vegas, Director Adjunto de la Cooperación Suiza-SECO  
Romina Cruz Valencia, Especialista en Comunicaciones

**Diseño y Diagramación:** Percy López

**Archivo fotográfico:** SeCompetitivo

San Martín, julio de 2022

Primera edición, julio de 2022

Tiraje: 1000 ejemplares

Hecho el Depósito Legal en la Biblioteca Nacional del Perú N.º 2022-05840

Esta publicación se ha realizado con apoyo del Programa SeCompetitivo de la Cooperación Suiza-SECO. Se autoriza la reproducción total o parcial siempre y cuando se mencione la fuente. Distribución gratuita. Prohibida su venta.

<sup>1</sup> Asociación Peruana de Productores de Cacao - APPCACAO, Jr. Saenz Peña 525, Magdalena del Mar - Lima.

<sup>2</sup> Estación Experimental Agraria El Porvenir-SM. Dirección de Recursos Genéticos y Biotecnología. Dirección de Desarrollo Tecnológico Agrario. Programa Nacional de Investigación Café y Cacao; Km 14.5 Carretera Marginal Sur Fernando Belaunde Terry, distrito de Juan Guerra, provincia y región San Martín.



# Índice

PRESENTACIÓN	5
RECONOCIMIENTO	6
INTRODUCCIÓN	7
<b>CAPÍTULO I. ASPECTOS GENERALES</b>	<b>8</b>
1.1 Origen	8
1.2 Producción	8
1.3 Tipos de cacao	9
1.4 Técnicas de propagación	10
1.4.1 Reproducción sexual	10
1.4.2 Reproducción asexual	10
<b>CAPÍTULO II. EXPERIENCIAS EN PROPAGACIÓN</b>	<b>14</b>
2.1 Embriogénesis somática primaria en cacao	14
2.1.1 Establecimiento in vitro de explantes florales	14
2.1.2 Primera fase: inducción a la embriogénesis somática	17
2.1.3 Segunda fase: expresión	17
2.1.4 Tercera fase: maduración	18
2.1.5 Cuarta fase: conversión	18
2.2 Enraizamiento de estaquillas de cacao ( <i>Theobroma cacao</i> L.) en microtúnel	19
2.2.1 Proceso de inducción del enraizamiento de estaquillas	19
2.2.2 Proceso de aclimatación de estaquillas de cacao	24
2.2.3 Siembra de estaquillas en campo definitivo	27
<b>CAPÍTULO III. RESULTADOS DE INVESTIGACIÓN</b>	<b>29</b>
3.1 Resultados en embriogénesis somática	29
3.1.1 Contaminación y oxidación fenólica	29
3.1.2 Respuesta callogénica en genotipos de cacao	29
3.1.3 Número de Embriones Somáticos (NES) en genotipos de cacao	29
3.1.4 Formulación de soluciones stock	31
3.1.5 Formulaciones de medios de cultivo	32
3.2 Resultados en enraizamiento de estaquillas	33
3.2.1 Enraizamiento de estaquillas en genotipos de cacao, en relación al sustrato utilizado	33
3.2.2 Enraizamiento de estaquillas en genotipos de cacao, en relación al tipo de hormona utilizada	34
CRONOLOGÍA	35
CONSIDERACIONES FINALES	38
GLOSARIO	39
REFERENCIAS	40







## Presentación

La alianza estratégica y colaborativa entre el Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA), la Asociación Peruana de Productores de Cacao - APPCACAQ y el Programa SeCompetitivo de la Cooperación Suiza - SECO, implementado por Helvetas Swiss Intercooperation Perú, ha permitido el fortalecimiento de la investigación agraria en cacao (*Theobroma cacao* L.), uno de los cultivos de mayor importancia económica para la región y el país. En tal sentido, el desarrollo de avances en aspectos clave como la propagación clonal del cultivo fueron posibles gracias a denodados esfuerzos y recursos invertidos, que se focalizaron en el desarrollo de dos técnicas propagativas: la embriogénesis somática y el enraizamiento de estaquillas.

Es así que se presenta, ante la comunidad en general, productores, y actores de la cadena, el libro titulado "Propagación clonal: Embriogénesis somática y enraizamiento de estaquillas, dos aliados para la producción de cacao en San Martín". En este se pone de manifiesto la descripción secuencial y objetiva de etapas generadas desde el momento de la colecta de explantes (estaminoides de la flor de cacao) hasta la obtención de embriones somáticos primarios durante el proceso de embriogénesis somática. Además, se explica de manera secuencial la metodología y etapas de la técnica de propagación basada en el enraizamiento de estaquillas, proceso que se inicia desde la selección e identificación de plantas madre donadoras, hasta la obtención de plántones aclimatados a nivel de vivero. Finalmente, sin lugar a duda los conocimientos generados y plasmados en la presente publicación, a partir de los resultados obtenidos en las investigaciones desarrolladas, contribuirán a sentar las bases para el fomento de nuevos sistemas productivos, respaldados por individuos de planta propagados clonalmente y con características genéticas y agronómicas deseables para el fortalecimiento de la actividad cacaotera del país.



## Reconocimiento

- Al Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA), por brindar el respaldo y facilidades en el uso de sus instalaciones en la Estación Experimental Agraria El Porvenir, San Martín.
- Al Programa Nacional de Café y Cacao del INIA, por las coordinaciones técnicas y logísticas para la facilitación del desarrollo de actividades que contemplaron las investigaciones.
- Al Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Dirección de Recursos Genéticos y Biotecnología, en el cual se desarrollaron las investigaciones vinculadas a embriogénesis somática y enraizamiento de estaquillas.
- A la Asociación Peruana de Productores de Cacao - APPCACAO, por el apoyo financiero que permitió el logro de objetivos trazados en los trabajos de investigación y por contribuir al desarrollo de capacidades de los investigadores del INIA.
- Al Programa SeCompetitivo de la Cooperación Suiza - SECO, implementado por Helvetas Swiss Intercooperation Perú, por promover y brindar apoyo al proyecto "Cacao NorAmazónico Sostenible", implementado por APPCACAO para fortalecer la competitividad y sostenibilidad de la cadena de valor del cacao.
- A todas las personas y profesionales que directa o indirectamente proporcionaron sus conocimientos y sugerencias para la mejora de la presente publicación.
- A la ing. Zoila Luz Oré Aquino, por su aporte en el procesamiento de datos generados durante las investigaciones.





# Introducción

La agricultura en la región San Martín y el país representa un papel importante en el desarrollo socioeconómico de muchas familias. Es una actividad económica que acoge el fomento y desarrollo de una amplia gama de cultivos aprovechables que generalmente aportan materia prima, como el cacao, uno de los más sobresalientes en diferentes zonas productoras del Perú. Entre ellas destacan las regiones de Amazonas, Cajamarca, Cusco, Ucayali, Junín, Huánuco, y San Martín, siendo esta última la de mayor extensión en términos de hectárea y producción.

Durante el año 2021, entre las regiones con mayor participación en la producción de cacao sobresalieron San Martín con 61,2 mil toneladas, por lo que es el más importante productor regional (38,8%); seguida en importancia por la región Junín con 29,8 mil toneladas (18,9%); Ucayali con 20 mil toneladas (12,7%); asimismo, Huánuco y Cusco con 14,7 mil y 6,6 mil toneladas, respectivamente. Estas cinco regiones representan alrededor del 83,9% de la producción total del país. Además, en el mismo año, se exportaron US\$ 303 millones en productos de cacao y derivados, de modo que se registró un incremento de 10,6% con respecto al mismo periodo del año 2020. Sumado a ello, el 60% de la biodiversidad mundial de cacao (material genético) se encuentra en el Perú (MIDAGRI 2021).

Ante este escenario prometedor y positivo, se considera importante desarrollar tecnologías que contribuyan a la producción del cacao de manera eficiente y sostenible, integrando aspectos clave como los sistemas propagativos de esta especie, y poniendo especial énfasis en la propagación clonal, con la finalidad de sentar las bases genéticas para la promoción de su tolerancia a plagas y enfermedades, así como el acortamiento de su ciclo productivo. Esto podría aperturar el inicio de líneas de investigación que se conviertan en el conducto de nuevos sistemas productivos y de mejoramiento genético, basados en individuos de plantas obtenidas clonalmente y con características agronómicas sobresalientes.

Es así que en el presente libro se pone al alcance de todos los actores involucrados en la cadena de valor de cacao, información de carácter técnico y científico, respecto a la embriogénesis somática a nivel de laboratorio, la misma que involucró colectas de explantes (estaminoides) de diferentes clones de cacao sembrados en la región San Martín, tales como CCN - 51, TSH 565, IMC - 67, entre otros. Asimismo, se pone de manifiesto el desarrollo secuencial de otra técnica clonal importante en el cultivo de cacao, el enraizamiento de estaquillas, que permitió la obtención de plántulas de cacao de diferentes clones, aptas para el establecimiento en campo definitivo. Este hecho permitiría validar y evaluar el comportamiento agronómico de genotipos de cacao a nivel de campo y de manera escalár.

Finalmente, ambas técnicas de propagación se constituyen en dos aliados para la producción del cacao y la multiplicación de genotipos de alto valor genético en la región San Martín y otras zonas productoras del país, contribuyendo al desarrollo del sector cacaotero del Perú.



# CAPÍTULO I.

## Aspectos generales



### 1.1 Origen

El cacao es una especie ampliamente difundida y cultivada en diferentes países de la región, como Ecuador, Colombia, Brasil, Venezuela y Perú, extendiéndose incluso hasta México. Según el ICT (2004), el cacao es una especie originaria de los bosques tropicales húmedos de Sur América. Para Durán (2011), su origen exacto, respaldado por estudios genéticos, parece encontrarse en la Amazonía Brasileira.

