



**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA
SEDE QUITO
CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA**

**EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS PARA EL ESTABLECIMIENTO *IN VITRO* DE
CACAO (*Theobroma cacao* L.)**

**Trabajo de titulación previo a la obtención del título de:
Ingeniera Biotecnóloga**

AUTOR: SHIRLEY LIZBETH LLUMIQUINGA SUNTAXI

TUTOR: IVONNE DE LOS ÁNGELES VACA SUQUILLO

Quito-Ecuador

2025

**CERTIFICADO DE RESPONSABILIDAD Y AUTORÍA DEL TRABAJO DE
TITULACIÓN**

Yo, Shirley Lizbeth Llumiquinga Sntaxi con documento de identificación N° 1727588137;
manifiesto que:

Soy el autor y responsable del presente trabajo; y, autorizo a que sin fines de lucro la
Universidad Politécnica Salesiana pueda usar, difundir, reproducir o publicar de manera total o
parcial el presente trabajo de titulación.

Quito, 04 de agosto del año 2025

Atentamente,

Shirley Ll.

Shirley Lizbeth Llumiquinga Sntaxi
1727588137

**CERTIFICADO DE CESIÓN DE DERECHOS DE AUTOR DEL TRABAJO DE
TITULACIÓN A LA UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA**

Yo, Shirley Lizbeth Llumiquinga Sntaxi con documento de identificación No.1727588137, expreso mi voluntad y por medio del presente documento cedo a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que soy autor del Trabajo experimental: “Evaluación de protocolos para el establecimiento *in vitro* de cacao (*Theobroma cacao* L.)”, el cual ha sido desarrollado para optar por el título de: Ingeniera Biotecnóloga, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En concordancia con lo manifestado, suscribo este documento en el momento que hago la entrega del trabajo final en formato digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.

Quito, 04 de agosto del año 2025

Atentamente,

Shirley Ll.

Shirley Lizbeth Llumiquinga Sntaxi
1727588137

CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, Ivonne De Los Ángeles Vaca Suquillo con documento de identificación N° 1714726906, docente de la Universidad Politécnica Salesiana , declaro que bajo mi tutoría fue desarrollado el trabajo de titulación: Evaluación de protocolos para el establecimiento *in vitro* de cacao (*Theobroma cacao* L.), realizado por Shirley Lizbeth Llumiquinga Suintaxi con documento de identificación N° 1727588137, obteniendo como resultado final el trabajo de titulación bajo la opción Trabajo experimental que cumple con todos los requisitos determinados por la Universidad Politécnica Salesiana.

Quito, 04 de agosto del año 2025

Atentamente,



Ing. Ivonne Vaca Suquillo. MSc. MBC.

1714726906

Dedicatoria

A Dios por acompañarme y bendecirme a lo largo de mi vida, por darme la oportunidad de culminar este trabajo de investigación y permitirme alcanzar una meta más, gracias por darme salud, fuerza y guiarme en todo momento.

A mis amados padres, Iván y María, con todo el amor y gratitud de mi corazón este logro también es para ustedes, por todas las adversidades que se presentaron en este camino y nunca se rindieron, por siempre brindarme amor y apoyo incondicional.

A mis hermanos, Kevin, Maick, Gabriel por estar presentes acompañándome y ayudándome en todo momento. Son mi motivación.

Agradecimiento

A mis padres, por su sacrificio y lucha constante. Gracias por siempre creer en mí, por confiar y nunca dudar de mis habilidades, por el apoyo y motivación que siempre me dieron, porque nunca dejar que me rinda y motivarme a cumplir mis metas. Todo lo que he logrado es gracias a ustedes y sin su apoyo incondicional no hubiera sido posible.

A mi tutora, Ing. Ivonne Vaca Suquillo MSc., que me brindó la oportunidad de realizar el presente trabajo de investigación. Estoy muy agradecida por todo el tiempo, paciencia, apoyo, y por el conocimiento que me compartió.

A mis amigos Delia, Pame, Alejo, Pao, Nico, Mar por apoyarme y no dejar que me rinda, gracias por su apoyo incondicional en todo momento, porque nunca me dejaron sola en situaciones difíciles y siempre estuvieron motivándome, por hacer más feliz y divertida la vida universitaria con nuestras anécdotas únicas e inigualables. Me llevo los mejores recuerdos para toda la vida.

A mi novio, Francisco, quien me levantó en mis peores momentos, gracias por brindarme tu apoyo y motivación incluso cuando yo misma dudaba de mis capacidades. Por tu paciencia, tus consejos y por siempre estar para mí cuando más lo necesitaba. Gracias de corazón por caminar a mi lado en todo este proceso y por tus palabras de aliento.

Resumen

Theobroma cacao L. es una especie conocida por su importancia económica en Ecuador ya que es uno de los principales productos agrícolas a nivel de exportación. Razón por la cual, su cultivo sigue creciendo; sin embargo, su propagación enfrenta problemas fitosanitarios, debido a la presencia de enfermedades como la monilia (*Moniliophthora roreri*) y la escoba de bruja (*Moniliophthora perniciosa*), que conllevan a grandes pérdidas de hasta un 80% en la producción, por lo que, se presenta al cultivo *in vitro* como una solución para masificar plantas sanas. La presente investigación se dividió en dos fases complementarias: En la primera fase, se realizó una revisión sistemática, se seleccionaron 8 artículos de los últimos 10 años, en función de criterios de inclusión y exclusión. Para la redacción se analizó información sobre el protocolo de desinfección, cuatro autores que usan compuestos como hipoclorito de sodio y fungicidas (azoxistrobina); mientras que, para el cultivo, dos autores sugieren la adición de reguladores de crecimiento para obtener respuesta morfogenética. La segunda fase, se desarrolló en el laboratorio, se evaluaron los mejores tratamientos encontrados en la revisión bibliográfica sobre los explantes yemas, estaminodios y semillas. Para el protocolo de desinfección se evaluó dos concentraciones de NaClO (1,5 y 5%) y azoxistrobina (0,2 y 0,4%), en los explantes de yemas y estaminodios, se encontró el 100% de contaminación fúngica y mortalidad. En semillas, se presentó 100% de germinación, a pesar de ello presentó 100% de contaminación bacteriana. También se encontró una relación directamente proporcional entre el número de raíces y la longitud de tallo. Mientras que en la evaluación de reguladores de crecimiento se estudió 2,4-D (2,2 ppm) y kinetina (1ppm), en los explantes de yemas y estaminodios se halló el 100% de contaminación fúngica y mortalidad. En semillas, se presentó 100% de germinación a pesar del 100% de contaminación bacteriana.

PALABRAS CLAVE: kinetina, 2,4-D, NaClO, azoxistrobina, explantes.

Abstract

Theobroma cacao L. is a specie known for its economic importance in Ecuador, as it is one of the main agricultural products for export. For this reason, its cultivation continues to grow; however, its propagation faces phytosanitary problems due to the presence of diseases such as frosty pod rot (*Moniliophthora roreri*) and witch's broom (*Moniliophthora perniciosa*), which lead to large losses of up to 80% in production. Therefore, *in vitro* cultivation is presented as a solution for mass production of healthy plants. This research was divided into two complementary phases: In the first phase, a systematic review was conducted, and eight articles from the last ten years were selected based on inclusion and exclusion criteria. For the writing, information on the disinfection protocol was analysed, with four authors using compounds such as sodium hypochlorite and fungicides (azoxystrobin); while for cultivation, two authors suggest the addition of growth regulators to obtain a morphogenetic response. The second phase was carried out in the laboratory, where the best treatments found in the literature review on explants, buds, staminodes, and seeds were evaluated. For the disinfection protocol, two concentrations of NaClO (1,5 and 5%) and azoxystrobin (0,2 and 0,4%) were evaluated in bud and staminode explants, where 100% fungal contamination and mortality were found. Seeds showed 100% germination, but also 100% bacterial contamination. A directly proportional relationship was also found between the number of roots and stem length. In the evaluation of growth regulators, 2,4-D (2,2 ppm) and kinetin (1 ppm) were studied. In the explants of buds and staminodes, 100% fungal contamination and mortality were found. In seeds, 100% germination was observed despite 100% bacterial contamination.

KEYWORDS: kinetin, 2,4-D, NaClO, azoxystrobin, explants.