### 1.2 Producción

En el Perú, la producción nacional de cacao en grano viene incrementándose de manera sostenida desde hace diez años y crece a una tasa promedio de 12,6% anual. Actualmente se producen tres tipos de cacao, el 53,3 % corresponde a los trinitarios y sembrados en la región de Junín, el 37,3 % a los forasteros amazónicos (ubicados en la región Cusco y Ayacucho) y el 9,4 % a criollos, ubicados en la zona norte de San Martín, Amazonas y Cajamarca. En la tabla 01, se muestra la producción de cacao por regiones, correspondiente al periodo 2015- 2021 (MIDAGRI, 2021).

**Tabla 01:** Perú: Producción regional en toneladas de Cacao en grano, 2015 – 2021.

Departamento	2015	2016	2017	2018	2019	2020	2021
<b>Perú</b>	<b>84813</b>	<b>107920</b>	<b>121824</b>	<b>134675</b>	<b>141777</b>	<b>158942</b>	<b>157858</b>
San Martín	37319	45996	51440	56136	54184	66786	61230
Junín	15334	21400	21801	24755	25560	27536	29774
Ucayali	4201	8622	13245	16587	17031	21705	20046
Huánuco	5292	6491	8912	10392	13403	14395	14746
Cusco	8048	10788	8707	8192	9915	7476	6576
Ayacucho	4973	5544	5056	5113	5998	5634	6160
Pasco	1144	1338	1835	3881	4407	4033	4597
Amazonas	4718	4224	6352	4514	5108	5052	4081
Piura	768	658	599	1009	1438	1385	1540
Cajamarca	1320	1001	996	955	1121	1137	1286
Otros	1696	1858	2881	3141	3612	3803	7822

Fuente: MIDAGRI – DGESEP  
Elaboración: MIDAGRI – DGESEP-DG-DEE





### 1.3 Tipos de cacao

Durán (2011) manifiesta que el cacao puede ser clasificado, según su genotipo, en tres grupos:



- **Forasteros:** genotipos que provienen de la cuenca del Amazonas. Se caracterizan por presentar mazorcas verdes y luego amarillas en la madurez. Son de forma ovoide variables, a veces alargadas como los criollos, a veces redondeadas. Además, presentan una superficie lisa poco estriada y de corteza gruesa. Sus semillas son aplanadas, en tanto que los cotiledones tienen un color púrpura oscuro. Su calidad es muy ordinaria por presentar un fuerte tenor de taninos, poco perfumado. También presentan un excelente rendimiento, cosecha precoz, vigorosidad y tolerancia a enfermedades.



- **Criollos:** tienen su origen en la América Central precolombina, donde fueron cultivados por mayas y olmecas. Los frutos presentan cáscara delgada, color amarillo o rojo y una semilla grande y redonda, generalmente blanca o ligeramente púrpura. Son susceptibles a enfermedades y de bajo rendimiento. Presentan pocos taninos. Son finos por excelencia. Su sabor es delicado, suave y complejo, con aroma intenso, condición que lo hace un tipo de cacao exclusivo y demandado en los mercados más exigentes del mundo. El cacao tipo criollo cuenta con algunas variedades como los criollos porcelana, que presentan granos grandes y completamente blancos en su interior y carecen de polifenoles como la antocianina, otorgándoles un sabor amargo. Por otra parte, los criollos andinos producen frutos rojos y verdes que se alargan antes de madurar, en tanto que los criollos pentágona producen frutos con cinco bordes prominentes.



- **Trinitarios:** es un genotipo obtenido a partir de los cruces de los dos genotipos anteriores. Es originario de la isla de Trinidad. Al igual que los criollos, este tipo de genotipos posee características óptimas que lo hacen atractivo y requerido por los consumidores de chocolate.

Para Benito (1992) el cacao tipo criollo, suele presentar semillas grandes, casi redondas y no aplastadas por sus lados. El color de los granos es blanco. En tanto que la superficie de la mazorca tiene alrededor de 10 surcos y las protuberancias que emanan entre los surcos son rugosas e irregulares, siendo la textura de la cáscara de la mazorca más suave y fácil de cortar. Además, manifiesta que los forasteros constituyen la mayor parte de los cacaos cultivados en todos los países productores, e incluyen muchos sub tipos como el forastero angoleta, caracterizado por presentar frutos grandes y largos, con surcos profundos, cáscara gruesa, superficie rugosa y en algunos casos lisa. Su color es púrpura claro y es de calidad superior. Respecto a los forasteros cundeamor, refiere que se caracterizan por presentar un estrangulamiento en la base de la fruta, además de que su cáscara posee surcos y su superficie no es muy rugosa. Sobre los forasteros amelonados afirma que se



caracterizan por presentar frutos anchos y cortos, de forma parecida a la del melón de agua y de cáscara ligeramente lisa con 10 surcos definidos y semillas que presentan un color violeta oscuro y de sabor amargo. Finalmente, concluye que los forasteros calabacillos son considerados como los forasteros menos deseables, por presentar generalmente una calidad baja, además de una mazorca corta y de cáscara lisa, con surcos poco profundos. Los granos son muy aplastados, muy amargos y con una coloración púrpura.

## 1.4 Técnicas de propagación

Para el caso específico del cultivo de cacao, generalmente se distinguen dos formas de propagación. La primera mediante el uso de semillas (propagación sexual) obteniéndose plantas con alta variabilidad genética; y la segunda a través de la propagación asexual, la misma que involucra a una serie de técnicas clonales, que van desde los injertos, acodos aéreos, enraizamiento de estaquillas e incluso embriogénesis somática. A continuación, se presentan las características conceptuales de cada forma de propagación:

### 1.4.1 Reproducción sexual

Benito (1992) señala que la forma más conocida de propagar el cacao en el Perú es mediante el uso de semillas. Este método se caracteriza por presentar el riesgo de la complejidad de predicción de las características de las plantas resultantes. Este tipo de reproducción implica la selección de las plantas madre con características sobresalientes, como una buena estructura en términos de desarrollo y conformación, además de estar libres de plagas y enfermedades y ser plantas bien nutridas. Luego se procede con la selección de fruto, buscando que el estado de las semillas esté fisiológicamente maduro y evitando la sobremaduración de frutos, ya que la radícula podría desarrollarse en su interior. Después de esta etapa se seleccionan las semillas, en decir los granos más gruesos y de buen biotipo, elegidos de la parte central de la mazorca. Posteriormente, el autor manifiesta que después de seleccionar las semillas se procede con la conservación de las mismas, utilizando dos métodos: el primero se basa en la desinfección adecuada de la semilla, para luego introducirlas en parafina, con la finalidad de formar una capa que las aisle del ambiente; el segundo consiste en extraer el mucílago de las semillas mediante la frotación, con el uso de cal o aserrín, para luego orearlas bajo sombra aproximadamente durante dos horas. Finalmente estas son dispuestas en capas delgadas de aserrín.

### 1.4.2 Reproducción asexual

Una de las principales limitantes del cultivo de cacao es la variabilidad observada en las plantaciones obtenidas por semilla, afectando el rendimiento y la calidad del grano. Este hecho ha llevado a considerar e impulsar la propagación asexual como una vía para mantener la uniformidad de los materiales vegetales (Díaz et al 2015). Este tipo de propagación no implica un cambio en la constitución genética, dado a que todas las características de la planta madre se reflejan en la nueva planta (Durán, 2011). A continuación, se describen las principales y más conocidas formas de propagación:





### a) Injertos

La injertación es una forma de propagación asexual. Entre sus ventajas destaca el que permita obtener individuos de plantas iguales a la planta original (uniformidad genética), además de los beneficios de la selección del injerto y patrón (Hartmann y Kester, 2001). El proceso de injertación constituye la unión de tejidos jóvenes de dos plantas, continuando su desarrollo como una sola planta. Una de sus partes es la yema, que al continuar su desarrollo se convierte en el nuevo clon y corresponde a la parte aérea; la otra es el patrón o soporte, representando parte del área del tronco y a la zona radicular (Durán 2011). El éxito de la injertación se da en función de la práctica del operario, de su conocimiento en la obtención de yemas y del momento óptimo de injertación. Los tipos de injertos más comunes son los de púa central, púa lateral y de parche (ICT, 2004).

### b) Acodos

Paz et al. (2020) mencionan que los acodos aéreos se basan en la estimulación de raíces a partir de cortes en ramas jóvenes de plantas madre seleccionadas. El acodo se presenta como una alternativa para la propagación vegetativa de plantas, a través del cual se obtienen individuos uniformes, partiendo de ramas de similar forma y edad, y asegurando de esta manera la propagación clonal del cacao.

El enraizamiento de acodos en algunas especies puede ser lento, necesitando para ello la aplicación de auxinas para estimular la formación de raíces, debido a que acelera la iniciación radical, incrementa el número y acentúa la calidad de las raíces (Sánchez et al., 2009).

En el grupo de las auxinas se encuentran el ácido indolbutírico (AIB), ácido indolacético (AIA), ácido naftalenacético (ANA) y ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D). Para inducir la formación de raíces en acodos de cacao se usa el AIB, debido a su estabilidad y fácil adquisición (Paz et al. 2020).

### c) Ramillas

Es una técnica de multiplicación asexual que permite obtener plantas de cacao a partir de una ramilla (sección de rama de crecimiento lateral [brotes plagiotrópicos] que posee de 3 a 4 yemas viables), formando el sistema radicular (fasciculado) por inducción hormonal y brotación, bajo condiciones controladas de humedad y temperatura (Arguello, 2018).



**Injerto**



**Acodo**



**Ramillas**



El enraizamiento de estacas plagiotrópicas es uno de los métodos más usados, ya que además de mantener las características genéticas de la planta madre, permite la multiplicación masiva de plantas. Para obtener plantas de buenas características y alto rendimiento se debe realizar una buena selección del material a producir en el vivero.

La multiplicación de varetas de cacao a través de la técnica de enraizamiento se está desarrollando a escalas considerables en países productores de cacao como Colombia, Brasil, Ecuador, Costa Rica y otros a nivel mundial. Estos han tenido éxito al utilizar dicha técnica, logrando establecer plantaciones de considerable magnitud y producciones a corto plazo (Cordero et al 2011, citado por Zambrano, 2018).

#### **d) Embriogénesis somática (ES)**

En el Perú, especialmente en la región San Martín, se requiere material vegetal con características de alto valor genético, con la finalidad de reemplazar plantaciones antiguas e improductivas y establecer nuevos genotipos, como parte de la diversidad, que permitan conservar el material vegetal e implementar planes de mejoramiento de la especie. Como ya se mencionó, son muchas las técnicas de propagación de cacao, sin embargo, la eficiencia en términos cualitativos, cuantitativos, tecnológicos y productivos es muy variable. En cuanto a cultivo de tejidos vegetales, Suárez (2020) menciona que es una técnica biotecnológica que comprende el mantenimiento de plantas o componentes de estas, en condiciones ambientales controladas, ausencia de agentes contaminantes, nutrición, entre otros. Dentro de los métodos de cultivo in vitro se tiene la embriogénesis somática (ES), que destaca a nivel internacional. Diversos países, productores o no de este fruto, utilizan técnicas biotecnológicas para sumar esfuerzos en la propagación clonal del cacao. Para Fontanel et al. (2002), la multiplicación de callos embriogénicos permite una producción significativa de plantas de cacao in vitro (500 plantas/mes/operario). La ES fue descrita por Williams y Maheswaran (1986) como el proceso por el cual las células somáticas haploides o diploides se desarrollan en plantas diferenciadas, a través de etapas embriológicas sin fusión de gametos. Se trata de un proceso presente con frecuencia en la naturaleza, que ocurre durante el desarrollo embrionario y post embrionario de la planta (Smertenko y Bozhkov, 2014, mencionado por Osorio et al., 2022). La ES es el resultado del desarrollo de una serie de procesos por los que las células somáticas se reestructuran para dar origen a células embriogénicas (Yang y Zhang, 2010).



**Embrión cotiledonar**

Las células somáticas pueden generar plantas completas y, al no efectuarse la recombinación y fusión de los gametos, conservan íntegramente las características del genotipo de la planta donadora (clonación). Los individuos regenerados pueden ser el punto de partida para nuevos programas de investigación y desarrollo, referidos a la inducción de la embriogénesis somática (Freire, 2003). Existen muchas similitudes entre los embriones somáticos y cigóticos de cacao, entre las cuales se pueden observar las etapas de desarrollo globular, corazón, torpedo y cotiledonar (Chanatásig y



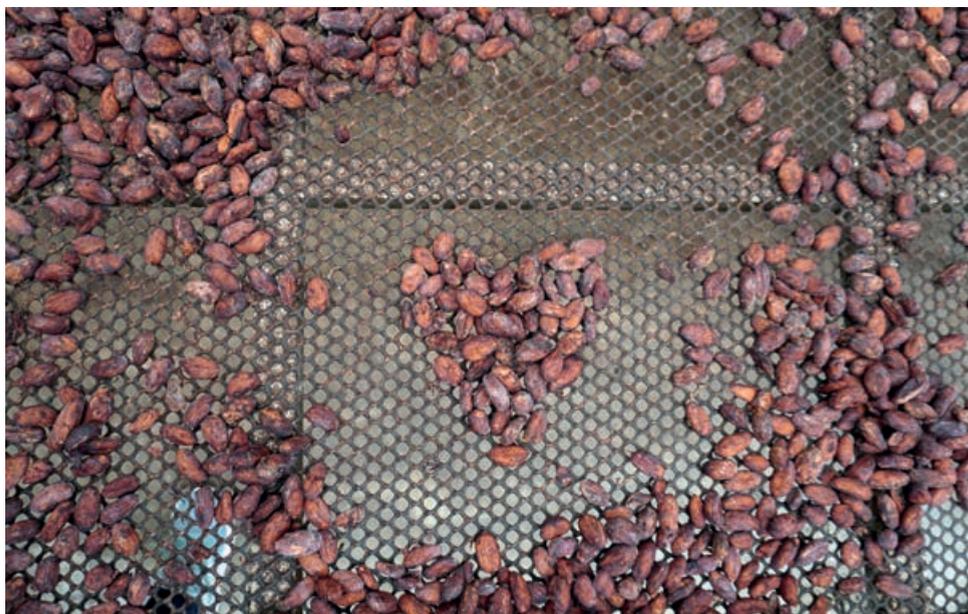


Aguilar, 2004). Así mismo, Gárate et al. (2017) mencionan que las etapas cotiledonares obtenidas por la ES son similares a las estructuras cigóticas, manteniendo su forma y simetría.

La ES puede ser indirecta o directa. En la ES indirecta, el explante se somete a un proceso de diferenciación para iniciar la formación de callo embriogénico y luego la conversión de células embriogénicas en embriones somáticos. Mientras que la ES directa ofrece la posibilidad de obtener embriones somáticos directamente de los explantes (IICA et al., 2011).

En el cacao, la ES se ha comportado como recalcitrante por su baja eficiencia, debido a los bajos niveles de respuesta alcanzados y la alta variabilidad en los diferentes genotipos que se pueden estudiar. Los reguladores de crecimiento son imprescindibles en la respuesta embriogénica, ya que interactúan con los niveles hormonales endógenos. Cada uno de los genotipos de cacao tiene diferentes respuestas a la formación de callos y a la embriogénesis somática, debido al factor genético, la interacción del medio de cultivo, el tipo de explante y otras condiciones de cultivo (Silva et al. 2006, mencionado por Gárate y Arévalo, 2017).

La ES es posible porque la célula somática vegetal tiene la capacidad de desarrollarse en un embrión, a partir de la manipulación de condiciones de cultivo y la aplicación de sustancias reguladoras de crecimiento (Freire, 2003). Por ello constituye una herramienta para la propagación de plantas de cacao y, en algunos casos, para la formación de embriones somáticos, logrados para algunos genotipos a partir de diferentes tipos de explantes, como pétalos, estaminodios y cotiledones (Maximova et al., 2002). Finalmente, la ES podría constituirse en un método alternativo para la producción y multiplicación de clones de cacao, pues su desarrollo se solventa en tejidos iniciales, principalmente de pétalos y estaminoides, explantes de mayor importancia en la actualidad para la propagación in vitro del cultivo. Actualmente no se reporta un protocolo eficiente y validado para la propagación de cacao por ES, sin embargo, su desarrollo permitirá una rápida multiplicación vegetativa de genotipos de élite o con alto valor genético (Minyaka et al., 2004).



## CAPÍTULO II.

# Experiencias en propagación

### 2.1 Embriogénesis somática primaria en cacao

El proceso de inducción a la embriogénesis somática comprende desde el establecimiento in vitro de explantes florales (pétalos o estaminoides) para la formación de callos embriogénicos, hasta la obtención de embriones somáticos primarios (PSE). La metodología se realizó tomando como referencia los protocolos descritos en la "Guía Técnica de Micropropagación de cacao (*Theobroma cacao* L.)", de la Dirección Regional de Agricultura San Martín y la Estación Experimental Agraria El Porvenir San Martín (Gárate y Delgado, 2020). El proceso comprende cuatro fases, determinadas por el desarrollo de los explantes y las condiciones de cultivo, que se detallan a continuación.

#### 2.1.1 Establecimiento in vitro de explantes florales

Comprende todas las labores que se requieren hasta la obtención del explante, para ser inducido a la formación de embriones somáticos. Incluye la selección de plantas madre, ramas productoras, colecta, desinfección del material vegetal y extracción de estaminoides.

##### a. Selección de plantas madre

Se seleccionan plantas adultas de cacao, con características deseadas, considerando su alta productividad, tolerancia a las principales enfermedades, precocidad, atributos de fineza, entre otros, así como las cualidades morfológicas y sanitarias que presentan al momento de su selección. Las plantas madre de cacao pueden estar establecidas en campo definitivo o en vivero (imágenes 01 y 02), con la finalidad de disponer de material vegetal joven, fresco y cercano al laboratorio. Las plantas seleccionadas deben rotularse con una etiqueta visible, color azul, para que se diferencien entre frutos y hojas del árbol. Deben contener, además, información como nombre del genotipo, número de planta y fecha, adherida a la rama principal de la planta.



Imagen 01. Plantas adultas de cacao



Imagen 02. Ramas productivas - cojines florales





### b. Colecta de botones florales

La colecta debe realizarse entre las 6 u 8 horas de la mañana, para evitar la apertura de los botones florales en las horas siguientes. Se aíslan botones de 4 a 5 mm. de longitud, con un segmento de pedúnculo. Esto se realiza con ayuda de unas pinzas o tijeras quirúrgicas (imagen 03). La colecta de botones florales debe realizarse de las ramas principales y de la parte media de la planta, luego estas se colocan en frascos con agua destilada (imagen 04) para evitar su deshidratación, ya que son separadas de la planta donadora. Los frascos con los botones florales deben rotularse con el nombre del genotipo y luego ser trasladados al laboratorio, para su tratamiento superficial e introducción in vitro.



**Imagen 03.** Colecta de botones florales de cacao



**Imagen 04.** Frasco conteniendo botones florales de cacao

### c. Desinfección de botones florales

En el laboratorio se realiza el cambio de frasco y agua destilada a los botones traídos de campo, para evitar el ingreso de contaminantes. En la cámara de flujo laminar, previamente acondicionada, se realiza una inmersión en alcohol al 70% (imagen 05) por espacio de un minuto. Luego se decanta la solución y se realiza una inmersión en Hipoclorito de Sodio (NaOCl) al 1% + 2 gotas de Tween 80 por cada 100 ml. de solución desinfectante (imagen 06), agitar suave y lentamente durante 15 minutos, decantar, finalmente enjuagar con agua destilada estéril por 3 veces, decantar y dejar los botones en el frasco.