Índice de contenidos

1	Introducción.....	1
2	Fundamentación teórica.....	3
2.1	Origen del cacao.....	3
2.2	Descripción taxonómica.....	3
2.3	Importancia en Ecuador.....	3
2.4	Enfermedades de la planta de cacao.....	4
2.4.1	Escoba de bruja.....	4
2.4.2	Monilia.....	4
2.5	Cultivo <i>in vitro</i> de plantas.....	5
2.6	Fases del cultivo <i>in vitro</i>	5
2.6.1	Fase 0: Selección de la planta madre.....	5
2.6.2	Fase 1: Protocolo de desinfección y siembra.....	6
2.6.3	Fase 2: Multiplicación.....	7
2.6.4	Fase 3: Enraizamiento.....	7
2.6.5	Fase 4: Aclimatación.....	7
2.7	Explantes de cacao.....	8
2.7.1	Cultivo de flores de cacao.....	8
2.7.2	Cultivo de yemas de cacao.....	8
2.7.3	Cultivo de semillas de cacao.....	9
2.8	Reguladores de crecimiento.....	9
2.8.1	Auxinas y citoquininas.....	10
3	Metodología.....	11
3.1	Fase 1: Revisión sistemática.....	11
3.2	Fase 2: Fase de laboratorio.....	12
3.2.1	Evaluación de protocolos de desinfección.....	12
3.2.1.1	Análisis estadístico.....	14
3.2.1.2	Unidad experimental.....	14
3.2.1.3	Diseño experimental.....	14
3.2.1.4	Variables evaluadas.....	14
3.2.2	Fase 2.2: Evaluación de reguladores de crecimiento.....	17
3.2.2.1	Análisis estadístico.....	18
3.2.2.2	Unidad experimental.....	18
3.2.2.3	Diseño experimental.....	18

3.2.2.4	Variables evaluadas.....	19
4	Resultados y discusión	21
4.1	Fase 1: Revisión sistemática	21
4.2	Fase 2: Fase de laboratorio.....	26
4.2.1	Evaluación de protocolos de desinfección	26
4.2.1.1	Explante yemas	26
4.2.1.2	Explante estaminodios.....	28
4.2.1.3	Explante semillas.....	30
4.2.2	Fase 2.2: Evaluación de reguladores de crecimiento	36
4.2.2.1	Cultivo de yemas.....	36
4.2.2.2	Cultivo de estaminodios	38
4.2.2.3	Cultivo de semillas	40
5	Conclusiones	45
6	Bibliografía.....	47
7	Anexos	53

Índice de figuras

Figura 1 Explantes: a. Yemas axilares, b. Flores, c. Semillas.....	15
Figura 2 Escala colorimétrica para explantes de yemas.....	16
Figura 3 Escala colorimétrica para explantes de flores.....	17
Figura 4 Revisión sistemática	21
Figura 5 Contaminación fúngica y bacteriana.....	31
Figura 6 Germinación y N.º de hojas	32
Figura 7 a. N.º de raíces, b. Fotografías de semillas germinadas.....	34
Figura 8 a. Longitud de tallo, b. Correlación número de raíces y longitud del tallo.....	35
Figura 9 Germinación y longitud de tallo	41
Figura 10 a. Gráfica de N.º de raíces y N.º de hojas, b. Fotografía de semillas germinadas mostrando raíces y cotiledones.....	43
Figura 11 Contaminación fúngica y bacteriana.....	44

Índice de tablas

Tabla 1 Clasificación taxonómica del cacao	3
Tabla 2 Concentración de hipoclorito de sodio y azoxistrobina evaluados durante el protocolo de desinfección.....	14
Tabla 3 Reguladores de crecimiento evaluados	18
Tabla 4 Artículos usados en la revisión sistemática.....	22
Tabla 5 Reactivos usados en protocolos de desinfección de cacao.....	23
Tabla 6 Medias y medianas para las variables contaminación fúngica, contaminación bacteriana. Medias para las variables color de tallo y mortalidad.....	27
Tabla 7 Medias para las variables contaminación fúngica y bacteriana, porcentaje de mortalidad.....	29
Tabla 8 Medias para las variables contaminación fúngica y porcentaje de callo, medias y medianas para contaminación bacteriana y brotación.....	37
Tabla 9 Medianas para las variables contaminación fúngica y contaminación bacteriana, medias para presencia de callo.	39

Índice de anexos

Anexo 1 Revisión sistemática PRISMA 53

1 Introducción

Theobroma cacao L. es conocido en el Ecuador como "Pepa de oro" por su influencia en el orden socioeconómico del país; junto con sus derivados, es uno de los productos agrícolas más importantes, convirtiéndose en un elemento de exportación a gran escala (Mendoza et al., 2022). El cultivo de cacao se ha desarrollado desde tiempos ancestrales, actualmente conserva su protagonismo en la economía ecuatoriana, un amplio porcentaje de la población se dedica a la producción y comercialización. Es un importante producto generador de trabajo, ya que se estima que alrededor de 600 000 personas están directamente involucradas en esta actividad. Entre los años 2002 y 2011, su aporte al Producto Interno Bruto (PIB) total fue del 0,57% y al PIB Agropecuario del 6,4% (Morales et al., 2018).

Durante el año 2022 y 2023, Ecuador logró cifras relevantes en la exportación de cacao, enviando al exterior un total de 453 872 toneladas, representando un aumento del 24,38% en comparación al año 2021. Además, las exportaciones de cacao en grano y productos procesados alcanzaron incrementos de 26,03% y 10,39%; respectivamente. Los meses con mayor volumen de exportación fueron octubre y noviembre del 2023, con un valioso crecimiento del 50,64% y 84,27%, respectivamente; en términos de ingresos las exportaciones generaron más de 1 300 millones de dólares en el mismo año (Cedeño, 2024). Según Zambrano (2025), la exportación de cacao sobrepasó a la del banano entre septiembre y noviembre de 2024; situando al cacao en el segundo puesto entre los rubros de los sectores de las exportaciones tradicionales no petroleras y no mineras más importantes del país.

Lastimosamente la propagación de cacao enfrenta importantes problemas fitosanitarios, debido a la presencia de enfermedades como la monilia (*Moniliophthora roreri*) y la escoba de bruja (*Moniliophthora perniciosa*), que conllevan a grandes pérdidas (80% en la producción). Se ha intentado mejorar la genética a través de la selección de árboles élite y la creación de híbridos, pero las técnicas tradicionales de propagación, como el uso de esquejes enraizados e injertos,

no ofrecen resistencia efectiva ante estos patógenos (Sornoza et al., 2022). Por esta razón, propagar cacao de alta calidad, alto rendimiento, resistente a plagas y libre de enfermedades, es esencial para satisfacer la demanda de la industria; el pilar para alcanzar este objetivo es el cultivo de tejidos vegetales Henao et al. (2023), puesto que permite la clonación de material vegetal de élite. Por lo tanto, resulta fundamental perfeccionar los protocolos para este cultivo, con el fin de optimizar su establecimiento, propagación, incluso mejoramiento.

En este contexto, se recomienda iniciar desde la revisión sistemática, que proporcionará resúmenes claros y estructurados de la información disponible y permitirá responder las preguntas planteadas, en este caso sobre cultivo *in vitro* de cacao.

Con base en la revisión sistemática realizada, se identificaron las concentraciones de los reactivos empleados en los protocolos de desinfección, y los reguladores de crecimiento en el medio de cultivo, que han mostrado resultados eficientes. Por ello, se propuso evaluarlos en sus respectivas fases, con la finalidad de optimizar los procesos actuales y favorecer el establecimiento de esta especie en el cultivo de tejidos. En este marco, la presente investigación tiene como objetivo evaluar protocolos para el establecimiento *in vitro* de cacao (*Theobroma cacao* L.) con base en investigaciones previas.

2 Fundamentación teórica

2.1 Origen del cacao

El cacao proviene de la región alta de la cuenca del Amazonas (Brasil, Colombia y Ecuador), donde fue cultivado por civilizaciones precolombinas, convirtiéndose en uno de los primeros productos que se envió a Europa. Desde el siglo XIX, ha sido uno de los productos más importantes en la economía de Ecuador, junto con el café (Barrezueta-Unda et al., 2017). Durante la época precolombina también el cacao fue cultivado en América Central, los indígenas locales lo veían como un regalo de los dioses; por esta razón en 1753, Linnaeus le dio su nombre científico, *Theobroma*, que se traduce como alimento de los dioses (Sornoza et al., 2022).

2.2 Descripción taxonómica

En la Tabla 1 se describe la clasificación taxonómica del cacao, según Imán et al. (2024).