**Imagen 05.** Desinfección de botones florales

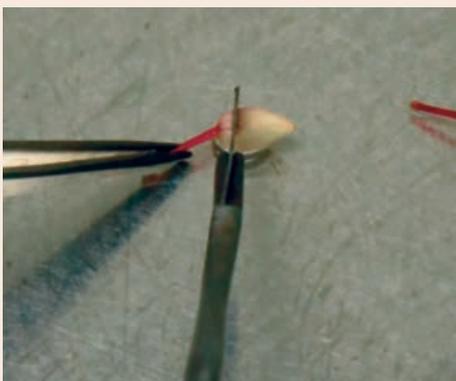


**Imagen 06.** Inmersión de botones florales



#### **d. Disección de botones florales**

Se realiza colocando los botones florales sobre una placa de Petri estéril, para luego hacer un corte transversal al botón con una hoja de bisturí N°10 (imagen 07). Enseguida, con la misma hoja de bisturí, se procede a abrir suavemente los sépalos para que los estaminoides (explantes) queden libres (imagen 08).



**Imagen 07.** Disección del botón



**Imagen 08.** Estaminoides

#### **e. Siembra in vitro**

Los explantes extraídos se colocan en la superficie del medio de cultivo, con la finalidad de que entren en contacto con los componentes del medio. Luego se siembra una flor de cacao con cinco estaminoides o dos flores por placa o tubo de prueba, con medio de cultivo de inducción (imagen 09).

#### **f. Condiciones de cultivo**

Cada fase de cultivo muestra sus condiciones de incubación. En términos generales deben estar a una temperatura de 27°C, fotoperiodo de 16/8 (luz/oscuridad), graduable y dentro de cámara oscura (imagen 10), con la finalidad de aislar los explantes de la luz.



**Imagen 09.** Siembra in vitro



**Imagen 10.** Cámara oscura





### 2.1.2 Primera fase: inducción a la embriogénesis somática

Para la inducción a la embriogénesis somática de cacao se utiliza el medio M1, el cual contiene sales minerales formuladas por Driver y Kuniyuki (1984), hormonas reguladoras de crecimiento para el proceso de inducción (Ver tabla 13) y multiplicación de callos embriogénicos. En este medio de cultivo, los explantes presentan la formación de estructuras callosas en diferentes proporciones, dependiendo del genotipo (imagen 11 y 12). Estos se incuban en oscuridad total, durante 30 días, hasta su transferencia al medio de expresión.



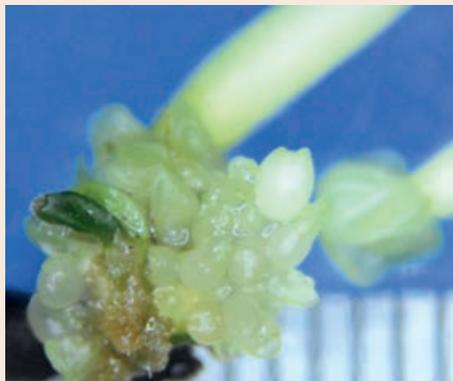
**Imagen 11.** Estaminoide inducido



**Imagen 12.** Estaminoide con formaciones de callo

### 2.1.3 Segunda fase: expresión

Luego de permanecer los explantes en medio de inducción y multiplicación, los callos son conservados por 30 días en un medio de cultivo libre de hormonas. Terminado ese tiempo, vuelven a ser cultivados en el mismo tipo de medio de cultivo, hasta la formación de embriones somáticos primarios (imágenes 13 y 14), reflejándose de esta forma la fase de expresión (Ver tabla 14). Los explantes continúan en oscuridad hasta que los embriones somáticos lleguen a la fase torpedo o cotiledonar temprano.



**Imagen 13.** Clúster de embriones somáticos primarios



**Imagen 14.** Callo madre con embriones



### 2.1.4 Tercera fase: maduración

Los embriones somáticos en estado torpedo y cotiledonar temprano (imagen 15), son transferidos del medio de expresión al medio de maduración, el cual presenta una combinación de sales minerales (Murashige y Skoog, 1962; Driver y Kuniyuki, 1984), además de una hormona inductora de enraizamiento (Ver tabla 15). Los embriones se exponen a luz tenue hasta alcanzar el estado cotiledonar maduro (imagen 16), para luego pasar a la última etapa de crecimiento, que es el medio de conversión a planta.



Imagen 15. Embrión en estado cotiledonar temprano



Imagen 16. Embrión en estado cotiledonar maduro

### 2.1.5 Cuarta fase: conversión

El embrión somático en etapa cotiledonar maduro (imagen 17) es transferido a un medio de cultivo de conversión a planta, el cual contiene ácido indolbutírico (AIB) como medio de inducción a la formación de raíces (imagen 18) (ver tabla 16). Cabe señalar que, en esta fase, también se forman hojas verdaderas en los embriones somáticos. Estos se exponen a luz total por 20 días.



Imagen 17. Embrión somático en estado cotiledonar maduro y hoja verdadera



Imagen 18. Embrión somático con formación de raíz





## 2.2. Enraizamiento de estaquillas de cacao (*Theobroma cacao* L.) en microtúnel

Para lograr un adecuado proceso de inducción para el enraizamiento de las estaquillas, es necesario establecer un invernadero con condiciones para lograr controlar tres factores principales: a) una reducción en la actividad fotosintética (malla sombra 80%), b) una humedad relativa alta (80 a 90%) y c) una temperatura ambiente entre 30 y 35°C. (Holguin y Zúñiga 2015). Dentro del invernadero debe establecerse un área de trabajo que permita la construcción de los microtúneles con plástico agrícola, procurando forrar todos sus lados (imagen 19). Cabe resaltar que los microtúneles deben tener una línea de riego con control semiautomatizado de aspersión y nebulización.



Imagen 19. Microtúneles

### 2.2.1 Proceso de inducción del enraizamiento de estaquillas

A continuación, de manera secuencial, se describen las principales etapas que permiten lograr el enraizamiento de estaquillas en el cultivo de cacao:

#### a) Selección de plantas madre

Al seleccionar las plantas madre de genotipos de cacao, en estas se deben buscar características deseables como sanidad, precocidad, alta productividad y tolerancia a las principales plagas y enfermedades. Además, no deben presentar deficiencias nutricionales y deben tener buena conformación. Los árboles de cacao pueden estar ubicados en campo definitivo (imagen 20) o en vivero (imagen 21), con la finalidad de disponer de material vegetal cercano al vivero.





Imagen 20. Planta madre de cacao en campo



Imagen 21. Planta madre de cacao en vivero

### b) Colecta de estaquillas

Para la colecta de material vegetal, se deben desinfectar las herramientas a utilizar en una solución de 0,5% de NaOCL (hipoclorito de sodio). La colecta de estaquillas de cacao se realiza en horas de la mañana, entre las 6:00 y 8:00 am., cortadas a 0,30 m de la punta de la rama seleccionada. Por lo general estas deben presentar un grosor igual al de un lápiz y exhibir una coloración de verde oscuro a café en la parte basal, y verde claro en la parte apical (imagen 22). Luego se trasladan al vivero para su tratamiento superficial e introducción al microtúnel (imagen 23).



Imagen 22. Selección de estaquillas



Imagen 23. Colecta de estaquillas

### c) Preparación de material vegetal

En la preparación de material, se cortan dos terceras partes las hojas cuando son grandes y a la mitad cuando son pequeñas, con la finalidad de evitar la deshidratación de las estaquillas. Finalmente, estas se cortan en forma de bisel en la parte basal, dejando de 3 a 4 hojas. La estaquilla debe presentar una longitud aproximada de 16 cm. (imagen 24).



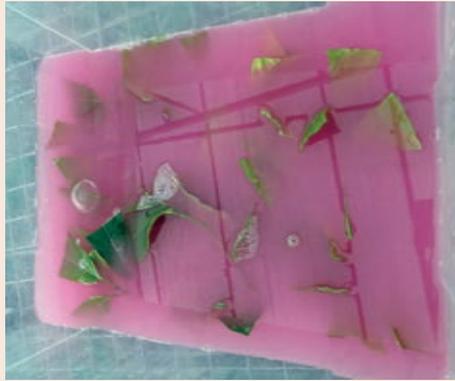
Imagen 24. Disección de ramillas





#### **d) Desinfección de estaquillas**

Con el fin de protegerlas del ataque de hongos, las estaquillas se introducen en una solución de fungicida (imagen 25) (Flutolanil + Captan a razón de 2 g/L de agua) por 10 minutos. Luego se dejan escurrir por 3 minutos (imagen 26).



**Imagen 25.** Desinfección de estaquillas



**Imagen 26.** Escurrido de estaquillas

#### **e) Aplicación de hormona**

Para la preparación de 100 ml. de hormona, en una balanza analítica se procede a pesar 0,6 g. de ácido indolbutírico (AIB). Luego se diluye en alcohol de 96° y de esta forma se obtiene una solución de hormona a 6000 ppm.

Una vez seca la estaquilla, aproximadamente 3 centímetros de la base son sumergidos en la solución hormonal antes mencionada durante 5 segundos (imagen 27), dejándose airear para eliminar el exceso de solución hormonal (imagen 28).



**Imagen 27.** Aplicación de hormona



**Imagen 28.** Aireado de estaquilla



#### f) Preparación de sustrato

Antes de la siembra de estaquillas es necesario preparar el sustrato y habilitar los contenedores (bandejas forestales). Se recomienda utilizar una relación 2:1, A (turba) y B (fibra de coco), los cuales vienen desinfectados, están libres de patógenos y contienen una adición de nutrientes. Su alta porosidad, de hasta 95%, hace que tengan una excelente distribución de aire y agua, favoreciendo el crecimiento uniforme de las plántulas. Estas se mezclan e hidratan para su llenado en bandejas forestales (imagen 29).



Imagen 29. Bandejas conteniendo sustrato

#### g) Siembra de estaquillas

Las estaquillas se siembran a una profundidad de 3 a 5 cm., buscando que queden firmes en el sustrato. Las hojas son dispuestas de forma inclinada, con la finalidad de evitar traslape entre una estaquilla y otra (imagen 30).



Imagen 30. Siembra de estaquillas





### **h) Acondicionamiento de estaquillas en el microtúnel**

Las bandejas sembradas se introducen en el microtúnel (imagen 31) para iniciar el proceso de enraizamiento. Este ambiente debe permanecer cerrado, a fin de mantener las condiciones ambientales idóneas. Solo debe ser abierto para el monitoreo, las evaluaciones y/o tratamientos respectivos.



**Imagen 31.** Acondicionamiento en microtúnel

### **i) Condiciones de incubación**

Para un correcto enraizamiento de las estaquillas, las condiciones de humedad en el interior del microtúnel deberá mantenerse en un 80-90% y la temperatura promedio de 29°C +/- 3°C. Estos dos factores pueden ser controlados por un sistema semiautomatizado (imagen 32), para lo cual el sistema de riego por nebulización debe funcionar con una frecuencia de 15 minutos durante 1 minuto. Las estaquillas permanecerán ahí por espacio de 6 a 8 semanas. Es preciso mencionar que el sistema de microaspersión y su frecuencia deberán instalarse sobre los microtúneles, los cuales también deben ser controlados por otro sistema semiautomatizado (imagen 33).



**Imagen 32.** Sistema semiautomatizado



**Imagen 33.** Riego externo de microtúnel



## 2.2.2 Proceso de aclimatación de estaquillas de cacao

Transcurrido el proceso de enraizamiento, es preciso iniciar el proceso de pre aclimatación y aclimatación de las estaquillas enraizadas, de acuerdo al siguiente procedimiento:

### a) Pre aclimatación

Luego de 6 a 8 semanas de iniciado el proceso de enraizamiento, se inicia la fase conocida como pre aclimatación. Que consiste en abrir progresivamente la puerta del microtúnel. El primer y segundo día, se debe abrir la puerta por un periodo de una hora, a partir del tercer día se le adiciona una hora más, y así sucesivamente, hasta completar las ocho horas diarias de apertura del microtúnel. La etapa de pre aclimatación deberá efectuarse por un periodo de nueve días (imagen 34).



Imagen 34. Fase final de pre aclimatación

### b) Preparación de sustrato

Culminado el proceso de pre aclimatación, se procede a la preparación del sustrato que a continuación se describe:

Se utiliza sustrato en una proporción de 1:1:0.5:0.25 (1 parte de tierra negra, 1 parte de cascarilla de arroz, 0.5 parte de fibra de coco y 0.25 parte de materia orgánica humificada) (imagen 35). Esta mezcla dará condiciones apropiadas al sustrato en las bolsas almacigueras de 2 kg. de capacidad, impidiendo que se compacte (imagen 36).





**Imagen 35.** Preparación del sustrato



**Imagen 36.** Llenado de bolsas

### c) Siembra de estaquillas

Las estaquillas enraizadas son trasplantadas a las bolsas almacigueras mencionadas previamente (imagen 37). Luego son trasladadas a un área del vivero con un sombreadamiento del 50%, con la finalidad de simular las condiciones ambientales de campo. Concluida esta fase, cuya duración es de alrededor de tres meses, las plantas están aclimatadas y listas para ser instaladas en campo definitivo (imagen 38).



**Imagen 37.** Transporte a bolsas almacigueras



**Imagen 38.** Plantas de 3 meses

### d) Manejo nutricional

Con el objeto de obtener plántulas con un buen desarrollo antes de ser trasladadas a campo definitivo, estas deberán ser sometidas a un plan nutricional, de acuerdo al siguiente detalle:



Tabla 02. Aplicación de fertilizantes (Imagen 39)

PRODUCTO	DESCRIPCIÓN	DOSIS	PERÍODO
A	Solución hidropónica macro elementos	10 ml/L	Semanal
B	Solución hidropónica microelementos	4 ml/L	Semanal
Yara Mila Complex	Fertilizante complejo NPK, con 9 nutrientes esenciales	3-5g/planta bolsa	c/30 días
EKOTRON® 70 GR	Abono orgánico con 70% de ácidos húmicos totales provenientes de LEONARDITA	25 kg/Tn sustrato	1 sola aplicación

Tabla 03. Aplicación de fertilizantes foliares

PRODUCTO	DESCRIPCIÓN	DOSIS	PERÍODO
<b>Quimifol</b> 600 PLUS	Fertilizante foliar: NPK 20-20-20 + Microelementos	5g/L	c/15 días
<b>Enziprom®</b>	Fertilizante foliar: Bioactivador fisiológico con aminoácidos y vitamina B1	2.5 ml/L	c/15 días
<b>Bayfolan</b>	Fertilizante foliar: <b>11-8-6</b> (N-P-K) con contenido adicional de aminoácidos	5ml/L	c/15 días
<b>Silwet</b>	Coadyuvante siliconado	0.5ml/L	c/15 días
<b>LANCER</b>	Insecticida: Imidacloprid	1ml/L	c/15 días

### e) Control fitosanitario

Con fin de brindar sanidad a las plantas se aplican los siguientes productos:

Tabla 04. Aplicación de fertilizantes foliares

PRODUCTO	DESCRIPCIÓN	DOSIS	PERÍODO
PARACHUPADERA 740 PM	Fungicida: Flutolanil + Captan	2 g/L	Inducción
<b>Sportak</b> 45 EC	Fungicida: Procloraz	1ml/L	Condiciona
<b>BENZOMIL®</b> 500	Fungicida: Benomyl	5g/L	Condiciona





**Imagen 39.** Fertilización foliar a plántulas aclimatadas



**Imagen 40.** Control fitosanitario a plantas madre

### 2.2.3 Siembra de estaquillas en campo definitivo

Después del proceso de obtención de plántulas por enraizamiento de estaquillas (periodo que podría durar aproximadamente entre 5 a 6 meses y que está en función al grado de madurez de las estacas, del tipo de genotipo, sustrato y otras condiciones), estas se siembran en campo definitivo (imágenes 41 y 42).

Para este proceso se realizan hoyos con una profundidad y diámetro aproximado de 20 y 30 cm. respectivamente. Además, antes de la siembra del cacao, se procede a mejorar las condiciones de fertilidad del suelo, mediante el sembrío de la especie denominada *Canavalia ensiformis* (Canavalia) (imagen 43). Esta permite mejorar las características químicas y biológicas del suelo, a través del aporte de materia orgánica y mediante la fijación de nitrógeno. Al momento de realizar la siembra en campo definitivo las plantas deben poseer hojas verdaderas, con la finalidad de estimular el proceso de fotosíntesis y permitir que vayan adaptándose favorablemente al ambiente. Luego, las plantas deben ser nutridas mediante un plan de abonamiento riguroso.



**Imagen 41.** Genotipo ICS 39 sembrado en campo definitivo





**Imagen 42.** Genotipo de cacao sembrado en suelo con incorporación de materia orgánica procedente de la especie Canavalia



**Imagen 43.** Incorporación de Canavalia en el suelo





# CAPÍTULO III.

## Resultados de investigación

### 3.1 Resultados en embriogénesis somática

#### 3.1.1 Contaminación y oxidación fenólica

Con el protocolo de desinfección utilizado, se alcanzó un 100% de explantes libres de contaminantes. Un minuto en alcohol y 15 minutos de inmersión en Hipoclorito de sodio al 1% con Tween fueron determinantes para tener éxito en esta variable. Así mismo, no se ha observado la exudación de sustancias fenólicas de los explantes en el medio de cultivo, el cual puede afectar al desarrollo de estos, por lo que tampoco fue necesario agregar antioxidantes al medio de cultivo o hacer algún procedimiento a los explantes.

#### 3.1.2 Respuesta callogénica en genotipos de cacao

Tabla 05. Respuesta callogénica en 5 genotipos de cacao

Genotipo	%FC
CWG-2	91.00
TSH-565	86.05
CWG-1	83.25
CCN-51	76.50
CJO-1	96.90

Todos los genotipos estudiados obtuvieron un porcentaje de frecuencia callogénica superior al 76,50%, es decir, de formación de callo sobre el estaminoide. Aunque todos los genotipos de cacao han tenido altos porcentajes de formación de callos, no todos han formado embriones somáticos.