Tabla 1 Clasificación taxonómica del cacao

Reino	Plantae
Subreino	Viridiplantae
Infrareino	Streptophyta
Supervisión	Embryophyta
División	Tracheophyta
Subdivisión	Spermatophytina
Clase	Magnoliopsida
Superorden	Rosanae
Orden	Malvales
Familia	Malvaceae
Género	<i>Theobroma</i>
Especie	<i>Theobroma cacao</i> L.

2.3 Importancia en Ecuador

La “pepa de oro” ha influido en el desarrollo socioeconómico del país durante más de un siglo, de hecho, la economía ecuatoriana se ve conectada con la producción de cacao. Actualmente,

la producción y exportación de cacao son pilares clave de la economía, apreciados globalmente por su aroma y color, especialmente para la industria del chocolate fino. Además, la labor agrícola de los pequeños agricultores es esencial para el reconocimiento y la competitividad de Ecuador en la producción de cacao (Ureta et al., 2023).

2.4 Enfermedades de la planta de cacao

Los cultivos de cacao en Ecuador se enfrentan a dos enfermedades principales, la escoba de bruja y la monilia, que pueden ocasionar graves pérdidas en la producción cacaotera, pudiendo alcanzar el 100% en periodos de alta infección. En los últimos años ha aumentado el número de plantaciones cacaoteras; sin embargo, se ha observado el rebrote de otras enfermedades, entre ellas la mazorca negra (*Phytophthora palmivora*), el mal de machete (*Ceratocystis cacaofunesta*) y la muerte regresiva (*Lasiodiplodia theobromae*), las cuales pueden provocar reducción en la producción, ya que desde la respectiva económica afectan negativamente a productores (Solis et al., 2021). Las técnicas tradicionales de propagación vegetativa del cacao, como injertos y esquejes pueden promover la diseminación de enfermedades como la moniliasis y escoba de bruja, lo que genera pérdidas considerables (Sornoza et al., 2022).

2.4.1 Escoba de bruja

La enfermedad conocida como la escoba de bruja fue descrita en 1895 y se propagó por Sudamérica en 1900, convirtiéndose en endémica. En Ecuador, fue registrada por primera vez en 1918 (Solis et al., 2021). Es causada por el hongo *Moniliophthora perniciosa*, que afecta tejidos en crecimiento acelerado, como nuevos brotes, flores, hojas y frutos, en cualquier fase de desarrollo, generando hipertrofia y un crecimiento anormal (Maldonado, 2015).

2.4.2 Monilia

La monilia, ocasionada por el hongo *Moniliophthora roreri*, constituye una enfermedad endémica que afecta de manera específica a las mazorcas de cacao. En Ecuador, su presencia

fue registrada en 1916, generando pérdidas estimadas entre el 50% y el 80% de la producción. Este hongo se caracteriza por su alta especificidad y su progreso lento, afectando a las mazorcas de cacao en cualquier etapa de su crecimiento; a medida que avanza la infección, el patógeno genera esporas asexuales sobre la superficie del fruto infectado, facilitando su dispersión y perpetuando el ciclo de la enfermedad en los cultivos (Solis et al., 2021).

2.5 Cultivo *in vitro* de plantas

El cultivo *in vitro* permite establecer, conservar y manipular diferentes partes de la planta de interés, que pueden ir desde una célula hasta fragmentos de una planta, conocidos como explantes, en ambientes artificiales, asépticos y controlados. Estas condiciones se utilizan en su mayoría para generar plantas libres de patógenos, eliminando microorganismos como virus, bacterias y hongos, que se encuentran en los tejidos vegetales, mediante la aplicación de varios productos, y técnicas de desinfección y cultivo (Echenique & Calle, 2020).

2.6 Fases del cultivo *in vitro*

2.6.1 Fase 0: Selección de la planta madre

Las principales características de selección de la planta madre son:

Estado fisiológico: Normalmente, se seleccionan plantas que se encuentran en una fase de crecimiento activo, robusto y saludable (Adema, 2015).

Estado sanitario: La selección y el cultivo de la planta madre en un ambiente limpio reduce significativamente la presencia de contaminantes, en especial de los hongos. La principal fuente de contaminación inicial en los cultivos *in vitro* es la planta madre. Una vez que se consigue un explante axénico, cualquier contaminación que aparezca después se atribuye a fallos en la técnica o en el procedimiento; por ello, se recomienda tratar las plantas madre con pretratamientos, para evitar contaminantes (Adema, 2015; Bhoite & Palshikar, 2014).

Edad de la planta: Generalmente la parte joven o inmadura de la planta donante tiene una mejor respuesta en el cultivo de tejidos que la parte adulta o madura (Adema, 2015; Bhoite & Palshikar, 2014).

El tamaño del explante: Afecta la desinfección y la regeneración de las plantas. Los explantes de menor tamaño tienen un riesgo de contaminación más bajo, mientras que los de mayor tamaño promueven un crecimiento y una regeneración más rápida (Adema, 2015).

2.6.2 Fase 1: Protocolo de desinfección y siembra

Hay varios factores a considerar al momento de desinfectar material vegetal de campo (*ex vitro*), para utilizarlo en el cultivo *in vitro*, los más importantes son el genotipo, tipo de explante, procedimiento de desinfección, edad y estado fisiológico, condiciones físicas y químicas de la planta madre (Teixeira da Silva et al., 2019; Wang et al., 2023).

Según Montesinos et al. (2023), entre los compuestos empleados para la desinfección de explantes se incluyen el hipoclorito de sodio (NaClO), hipoclorito de calcio (Ca (ClO)₂), peróxido de hidrógeno (H₂O₂), cloro comercial y bicloruro de mercurio (HgCl₂), entre otros. El más utilizado en la micropropagación vegetal es el hipoclorito de sodio, gracias a su bajo costo, fácil disponibilidad y su menor efecto fitotóxico en los tejidos.

Además, hay otras metodologías para evitar la contaminación *in vitro*, como la aplicación de fungicidas y antibióticos en la planta madre, el explante y/o el medio de cultivo. Los fungicidas y bactericidas son compuestos químicos empleados para prevenir y/o erradicar patógenos o contaminantes en el cultivo de tejidos, y es habitual incorporarlos en el protocolo de desinfección (Bogado et al., 2016).

Posteriormente se realiza la siembra de los explantes en el medio de cultivo seleccionado, el proceso se lleva a cabo en condiciones estériles dentro de una campana de flujo laminar (Sampayo-Maldonado et al., 2016).

2.6.3 Fase 2: Multiplicación

En la fase de multiplicación el medio de cultivo es crucial. En esencia sus elementos básicos son minerales, fuente de carbono (generalmente sacarosa) y agua. También, se incorporan vitaminas (complementos orgánicos), reguladores de crecimiento y agentes gelificantes. Aunque la cantidad de estos componentes varía según la especie, la fórmula sugerida por Murashige y Skoog (1962) es la más empleada para la micropropagación de plantas (Adema, 2015).

Los reguladores del crecimiento en el cultivo de tejidos vegetales son esenciales para controlar la elongación del tallo, la formación de brotes, raíces, organogénesis e inducción de callos mediante concentraciones optimizadas (Correia & Matos, 2024).

2.6.4 Fase 3: Enraizamiento

El proceso de enraizamiento es uno de los eventos fisiológicos más significativos que se lleva a cabo durante el cultivo *in vitro*, ya que influirá en el establecimiento en el invernadero y, posteriormente, en el campo (Fernández et al., 2016). Indacochea et al. (2018), mencionan la necesidad de una fuente externa de auxinas para el enraizamiento de los brotes, y se descubrió que, en general, las más utilizadas en esta etapa son el Ácido naftalenacético (ANA), Ácido indol butírico (AIB) y Ácido indol acético (AIA).

2.6.5 Fase 4: Aclimatación

La aclimatación es un proceso crucial en los sistemas de micropropagación, ya que la eficiencia del procedimiento y la calidad de las plantas generadas *in vitro* dependen de ella. Este proceso permitirá que la planta logre un crecimiento autotrófico en condiciones de menor humedad relativa, con mayor iluminación y sustratos estériles, en contraste con el ambiente artificial donde se encontraba (Indacochea-Ganchozo et al., 2017).

Entre los aspectos más relevantes para la aclimatación de las vitroplantas están el tipo de sustrato y su composición, los cuales son cruciales para lograr una adecuada retención de humedad y proporcionar los nutrientes y agua necesarios para la planta (Espinosa-Reyes et al., 2019). Llor et al. (2024), sugieren lavar las plántulas enraizadas con agua destilada hasta eliminar completamente los restos de agar, que podrían actuar como medio para microorganismos patógenos.

2.7 Explantes de cacao

La elección del explante adecuado es crucial puesto que de ello dependerá la propagación futura; estos pueden provenir de diversas fuentes, como fragmentos de hojas, micro-estacas, raíces, meristemas, entre otros (Martínez, 2015). Echenique & Calle (2020), mencionan que en el cacao el tipo de explante empleado tiene un gran impacto en la contaminación, la supervivencia y la formación de callos.

2.7.1 Cultivo de flores de cacao

Las flores de cacao contienen estaminodios, que son los órganos usados en el cultivo *in vitro*. Estudios acerca del cultivo *in vitro* de cacao, indican que la selección del tipo de explante afecta de manera importante la tasa de contaminación y la generación de callos, por lo que señalan a los estaminodios como el tipo de explante que ofrece un mejor establecimiento *in vitro* para el cacao, permitiendo obtener plántulas libres de enfermedades (Echenique & Calle, 2020).

2.7.2 Cultivo de yemas de cacao

Según Adema (2015), los explantes más frecuentemente utilizados para comenzar la propagación clonal *in vitro* de una planta son las yemas apicales del tallo, estacas uninodales que contienen yemas axilares, con tejido meristemático.

2.7.3 Cultivo de semillas de cacao

La reproducción tradicional en cacao se lleva a cabo a través de sus semillas, un método no recomendable en campo, pues las plantaciones que provienen de semillas muestran una gran diversidad de características, lo que representa un inconveniente, debido a que repercute en los niveles de producción (Hidalgo, 2019). Sin embargo, en estudios realizados por Castañeda et al. (2015), sobre la germinación *in vitro* de semillas, encontró que factores como el azúcar en el medio estimula al embrión, ya que al ser degradados los utiliza como fuente de energía, facilitando su desarrollo y emergencia de la radícula. Cabe mencionar que el cultivo *in vitro*, mediante la clonación permite la obtención de plantas uniformes y libres de patógenos (Delvalle, 2001).

2.8 Reguladores de crecimiento

Los reguladores del crecimiento son sustancias que se sintetizan químicamente o que se obtienen de otros organismos. Tienen similitudes con las fitohormonas y desempeñan un papel fundamental en la regulación de diversos procesos bioquímicos a nivel celular en los vegetales. Hay diferentes tipos de reguladores, que pueden estimular o inhibir el crecimiento vegetal (morfogénesis) (Alcantara et al., 2019).

La respuesta morfogenética se refiere a las transformaciones morfológicas que suceden, como consecuencia de alteraciones estructurales durante el desarrollo de un organismo; entre otros factores, puede ser estimulada por auxinas y citoquininas. La morfogénesis *in vitro* implica la obtención de órganos o embriones a partir de un explante; en este contexto, la totipotencia de las células vegetales facilita la inducción de la creación de estructuras y órganos desde cero (Villarreal, 2015).

2.8.1 Auxinas y citoquininas

Las auxinas son las responsables de estimular la elongación y diferenciación celular, además la concentración de auxinas podría resultar en un aumento en la producción de raíces (Alcantara et al., 2019). La función de las citoquininas es promover la división celular de las células que están a punto de transformarse en embriones (Kahia et al., 2017).

La interacción entre citoquininas y auxinas controla la generación de callos y la morfogénesis in vitro, y su impacto puede cambiar dependiendo de la especie y el tejido. Esto ocurre porque hay interacciones sinérgicas o antagonistas entre dos o más hormonas vegetales (Gil et al., 2016). Por ejemplo, las auxinas y las citoquininas son claves en la embriogénesis somática de las plantas, siendo cruciales para la activación de las células somáticas (Kahia et al., 2017).

3 Metodología

El presente estudio se realizó en dos fases, la primera fue una fase de revisión de fuentes bibliográficas sobre el cultivo *in vitro* de cacao; y la segunda, una fase de laboratorio para la evaluación de protocolos de desinfección y reguladores de crecimiento, durante el establecimiento *in vitro*.

3.1 Fase 1: Revisión sistemática

La revisión sistemática se basó en las directrices del método PRISMA para asegurar una adecuada búsqueda y selección de artículos (Anexo 1), se utilizó como referencia el enfoque de Molins & Serrano (2019).

Las primeras búsquedas se realizaron en octubre de 2024 con los términos en español “cacao” “*in vitro*” y en inglés “cacao embryogenesis” y “micropropagation” en las bases de datos Google scholar, Web of Science, Pubmed y Scopus. Consecutivamente se amplió la búsqueda mediante combinación utilizando operadores lógicos AND y OR según corresponda. Estas búsquedas dieron como resultado una gran cantidad de artículos, los cuales fueron repetitivos o de contribución limitada a la revisión. En la base de datos Scopus los resultados de búsqueda fueron escasos e ineficientes, y no aportaron a la revisión.

Se volvió a realizar una búsqueda sistemática en enero del 2025 en Google scholar, Web of Science, Pubmed limitando desde el año 2014 hasta la actualidad usando la fórmula “cacao micropropagation” y “cacao embryogenesis”. Además, se realizó una búsqueda manual en Google scholar con diferentes combinaciones para obtener más información y se consiguió 1 artículo adicional.

Posteriormente, se definieron los criterios de inclusión:

- Artículos relacionados con el establecimiento *in vitro* de *Theobroma cacao* L.
- Artículos con contenido sobre reguladores de crecimiento y protocolo de desinfección.

- Artículos publicados en los años 2014 hasta 2024.
- Artículos disponibles en diferentes idiomas como: inglés y español.

Criterios de exclusión:

- Artículos duplicados.
- Artículos no científicos, paginas web, tesis.

Para la selección de los artículos, se leyó el título y resumen para verificar que se relacionen con el tema de la investigación, aquellos que no corresponden al tema de la investigación fueron descartados. Se utilizó la herramienta de gestión de referencias Mendeley, para organizar todos los resultados obtenidos en las bases de datos. Finalmente, se realizó una lectura profunda para seleccionar definitivamente los artículos para la revisión sistemática. A partir de los artículos seleccionados se realizó un resumen de temas principales como el tipo de explante, protocolo de desinfección aplicado, medios de cultivo y reguladores de crecimiento involucrados para la morfogénesis. Este análisis nos permitió identificar diferentes factores comúnmente utilizados en el establecimiento *in vitro* de cacao, para posteriormente ser evaluados en la fase de laboratorio.

3.2 Fase 2: Fase de laboratorio

La investigación se llevó a cabo en la Universidad Politécnica Salesiana, sede Quito, Laboratorio de Biotecnología Vegetal, Laboratorios de Ciencia de la Vida, Campus el Girón.

Las plantas de cacao se adquirieron en una finca de Santo Domingo, mismas que fueron mantenidas bajo condiciones de invernadero. Para el presente ensayo, se usaron como explantes semillas, yemas axilares y flores.

3.2.1 Evaluación de protocolos de desinfección

Para establecer un protocolo de desinfección eficiente en el cultivo *in vitro* de *Theobroma cacao* L., se prepararon cuatro soluciones con distintos principios activos. En primer lugar, los

explantes fueron sumergidos en una solución de agua y jabón con una concentración del 3 %, durante 5 minutos, con el propósito de eliminar residuos superficiales. Posteriormente, se realizaron tres enjuagues con agua destilada para remover cualquier resto. A continuación, se llevó a cabo una fase de desinfección en la cámara de flujo laminar, en la cual los explantes fueron sumergidos en una solución de etanol al 10 % v/v durante 30 segundos, esta solución permite eliminar microorganismos presentes en la superficie de los tejidos (Vaca, 2008).

La tercera solución, consistió en agua destilada, vinagre y agua oxigenada en una proporción 2:1:1 (Vaca, 2008), lo que contribuyó a la eliminación de agentes contaminantes. Posteriormente, los explantes fueron enjuagados tres veces con agua destilada. Luego del pretratamiento, se llevaron a cabo cuatro tratamientos experimentales con el objetivo de evaluar la eficacia de distintas combinaciones y concentraciones de hipoclorito de sodio (Ajijah et al., 2016; Garate-Navarro & Arévalo-Gardini, 2017) y fungicida (Azoxistrobina) (Calderón & Montes de Godoy, 2017), en la desinfección de los explantes (Tabla 2); los reactivos fueron seleccionados en función de la revisión sistemática previa (Fase 1).

Los explantes fueron sumergidos en las soluciones por un periodo de 5 minutos, bajo agitación ocasional para favorecer el contacto del agente desinfectante con toda la superficie del tejido vegetal. Finalizado este paso, se realizaron tres enjuagues consecutivos con agua destilada estéril dentro de la cámara de flujo laminar, y se procedió a la siembra de los explantes en los medios de cultivo.