#### 3.1.3 Número de Embriones Somáticos (NES) en genotipos de cacao

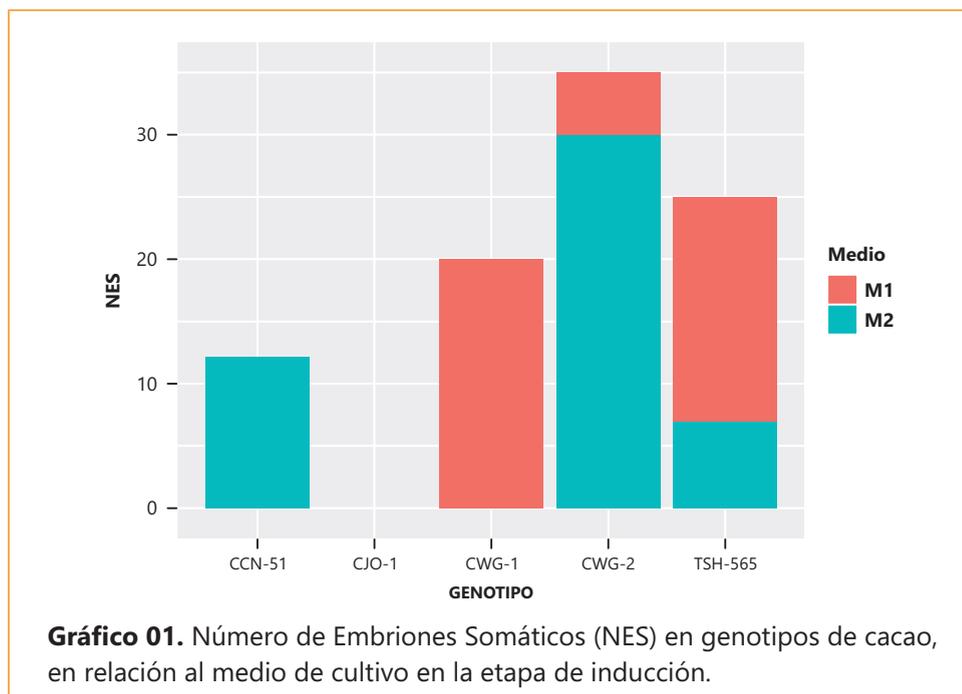
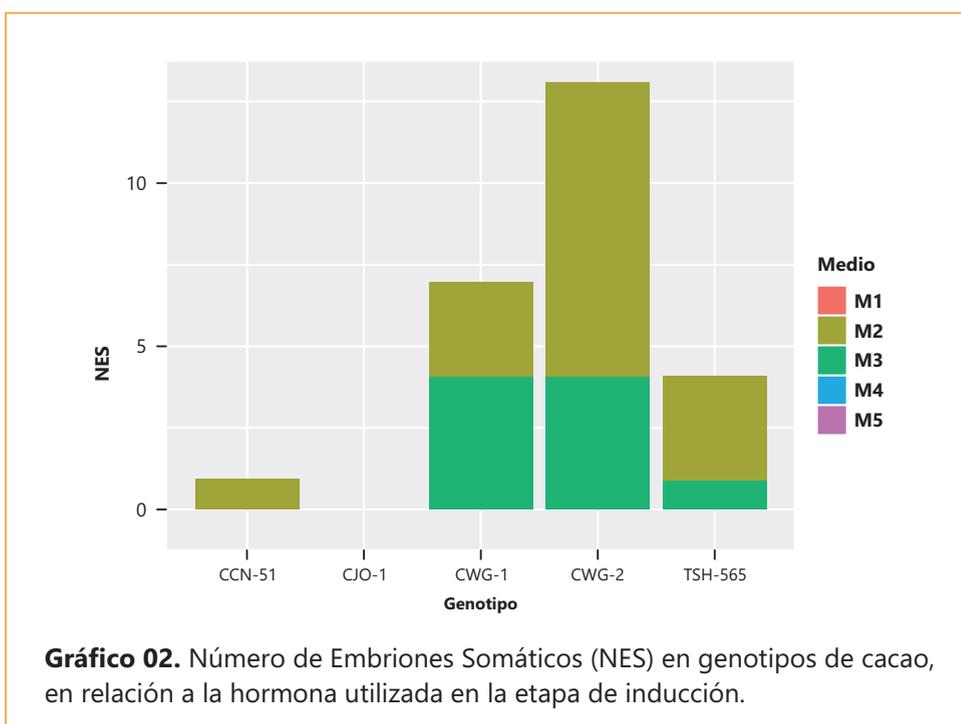


Gráfico 01. Número de Embriones Somáticos (NES) en genotipos de cacao, en relación al medio de cultivo en la etapa de inducción.



En el gráfico 01 se puede observar el comportamiento del genotipo, en relación al medio de cultivo utilizado en la etapa de inducción a la embriogénesis somática: i. M1 (secuencia Guiltinan et al, 2010) y ii. M2 (secuencia Fontanel et al., 2002). Se han obtenido embriones somáticos en los genotipos CCN-51, CWG-1, CWG-2 y TSH-565. Resalta el hecho de que los genotipos CWG-1 y TSH-565 se comportaron mejor en el medio M1, en tanto los genotipos CCN-51 y CWG-2 se comportaron mejor en el medio M2. Considerando los resultados generales se ha optado por utilizar el medio M2 para inducción a la embriogénesis somática en diferentes genotipos de cacao.



El Gráfico 02 muestra el comportamiento del genotipo, en relación a la hormona utilizada en la etapa de inducción a la embriogénesis somática: i. M1 (Sin hormona), ii. M2 (Kinetina 1), iii. M3 (Kinetina 2), iv. M4 (Bencil-aminopurina 1) y v. M5 (Bencil-aminopurina 2). Se han obtenido embriones somáticos en los genotipos CCN-51, CWG-1, CWG-2 y TSH-565. Los genotipos CWG-1 y CWG-2 se comportaron mejor en el medio M3. En tanto los genotipos CCN-51, CWG-1, CWG-2 y TSH-565 se comportaron mejor en el medio M2. Considerando los resultados generales se ha optado por utilizar el medio M2 suplementado con Kinetina (dosis menor), para la inducción a la embriogénesis somática en diferentes genotipos de cacao.





### 3.1.4 Formulación de soluciones stock

Las soluciones stocks se prepararon según Gultinan et al. (2010).

**Tabla 06.** Solución de stock de macronutrientes DKW A (10X)

Solución A	1000 ml
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	14,160 g
Ca (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> . 4H <sub>2</sub> O	19,690 g

**Tabla 07.** Solución de stock de macronutrientes DKW B (10X)

Solución B	1000 ml
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	1,490 g
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	15,590 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	7,400 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,650 g

**Tabla 08.** Solución de stock de macronutrientes M&S

Stock	Reactivo	250 ml
A	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	20,6250 g
B	KNO <sub>3</sub> Na-EDTA	23,7500 g 0,4663 g
G	FeSO <sub>4</sub> . 7 H <sub>2</sub> O	0,3475 g

Formulación según Murashige & Skoog (1962)

**Tabla 09.** Solución de stock de micronutrientes DKW (100X)

Reactivo	1000 ml
Zn (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> . 6 H <sub>2</sub> O	1,700 g
MnSO <sub>4</sub> . H <sub>2</sub> O	3,340 g
CuSO <sub>4</sub> . 5 H <sub>2</sub> O	0,025 g
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,480 g
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> . 2 H <sub>2</sub> O	0,039 g
FeSO <sub>4</sub> . 7 H <sub>2</sub> O	3,380 g
Na-EDTA	4,540 g

**Tabla 10.** Solución de stock de vitaminas DKW A (1000X)

Vitamina	100 ml
Myo-Inositol	10,0 g
Thiamina-HCL	0,2 g
Ácido Nicotínico	0,1 g
Glycina	0,2 g

**Tabla 11.** Solución de stock de aminoácidos DKW B (1000X)

Aminoácido	100 ml
Arginina	43,55 g
Glycina	18,76 g
Leucina	32,80 g
Lysina	45,65 g
Tryptophano	51,05 g

**Tabla 12.** Solución de stock de reguladores de crecimiento (1000X)

Reactivo	100 ml
2,4 Diclorofenoxi acético - 2.4 D (1mg/L)	0,1 g
Kinetina - KIN (1mg/l)	0,1 g
Ácido Indolbutírico AIB (1mg/L)	0,1 g

**Nota:** las soluciones stock deben ser almacenadas a 4° C y cambiadas cada 30 días.



### 3.1.5 Formulaciones de medios de cultivo

Los medios de cultivo se han formulado según Gultinan et al. (2010), Fontanel et al. (2002), Osorio et al. (2022), aunque han sido modificados según los resultados obtenidos en la investigación.

**Tabla 13.** Medio de inducción - M1

Insumos	1,000 ml
Macro DKW A	100 ml
Macro DKW B	100 ml
Micro DKW	10 ml
Vitaminas DKW	1 ml
Glucosa	30 g
Myo-Inositol	100 mg
2,4-D (solución stock 1mg/ml)	1 ml
Kinetina (solución stock 1mg/ml)	150 µl
pH 5.8	
Agar Agar	10 g
Esterilizar en Autoclave	20 min.

**Tabla 14.** Medio de expresión de embriones - M2

Insumos	1,000 ml
Macro DKW A	100 ml
Macro DKW B	100 ml
Micro DKW	10 ml
Vitaminas DKW	1 ml
Sacarosa	1 g
Glucosa	30 g
Myo-Inositol	100 mg
pH 5.8	
Agar Agar	10 g
Esterilizar en Autoclave	20 min.

**Tabla 15.** Medio de maduración de embriones - M3

Insumos	1,000 ml
Macro Murashige y Skoog (1962)	10 ml
Micro DKW	10 ml
Vitaminas DKW	1 ml
AIB - Ácido indolbutírico	0.01 ml
Glucosa	20 g
Sacarosa	10 g
Agar Agar	10 g
Aminoácidos	1ml
pH 5.8	
Esterilizar en autoclave	20 min.