Tabla 2 Concentración de hipoclorito de sodio y azoxistrobina evaluados durante el protocolo de desinfección.

Tratamiento	Hipoclorito de Sodio	Azoxistrobina (Fungicida)
T1	1,5%	0,2 %
T2	1,5%	0,4 %
T3	5%	0,2 %
T4	5%	0,4 %

Elaborado por: (La autora, 2025).

3.2.1.1 Análisis estadístico

Se usó el programa estadístico INFOSTAT versión 2020. Para identificar diferencias significativas entre los tratamientos. Se empleó la prueba estadística de Kruskal-Wallis para las variables que no siguieron una distribución normal y ANOVA para las variables que presentaron una distribución normal de datos.

3.2.1.2 Unidad experimental

La unidad experimental utilizada consistió en tubos de ensayo que contenía 15 mL de medio de cultivo y un explante de cacao.

3.2.1.3 Diseño experimental

Se utilizó un Diseño completamente aleatorio (DCA), con un total de 4 tratamientos con 3 repeticiones por tratamiento.

3.2.1.4 Variables evaluadas

En la evaluación del protocolo de desinfección, se registraron diferentes variables, tanto de forma general, como por el tipo de explante (Figura 1).

Explantes de cacao evaluados *in vitro*.

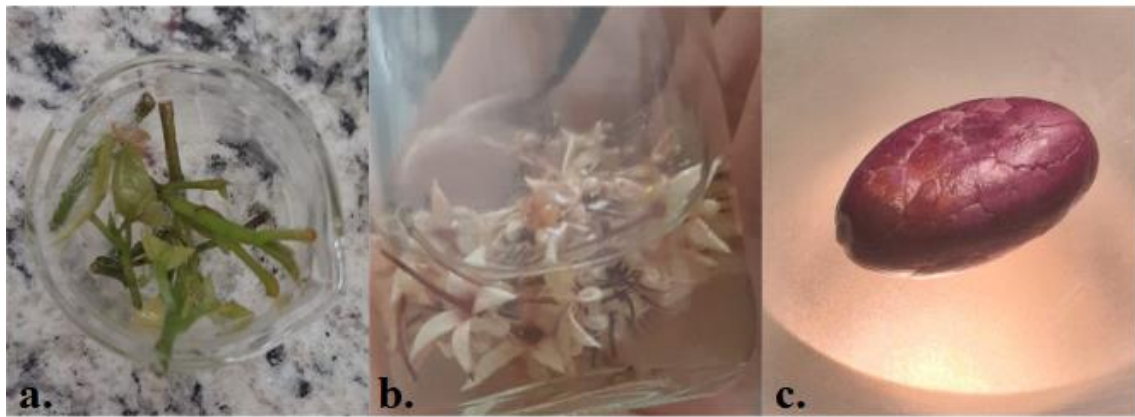


Figura 1 Explantes: a. Yemas axilares, b. Flores, c. Semillas

Elaborado por: (La autora, 2025)

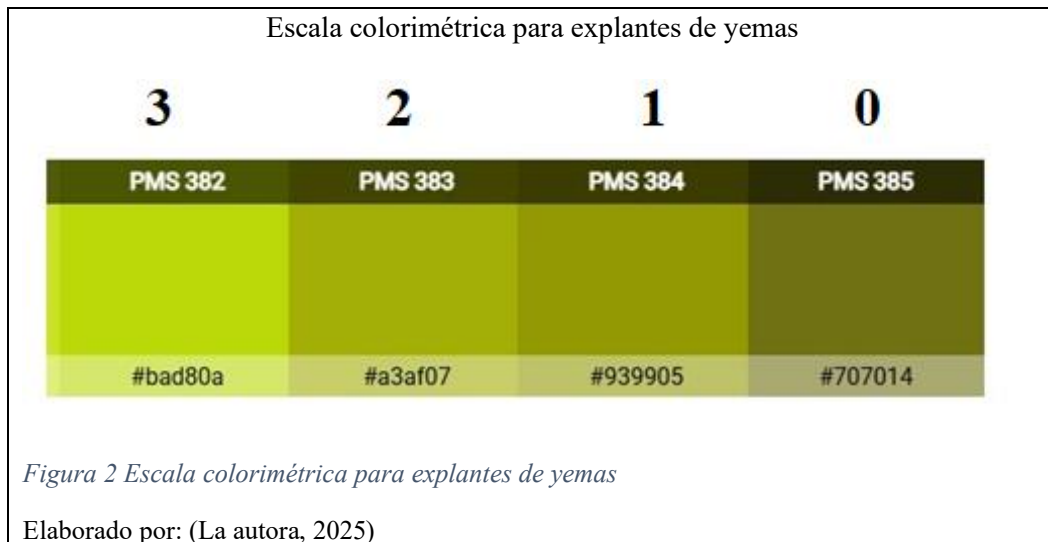
A continuación, se presentan las variables dependientes que comparten todos los explantes:

- **Contaminación fúngica:** Se evaluó la presencia de hongos en el medio de cultivo o explante, y se calificó con 0 la ausencia de contaminación, 1 la presencia en el medio de cultivo y 2 la presencia en el explante.
- **Contaminación bacteriana:** Se evaluó la presencia de colonias bacterianas en el medio de cultivo o explante, y se calificó 0 ausencia de contaminación, 1 presencia en el medio de cultivo y 2 la presencia en el explante.

A continuación, se presentan las variables según el tipo de explante (Figura 1):

Explante yemas

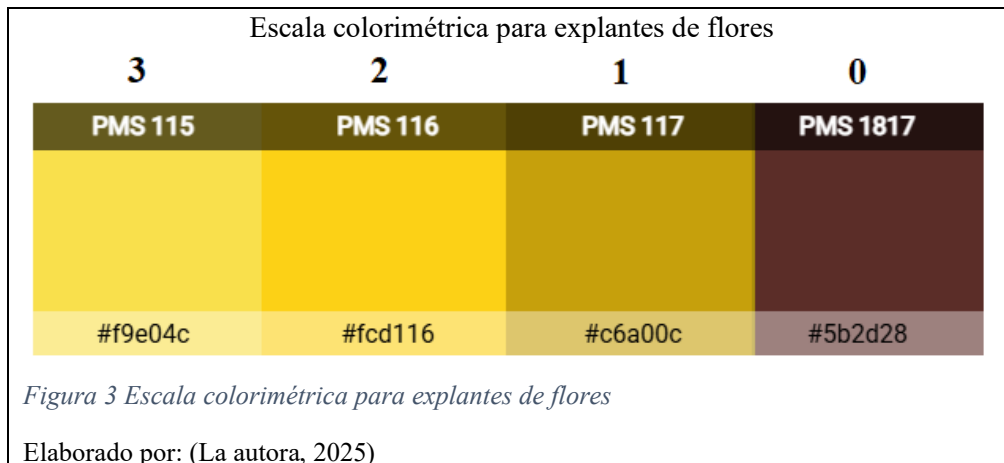
- **Color de tallo:** Se evaluó mediante una escala colorimétrica creada partir de los colores observados en el explante (Pantone, 2025). Se calificó con 3 el color verde claro de las yemas (óptimo), mientras que 0 corresponde a verde oscuro y representa la muerte de las yemas (Figura 2).



- **Porcentaje de mortalidad:** Se cuantificó los explantes según la pérdida de color o el oscurecimiento gradual, el color verde oscuro (0) corresponde a la muerte de las yemas (Figura 2). Estos cambios sirvieron como indicadores visuales relacionados con la muerte de las yemas. Se contó el número total de explantes muertos y se dividieron para el total de explantes evaluados por tratamiento y multiplicado por 100.

Explante estaminodios

- **Porcentaje de mortalidad:** Se evaluó la mortalidad de los explantes mediante observación de su color (escala colorimétrica), así pues, el color 3 amarillo claro fue óptimo; mientras que, 0 corresponde a café oscuro, es decir la muerte de los estaminodios (Figura 3). Se contó el número total de explantes muertos (nivel 0) y se dividieron para el total de explantes evaluados por tratamiento y multiplicado por 100.



Explante semillas

- **Porcentaje de germinación:** Se evaluó cada semana la germinación de las semillas basándose en la aparición de la radícula. Para obtener el porcentaje, se dividieron las semillas que germinaron entre el total de semillas sembradas por tratamiento, multiplicando por 100.
- **Número de hojas:** Se contabilizaron las hojas grandes y pequeñas completamente diferenciadas, excluyendo cotiledones. Los datos se registraron de forma individual por explante y tratamiento, después de 15 días de la siembra.
- **Número de raíces:** Se cuantificó el número de raíces que emergieron de cada explante, considerando aquellas visibles, bien desarrolladas y fácilmente identificables. El conteo se realizó en todos los explantes, de forma semanal durante un periodo de 4 semanas.
- **Longitud de tallo (cm):** Los datos se obtuvieron mediante medición con un calibrador tipo pie de rey. Para determinar la longitud del tallo, se consideró la distancia desde el cuello de la planta (zona de unión entre la raíz y el tallo) hasta el ápice caulinar. Las mediciones se realizaron de forma semanales durante un periodo de 4 semanas.

3.2.2 Fase 2.2: Evaluación de reguladores de crecimiento

En esta fase se evaluó dos reguladores de crecimiento, conforme la revisión sistemática previa, 2,4-D y kinetina (Kahia et al., 2017). Además, se contó con un medio sin reguladores de

crecimiento para ser utilizados como control (Tabla 3). Para la preparación de los medios de cultivo, se utilizó un medio basal MS, para un litro se suplementó con 50 mg de ácido cítrico, 50 mg de ácido ascórbico, 20 g de sacarosa, 6 g de agar y 500 mg de carbón activado. Posteriormente, se ajustó el pH a 5,7 antes de proceder a la esterilización.

Tabla 3 Reguladores de crecimiento evaluados

Código	Tratamiento	Concentración
RC0	Control	--
RK1	Kinetina	1,0 ppm
RD2	2,4-D	2,2 ppm

Elaborado por: (La autora, 2025).

3.2.2.1 Análisis estadístico

Se usó el programa estadístico INFOSTAT versión 2020. Para identificar diferencias significativas entre los tratamientos. Se empleó la prueba estadística de Kruskal-Wallis, para las variables que no siguieron una distribución normal, y ANOVA para las variables que presentaron una distribución normal de datos.

3.2.2.2 Unidad experimental

La unidad experimental utilizada consistió en tubos de ensayo que contenía 15 mL de medio de cultivo y un explante de cacao.

3.2.2.3 Diseño experimental

Se utilizó un Diseño completamente aleatorio (DCA), con un total de 3 tratamientos, con 4 repeticiones cada uno.

3.2.2.4 Variables evaluadas

En la evaluación de reguladores de crecimiento durante la fase de introducción, se registraron diferentes variables conforme el tipo de explante. A continuación, se presentan las variables dependientes que comparten todos los explantes:

- **Contaminación fúngica:** Se evaluó la presencia de hongos en el medio de cultivo o explante, y se calificó con 0 la ausencia de contaminación, 1 la presencia en el medio de cultivo y 2 la presencia en el explante.
- **Contaminación bacteriana:** Se evaluó la presencia de colonias bacterianas en el medio de cultivo o explante, y se calificó 0 ausencia de contaminación, 1 presencia en el medio de cultivo y 2 la presencia en el explante.

A continuación, se presentan las variables según el tipo de explante (Figura 1):

Cultivo de yemas

- **Brotación:** Se consideró que un explante presentó brotación cuando se evidenció el desarrollo visible de uno o más brotes a partir de las yemas. La evaluación se realizó de forma semanal durante un periodo de 4 semanas, registrando el número de explantes con brotación en cada tratamiento.
- **Porcentaje de callo:** Se evaluó la formación de callo en los explantes, registrando su presencia o ausencia de manera visual. Se consideró la presencia de callo cuando se observó una masa de tejido indiferenciado en el sitio de corte o en la base del explante, la evaluación se realizó de forma semanal durante un periodo de 4 semanas. Además, se dividieron las yemas con presencia de callos entre el total de explantes sembradas por tratamiento, multiplicando por 100.

Cultivo de estaminodio

- **Presencia de callo:** Se realizó una evaluación de la formación de callo en los explantes de estaminodio siguiendo el mismo criterio aplicado en yemas. Se observó visualmente la aparición de callo en la base o zonas laterales del tejido. La evaluación se llevó a cabo de forma semanal durante un periodo de 4 semanas.

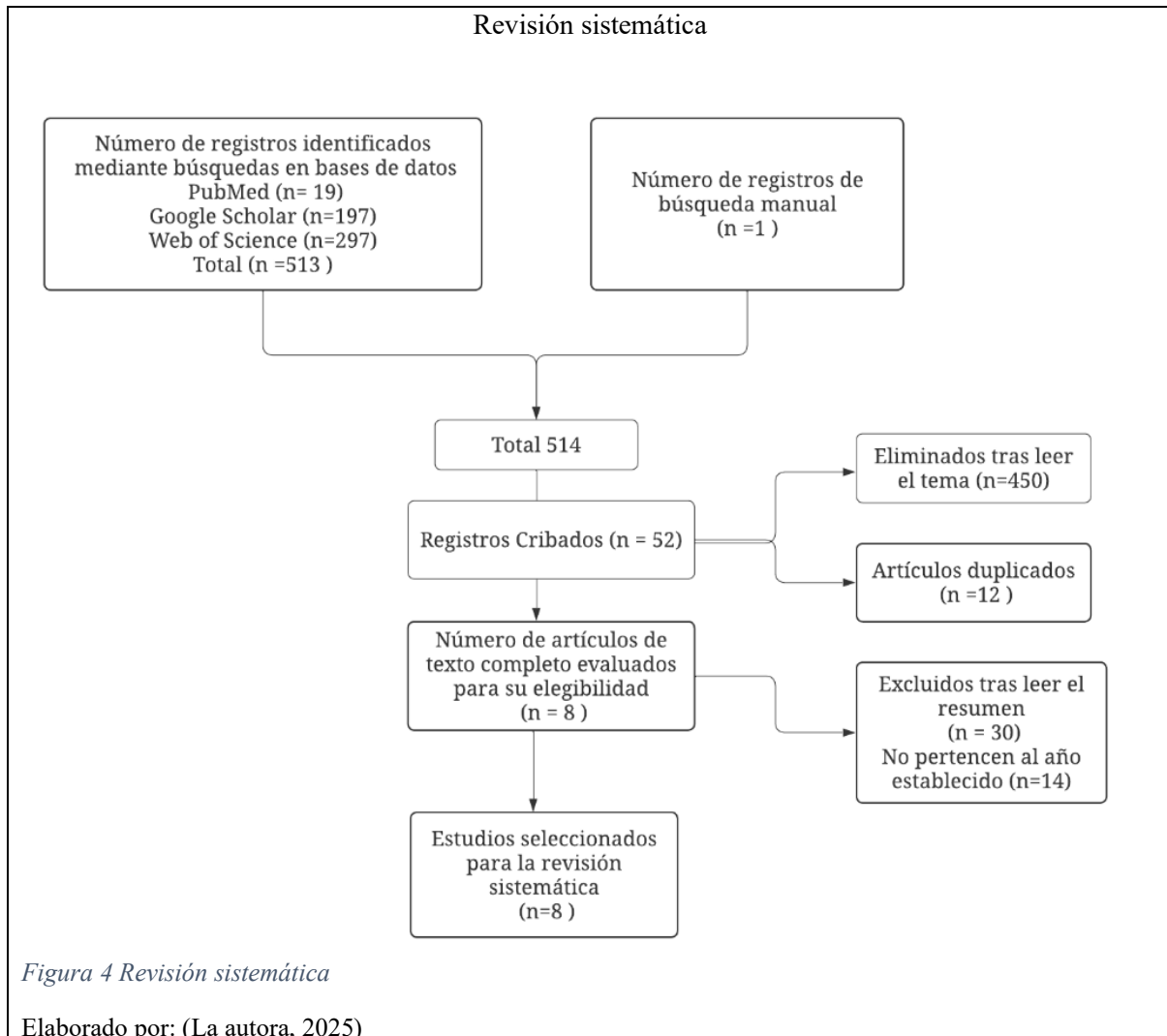
Cultivo de semillas

- **Porcentaje de germinación:** Se evaluó cada semana la germinación de las semillas basándose en la aparición de la radícula. Para obtener el porcentaje, se dividieron las semillas que germinaron entre el total de semillas sembradas por tratamiento, multiplicando por 100.
- **Longitud de tallo (cm):** Los datos se obtuvieron mediante medición con un calibrador tipo pie de rey. Para determinar la longitud del tallo, se consideró la distancia desde el cuello de la planta (zona de unión entre la raíz y el tallo) hasta el ápice del brote más desarrollado. Las mediciones se realizaron de forma semanal durante un periodo de 4 semanas.
- **Número de hojas:** Mediante observaciones después de 15 días de la siembra, se contabilizaron únicamente las hojas completamente diferenciadas, excluyendo cotiledones. Los datos se registraron de forma individual por explante y posteriormente se agruparon por tratamiento.
- **Número de raíces:** Se llevó a cabo una evaluación cuantitativa del número de raíces que emergieron de cada explante, considerando aquellas que eran visibles, bien desarrolladas y fácilmente identificables. El conteo se realizó en todos los explantes, de forma semanal durante un periodo de 4 semanas.