**Tabla 16.** Medio de conversión a planta - M4

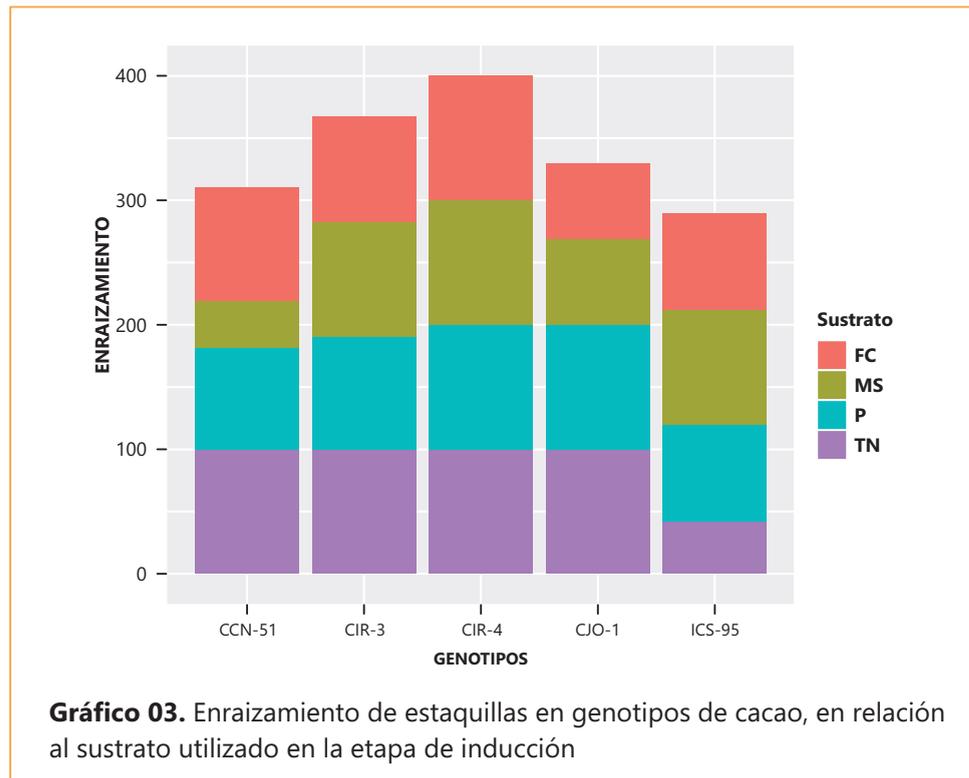
Insumos	1,000 ml
Macro Murashige y Skoog (1962)	10 ml
Micro DKW	10 ml
Vitaminas DKW	1 ml
Sacarosa	5 g
Glucosa	10 g
Myo-Inositol	100 mg
pH 5.8	
Agar Agar	10 g
Esterilizar en autoclave	20 min.





## 3.2 Resultados en enraizamiento de estaquillas

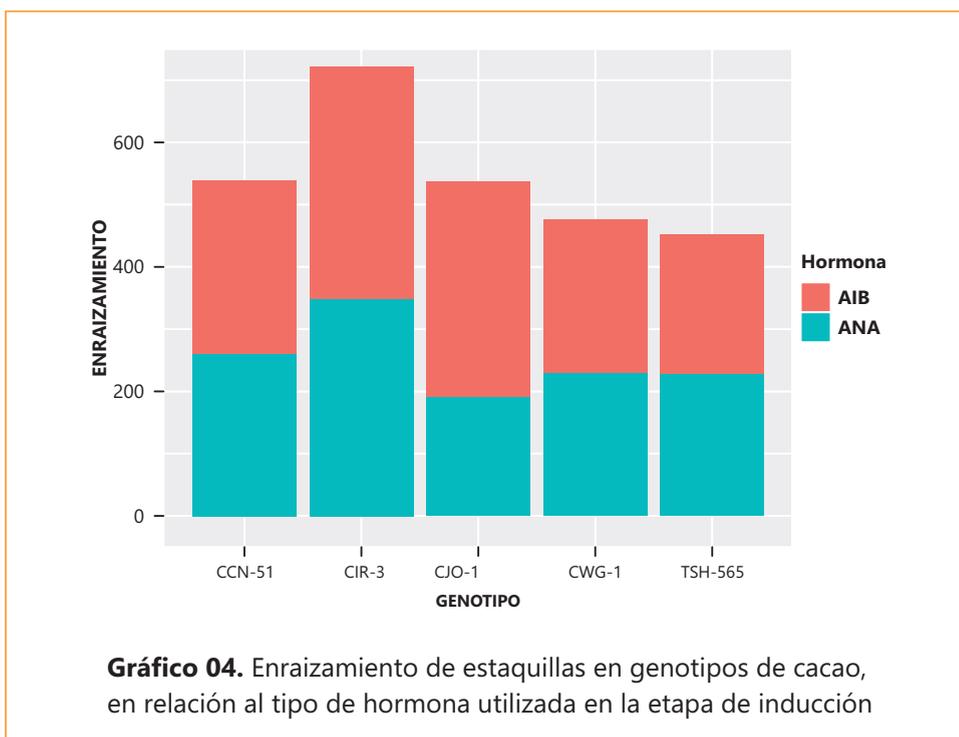
### 3.2.1 Enraizamiento de estaquillas en genotipos de cacao, en relación al sustrato utilizado



En el gráfico 03, se muestran los resultados del comportamiento de los genotipos de cacao, en relación al sustrato utilizado en la etapa de inducción al enraizamiento de sus estaquillas: i. FC (fibra de coco), ii. MS (musgo Sphagnum), iii. P (turba) y iv. TN (tierra negra). Se ha obtenido enraizamiento de estaquillas en los genotipos CCN-51, CIR-3, CIR-4, CJO-1 e ICS-95, cada uno con diferentes proporciones, según influencia de los sustratos estudiados. Los genotipos CCN-51, CIR-3, CIR-4 y CJO-1 se comportaron mejor en TN. En tanto que, los genotipos CIR-4, CJO-1 e ICS-95 se comportaron mejor en P. Considerando los resultados generales, se ha optado por utilizar el sustrato P, para la inducción al enraizamiento de estaquillas de los diferentes genotipos de cacao en estudio, por presentar mejores características de textura, las cuales brindan condiciones adecuadas de aireación y porosidad al sustrato de enraizamiento.



### 3.2.2 Enraizamiento de estaquillas en genotipos de cacao, en relación al tipo de hormona utilizada



En el gráfico 04 se puede observar el comportamiento del genotipo en relación a la hormona utilizada en la etapa de inducción al enraizamiento de estaquillas de cacao: i. AIB (ácido-indolbutírico) y ii. ANA (ácido-naphtalenacético). Se ha obtenido enraizamiento de estaquillas de todos los genotipos estudiados bajo el efecto de las dos hormonas. Según los resultados, se puede observar que la hormona AIB actuó mejor en los cinco genotipos de cacao.





# Cronología

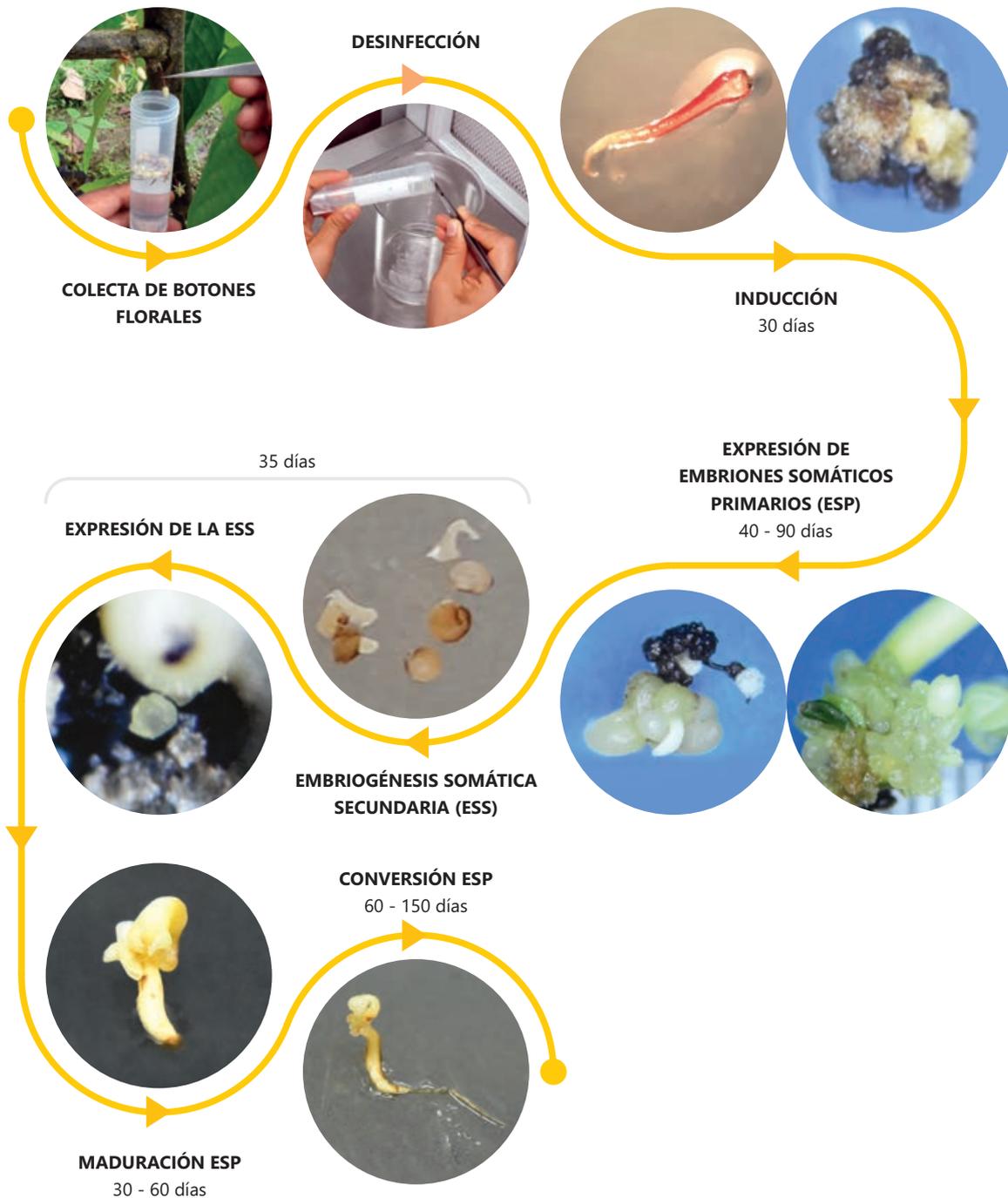


# ETAPAS DE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA PRIMARIA EN CACAO





## LÍNEA DE TIEMPO DEL PROCESO DE EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA PRIMARIA



**8 - 12 MESES**



## Consideraciones finales

Finalmente, a través de ambas técnicas de propagación (enraizamiento de estaquillas y embriogénesis somática), se abren posibilidades de innovar el sistema productivo de este cultivo, incluyendo ventajas considerables, como las de acortar su ciclo productivo y mantener la genética de los clones de importancia nacional y regional. Así mismo, se promueve la conservación, rescate y promoción de la investigación en cacao nativos de origen en la región San Martín, entre otras. Por ello, resulta clave seguir profundizando las investigaciones científicas, con la finalidad de validar registros agronómicos importantes como los niveles de precocidad, productividad, índice de mazorca, arquetipo, planes de abonamiento, etc.