4 Resultados y discusión

4.1 Fase 1: Revisión sistemática

4.1.1. Búsqueda y selección de artículos científicos



A partir de la búsqueda sistemática en Google scholar, Web of Science y Pubmed, filtrando desde el año 2014 en adelante, como resultados se obtuvieron 514 artículos siendo así 19 en PubMed, 197 en Google Scholar, 297 en Web of Science y 1 con búsqueda manual (Figura 4). Tras la lectura de los títulos se eliminaron 450 artículos ya que no contenían información sobre el tema, y se suprimieron 12 artículos duplicados. Además, se descartaron 30 artículos luego de

revisar el resumen, porque no proporcionaron información significativa para el análisis, y 14 artículos al verificar el año de publicación.

Por último, tras una lectura profunda se seleccionaron 7 investigaciones teniendo en cuenta el rango establecido de búsqueda, además del artículo adicionado por búsqueda manual en Google scholar. Finalmente se trabajó con un total de 8 artículos para la revisión (Tabla 4).

Tabla 4 Artículos usados en la revisión sistemática

N.º	Título	Autor y año
1	Effective cacao somatic embryoregeneration on kinetin supplemented DKW medium and somaclonal variation assessment using SSRs markers	(Ajijah et al., 2016).
2	Efecto de diferentes métodos de desinfección en el establecimiento in vitro de Cacao (<i>Theobroma Cacao</i> L.) en la estación experimental Sapecho - Bolivia	(Echenique & Calle, 2020).
3	Incremento de embriones somáticos de Cacao (<i>Theobroma cacao</i> L.) en sistema de inmersión automatico	(Peña-López et al., 2016).
4	Enhanced plantlet regeneration in two cacao (<i>Theobroma cacao</i>) clones from immature inflorescence explants	(Kahia et al., 2017).
5	Induction of Somatic Embryogenesis from Cocoa Farmer Field Collection of ICT – Peru	(Garate-Navarro & Arévalo-Gardini, 2017).
6	Micro propagación de variedades nativas de cacao (<i>Theobroma cacao</i>) mediante embriogénesis somática	(Calderón & Montes de Godoy, 2017).
7	The response of different fungicides against <i>Lasiodiplodia pseudotheobromae</i> causing dieback disease of cocoa through in vitro test	(Musdalifa et al., 2021).
8	Efecto de diferentes reguladores de crecimiento sobre la embriogénesis somática en tres cultivares de cacao	(Díaz-López et al., 2018).

Elaborado por: (La autora, 2025)

4.1.2. Revisión sistemática del cultivo *in vitro* de cacao

Material Vegetal

Según varias investigaciones, los explantes más usados para el cultivo *in vitro* de cacao son los botones florales de plantas élite de cacao, que son recolectados en las primeras horas de la mañana, entre las 6:00 y 10:00 a.m. para evitar su apertura. Para su transporte al laboratorio, son colocados en tubos de ensayo con agua estéril fría hasta realizar la desinfección. Los

estaminodios se obtienen de los botones florales mediante el uso de bisturíes estériles (Ajijah et al., 2016; Echenique & Calle, 2020; Peña-López et al., 2016).

Protocolos de desinfección

En los protocolos de establecimiento *in vitro*, el uso adecuado de reactivos desinfectantes es fundamental para eliminar contaminantes sin afectar la viabilidad de los explantes. A continuación, se detallan algunos de los principales reactivos empleados (Tabla 5), con base en investigaciones previas.

Tabla 5 Reactivos usados en protocolos de desinfección de cacao.

Hipoclorito de Sodio	Fungicida	Autor
5% durante 10 minutos.		(Ajijah et al., 2016).
1,5% durante 20 minutos.		(Garate-Navarro & Arévalo-Gardini, 2017).
	Azoxistrobina al 0,2% + Tween 80 por 30 minutos	(Calderón & Montes de Godoy, 2017, y Musdalifa et al., 2021).

Elaborado por: (La autora, 2025)

Hipoclorito de Sodio

Dos protocolos lograron resultados favorables en la regeneración (embriogénesis y rizogénesis) de cacao, aunque utilizaron diversas concentraciones y tiempos de exposición. Según Ajijah et al. (2016), para los botones florales aplicaron el siguiente protocolo de desinfección, esterilizar superficialmente con una solución de hipoclorito de sodio al 5% durante 10 minutos. Posteriormente sugieren tres enjuagues con agua destilada estéril en diferentes tiempos de 10 minutos el primero, el segundo 5 minutos y por último por 5 minutos, respectivamente. Finalmente, se extrajeron los estaminodios y se sembraron en cajas petri conteniendo el medio de cultivo correspondiente, al final consiguieron una mayor formación de embriones somáticos.

Por otra parte, Garate-Navarro & Arévalo-Gardini (2017), sometieron a los botones florales a un proceso de desinfección similar que consiste en esterilización superficial con una solución de hipoclorito de sodio al 1,5% durante 20 minutos con agitación lenta y varios enjuagues con agua estéril, con el fin de eliminar los residuos del desinfectante. Como resultados obtuvieron respuesta organogénica indirecta, cuando se formaron raíces a partir de callos.

Fungicida

Conforme varios estudios *in vitro*, entre ellos Musdalifa et al. (2021), quienes llevaron a cabo una evaluación de la efectividad de varios fungicidas para controlar *Lasiodiplodia pseudotheobromae*, responsable de la muerte regresiva del cacao. Los resultados indicaron que ciertos fungicidas son eficaces para reducir la presencia del hongo.

En el protocolo desarrollado por Calderón & Montes de Godoy (2017), los botones florales fueron sometidos a tres lavados de agua desmineralizada estéril más 3 gotas de tween 80, luego preparan una solución de Azoxistrobina al 0,2% con tres gotas de tween 80 en la que se introdujeron los botones florales y se dejaron reposar durante 30 minutos. El protocolo de desinfección fue efectivo y no tuvo impactos negativos en el desarrollo, ya que obtuvieron respuesta morfogénica en los explantes tratados.

El uso de fungicidas en el protocolo de desinfección ha demostrado ser una estrategia para controlar los microorganismos contaminantes y aumentar la viabilidad de los explantes.

Medio de cultivo DKW y reguladores de crecimiento

Las investigaciones de Kahia et al. (2017) y Díaz-López et al. (2018), recomiendan el uso del medio de cultivo DKW (Driver y Kuniyuki), adicionado con reguladores de crecimiento, para inducir embriogénesis somática en cacao; recomiendan 2,4-D en dosis entre 1,5 y 2,2 mg·L⁻¹, y en interacción con 6-BA o kinetina. A continuación, se detalla cada estudio.

En el estudio realizado por Kahia et al. (2017), se utilizó como explante botones florales cultivados en medio de inducción DKW. Llevaron a cabo ensayos separados probando diferentes concentraciones de 2,4-D (2; 2,21 y 4,4 mg.L⁻¹) y kinetina (0,1; 0,2; 0,54; 1,07; 2,1 y 5,4 mg.L⁻¹). Los explantes fueron incubados durante 28 días en condiciones de oscuridad a 25 ± 2 °C, se transfirieron a un medio destinado al desarrollo embrionario, los embriones obtenidos fueron germinados bajo luz fluorescente blanca fría (33 μmol·m⁻²·s⁻¹) con un fotoperiodo de 16 horas a 25 ± 2 °C. Los autores evidenciaron que la combinación de 2,21 mg.L⁻¹ de 2,4-D y 1,07 mg.L⁻¹ de kinetina, alcanzó una frecuencia embriogénica de 98,7% y mostró el mayor promedio del número de embriones (28 embriones/explante), en el clon C1 de cacao.