Es así que, bajo este contexto, se hace extensiva la invitación para que instituciones públicas y privadas puedan sumarse al esfuerzo de seguir ampliando y fortaleciendo investigaciones contextualizadas en ambas formas de propagación, con la finalidad de validar paquetes tecnológicos de manejo innovadores del cultivo que se justifiquen, social, económica y ambientalmente.





# Glosario

## **MICROPROPAGACIÓN**

Consiste en tomar pequeñas secciones del tejido de una planta o estructuras enteras y cultivarlas en condiciones artificiales para regenerar plantas completas.

## **EXPLANTE**

Es un tejido vivo separado de su órgano propio y transferido a un medio artificial de crecimiento.

## **IN VITRO**

El cultivo in vitro es una técnica que se utiliza en diversos campos de la biología para mantener organismos vivos, o partes de estos, bajo condiciones controladas dentro de un laboratorio.

## **PROPAGACIÓN**

Consiste en utilizar partes vegetativas de una planta que conserven la potencialidad de multiplicación y diferenciación celular, para generar nuevos tallos y raíces.

## **PROTOCOLO**

Son las consideraciones que se deben tomar en cuenta para implementar y organizar una investigación o un experimento científico.

## **Tween 80**

Es un desinfectante, solvente en agua, con propiedades y acción protectora.



## Referencias

Arguello, L. (2018). *Tecnología aplicada a cultivares de cacao (Theobroma cacao L.) en el cantón Naranjal, provincia del Guayas*. Universidad de Guayaquil.

Benito, S. (1992). *Tecnificación del cacao en la Selva Alta Peruana*. Fundación para el Desarrollo del Agro.

Cordero, F; Montalván, O y Flores, O. (2011). *Tipos de enraizadores en varetas de cacao (Theobroma cacao L.) comunidad Carao*.  
<https://doi.org/10.5377/rci.v14i1.1501>

Chanatásig, C. y Aguilar, M. (2004). *Inducción de la embriogénesis somática en clones superiores de cacao (Theobroma cacao L.), con resistencia a enfermedades fungosas*. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza.

Díaz, A.; Sánchez, D.; Valera, J. y Vegas, A. (2015). *Formación de embriones somáticos en cinco cultivares de Theobroma cacao L. cultivados en Venezuela*. Biotecnología Vegetal, 15 (1), 27 - 34.

Driver, D. y Kuniyuki, D. (1984). *In vitro propagation of Paradox walnut rootstock*. HortScience, 19, 507-509.

Durán, F. (2011). *Cultivo y explotación del cacao*. Editorial Grupo Latino Editores S.A.S.

Fontanel, A.; Gire, S.; Labbe, G.; Favereau, P.; Alvarez, M.; Von, S. y Petiard, V. (2002). *In vitro multiplication and plant regeneration of Theobroma cacao L. via stable embryogenic calli*. IAPTC Congress Plant Biotechnology, 1, 23-28.

Freire M. (2003). *Aspectos básicos de la embriogénesis somática*. Biotecnología Vegetal, 3 (4), 195-209.

Gárate, M y Delgado, H. (2020). *Guía Técnica de Micropropagación de cacao (Theobroma cacao L.)*. Dirección Regional de Agricultura San Martín y Estación Experimental Agraria El Porvenir San Martín.





Garate, M. y Arévalo, E. (2017). *Induction of Somatic Embryogenesis from Cacao Farmer Field Collection of ICT - Peru*. *Int Ann Sci*, 2 (1), 06-11. <https://doi.org/10.21467/ias.2.1.6-11>

Gárate, M.; Arévalo, E.; Do Bomfim, L. y Da Costa, D. (2017). *Pro embrionary somatic structure of three Cacao Genotypes (Theobroma Cacao L.) using staminode s*. *Int Ann Sci*, 2 (1), 28-32. <https://doi.org/10.21467/ias.2.1.28-32>

Guiltinan, M.J. y Maximova, S.N. (2010). *College of Agricultural Sciences. Integrated System for Vegetative Propagation of Cacao. Protocol Book*. Pennsylvania State University, version 2.1, 4-24.

Hartmann, H. y Kester, D. (2001). *Propagación de plantas. Principios y prácticas*. Compañía Editorial Continental.

Holguin, A. (2015). *Enraizamiento de ramas de cacao (Theobroma cacao L.) CCN-51 utilizando hormonas sintéticas de ácido naftalenacético (ANA) y ácido indolbutírico (AIB)* [tesis de pregrado]. <https://repositorio.uteq.edu.ec/handle/43000/3461>

ICT (2004). *Manejo integrado del cultivo y transferencia de tecnología en la Amazonía Peruana*. Instituto de Cultivos Tropicales.

Maximova, S.; Alemanno, L.; Young, A.; Ferriere, N., Traore, A. y Guiltinan, M. (2002). *Efficiency, genotypic variability, and cellular origin of primary secondary somatic embryogenesis of Theobroma cacao L*. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant*, 38, 252-259.

MIDAGRI (2021). *Observatorio de Commodities: Cacao*. Boletín de publicación trimestral. Dirección General de Políticas Agrarias.

Minyaka, E.; Niemenak, N.; Nankeu, D.; Boudjeko, T. y Omokolo, N. (2004). *Actividades de glutamato deshidrogenasa y glutamina sintasa durante la embriogénesis somática en Theobroma cacao L*. *J Cam Acad Sci*, 4, 306-313.

Murashige, T. y Skoog, F. (1962). *A revised medium for rapid growth and bios assay with tobacco tissue culture*. *Physiol. Plant.*, 15, 473-497.

Osorio, T.; Henao, A.; De la Hoz, T. y Urrea, A. (2022) *Propagation of IMC67 Plants, Universal Cacao (Theobroma Cacao L.) Rootstock via Somatic Embryogenesis*. *International Journal of Fruit Science*, 22 (1), 78-94. <https://doi.org/10.1080/15538362.2021.2023067>

Paz, J.; Delgado, H.; Gárate, M. y Reátegui, E. (2020). *Guía técnica para la propagación clonal del cacao*. Instituto Nacional de Innovación Agraria.



IICA, IHCAFE, CATIE y CIRAD (2011). *Mejoramiento Genético del Café en América Central: selección de clones de Híbridos F1 de Coffea Arabica y desarrollo tecnológico*. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. <https://repositorio.iica.int/handle/11324/7939>

Sánchez, A.; Suárez, E.; González, M.; Amaya, Y.; Colmenares, C. y Ortega, J. (2009). *Efecto del ácido Indolbutírico sobre el enraizamiento de acodos aéreos de guayabo (Psidium guajava L.), en el municipio Baralt, Venezuela. Evaluación preliminar*. Revista UDO Agrícola, 9, 113-120. <http://www.bioline.org.br/pdf?cg09016>

Silva, J.; Montes, S.; Acosta, L.; Arias, E. y García, A. (2005). *Embriogénesis Somática una alternativa para la Propagación, Mejoramiento y Conservación de Germoplasma en Cacao*. Cuadernos de Biodiversidad, 16, 9-12. <https://doi.org/10.14198/cdbio.2005.16.02>

Sodré, G. y Marrocos, P. (2009). *Manual da produção vegetativa de mudas de cacaueteiro*. Ilhéus: Editus, 46.

Suárez, I. (2020). *Cultivo de tejidos vegetales*. Ed. Fondo Editorial Universidad de Córdoba.

Von Arnold, S.; Sabala, I.; Bozhkov, P.; Dyachok, J. y Filonova, L. (2002) *Developmental pathways of somatic embryogenesis*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 69 (3), 233-249. <https://doi.org/10.1023/A:1015673200621>

Williams, E. y Maheswaran, M. (1986). *Somatic embryogenesis: Factors influencing coordinated behaviour of cell as an embryogenic group*. Annals of Botany, 57, 443-462.

Yang, X. y Zhang, X. (2010). *Regulación de la embriogénesis somática en plantas superiores*. Reseñas críticas en ciencia vegetal, 29, 36-57.

Zambrano, J. (2018). *Conservación y viabilidad del ácido alfa-naftalenacético en el enraizamiento de estacas de cacao (Theobroma cacao L.) CCN-51 de origen trinitario*. UTEQ.





SE TERMINÓ DE IMPRIMIR EN LOS TALLERES GRÁFICOS DE

**TAREA ASOCIACIÓN GRÁFICA EDUCATIVA**

PASAJE MARÍA AUXILIADORA 156 - BREÑA

CORREO E.: [tareagrafica@tareagrafica.com](mailto:tareagrafica@tareagrafica.com)

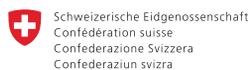
PÁGINA WEB: [www.tareagrafica.com](http://www.tareagrafica.com)

TELÉFS.: 424-8104 / 424-3411

JULIO 2022

LIMA - PERÚ





Departamento Federal de Economía,  
Formación e Investigación DEFI  
**Secretaría de Estado para Asuntos Económicos SECO**



**San Martín**  
GOBIERNO REGIONAL  
*¡El pueblo está primero!*