Según Díaz-López et al. (2018), evaluaron diferentes reguladores de crecimiento en tres cultivares de cacao (SCA-6, OC-60 y CNM-4), usando pétalos y estaminodios, sembrados en DKW; probaron cinco concentraciones de 2,4-D (0; 0,5; 1; 1,5 y 2 mg.L⁻¹) combinadas con dosis fijas de 6-BA (0,05 mg.L⁻¹) y kinetina (0,3 mg.L⁻¹). Los explantes se incubaron durante 14 días en un cuarto climático a 24 °C en condiciones de oscuridad. Los mejores resultados se observaron en el cultivar SCA-6, los estaminodios presentaron la máxima frecuencia de embriogénesis (40 %) empleando 1,5 mg.L⁻¹ de 2,4-D con 6-BA; el mayor número de embriones (15) con 2 mg.L⁻¹ de 2,4-D y 6-BA. En cuanto a pétalos obtuvieron 20% de frecuencia de embriogénica con 2 mg.L⁻¹ de 2,4-D y kinetina; además, obtuvieron hasta 16 embriones con 2 mg. L⁻¹ de 2,4-D y 6-BA.

Los reguladores de crecimiento tanto 2,4-D y kinetina favorecen a la embriogénesis somática en *Theobroma cacao* L., teniendo en cuenta la concentración utilizada y el tipo de explante. Estos factores son importantes para ayudar la respuesta morfogénica en los explantes.

4.2 Fase 2: Fase de laboratorio

4.2.1 Evaluación de protocolos de desinfección

A continuación se detallan los resultados obtenidos por explante.

4.2.1.1 Explante yemas

Se aplicó la prueba de Shapiro Wilk con el fin de evaluar la distribución de los datos en los protocolos de desinfección, y se halló que las variables contaminación fúngica y bacteriana no siguen una distribución normal ($p \leq 0,05$), por esta razón, se llevó a cabo la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis . Mientras que, para color de tallo y mortalidad se encontró que siguen una distribución normal ($p > 0,05$) por lo que se realizó la prueba de ANOVA.

Los resultados de Kruskal Wallis para las variables contaminación fúngica y contaminación bacteriana indicaron que no hay diferencia significativa entre tratamientos ($p > 0,05$). La contaminación fúngica para todos los tratamientos en los explantes de yemas fue del 100%, lo que se refleja en las medianas de 2,00 (Tabla 6), que indica que la contaminación inicia desde los explantes (2). Los tratamientos T2, T3 y T4 se calificaron con una media de 2,00 indicando contaminación directa en el explante; mientras que, T1 presentó una media de 1,67 este valor indica que presentó contaminación tanto en el medio de cultivo (1) como en el explante (2). En cuanto a contaminación bacteriana, media y mediana fueron nivel 0,00 para todos los tratamientos (Tabla 4), lo que indica que este tipo de contaminación no estuvo presente. Los resultados reflejan que ninguno de los tratamientos aplicados logró controlar eficazmente los hongos en este tipo de explante, sin embargo no hubo crecimiento bacteriano.

Tabla 6 Medias y medianas para las variables contaminación fúngica, contaminación bacteriana. Medias para las variables color de tallo y mortalidad.

Tratamientos	Contaminación fúngica		Contaminación bacteriana		Color de tallo	Porcentaje de mortalidad
	Medias	Medianas	Medias	Medianas	Medias	Medias
T1	1,67	2,00	0,00	0,00	0,00	100,00
T2	2,00	2,00	0,00	0,00	0,00	100,00
T3	2,00	2,00	0,00	0,00	0,00	100,00
T4	2,00	2,00	0,00	0,00	0,00	100,00

Elaborado por: (La autora, 2025)

Nota: Las variables contaminación fúngica y bacteriana (niveles): 0=Sin contaminación; 1=contaminación en medio de cultivo; 2=contaminación en explante. Mortalidad: 0=muerte de explante (verde oscuro, nivel 0).

Los resultados del ANOVA indicaron que las variables color de tallo y mortalidad no presentaron diferencia significativa entre tratamientos ($p > 0,05$). Respecto al color del tallo, la media para todos los tratamientos fue 0,00 que corresponde a verde oscuro, según la escala colorimetría utilizada (Figura 1), esto significa que los explantes presentaron fenolización y muerte de las yemas. Es por lo que la variable porcentaje de mortalidad fue del 100%, indicando que ninguno de los tratamientos aplicados logró mantener viabilidad de las yemas.

Según Gómez (2010), al evaluar la propagación *in vitro* de cinco clones de cacao, a partir de explantes de yemas axilares, observó un alto porcentaje de contaminación y oxidación al usar hipoclorito de sodio durante el protocolo de desinfección, lo que coincide con los resultados obtenidos en la presente investigación. Además, el autor destaca que estos resultados podrían estar vinculados a la presencia de microorganismos endógenos en la planta madre, también podrían atribuirse al tiempo transcurrido entre la colecta y el inicio del cultivo *in vitro*; como principales barreras para el establecimiento exitoso del cultivo.

Según Mongelós-Franco et al. (2020), la contaminación es uno de los mayores desafíos en el cultivo *in vitro* de especies tropicales, como el cacao y el banano. En su estudio sobre micropropagación de *Musa* spp. evaluaron hipoclorito de sodio al 5% y 10% durante 5 minutos, encontrando que la concentración más baja del hipoclorito de sodio no es suficiente para desinfectar el explante, ya que resultó en una contaminación del 37,5%. Mientras que, el tratamiento al 10% eliminó completamente la contaminación, pero oxidó el 100% de los explantes. Este contexto sugiere que concentraciones más altas de hipoclorito de sodio son más eficaces contra contaminantes; sin embargo, pueden causar la muerte del explante; similar a los resultados encontrados en este estudio, tanto en los tratamientos de 1,5% (T1 y T2) como 5% (T3 y T4).

Giménez (1989), indica que la exposición inadecuada a fungicidas puede provocar necrosis, roturas o muerte de los tejidos, lo que puede llegar a causar la muerte del explante, esto depende del ingrediente activo, solubilidad en agua y actividad química. Lo que coincide con los resultados del estudio debido a que hubo altas tasas de mortalidad en los explantes, otro factor puede haber sido la concentración del fungicida (Azoxistrobina).

4.2.1.2 Explante estaminodios

Se determinó que las variables contaminación fúngica, contaminación bacteriana y mortalidad siguen una distribución normal ($p > 0,05$), por lo que se llevó a cabo la prueba paramétrica ANOVA.

Los resultados del ANOVA indicaron que las variables contaminación fúngica, contaminación bacteriana y porcentaje de mortalidad no presentan diferencias significativas para los tratamientos. Al evaluar contaminación fúngica en los tratamientos T1 a T4 se observó medias con valores de 2,00 (Tabla 5), indicando que el 100% de contaminación fúngica fue

directamente en los explantes (nivel 2). Por otro lado, todos los tratamientos no presentaron contaminación bacteriana (nivel 0), en el medio de cultivo ni en el explante.

Tabla 7 Medias para las variables contaminación fúngica y bacteriana, porcentaje de mortalidad.

Tratamientos	Contaminación fúngica	Contaminación bacteriana	Porcentaje de mortalidad
	Medias		
T1	2,00	0,00	100,00
T2	2,00	0,00	100,00
T3	2,00	0,00	100,00
T4	2,00	0,00	100,00

Elaborado por: (La autora, 2025)

Nota: Las variables contaminación *fúngica* y *bacteriana* (niveles): 0=Sin contaminación; 1=contaminación en medio de cultivo; 2=contaminación en explante. *Porcentaje de mortalidad*: 0=muerte, explante color café.

Para la variable porcentaje de mortalidad se encontró medias de 100 % en todos los tratamientos, es decir, los estaminodios (flores) según la escala colorimétrica (Figura 3), mostraron color café (nivel 0) que indica mortalidad.

Según Echenique & Calle (2020), en su estudio de cacao sobre el protocolo de desinfección en estaminodios y pétalos, utilizando hipoclorito de sodio al 5% durante 50 minutos; obtuvieron altos niveles de contaminación tanto por hongos como por bacterias (98,5%), demostrando que la concentración aplicada no fue suficiente para prevenir la contaminación. Estos resultados son similares con la metodología propuesta en esta investigación, lo que corrobora que el porcentaje de cloro fue ineficiente (1,5 y 5 %), ya que la contaminación y mortalidad alcanzaron el 100%.

Sin embargo, Hidalgo (2014), reporta que el tratamiento más eficaz fue con hipoclorito de sodio al 10%, que produjo explantes libres de contaminación y bien desarrollados; contrario a las concentraciones utilizadas en este estudio que fueron inferiores (5 y 1,5%). Esto sugiere que es

necesario una mayor concentración de hipoclorito de sodio para desinfectar eficazmente los explantes. Sin embargo, se debe tener cuidado con otros factores como el tiempo, pues puede influir en la mortalidad.

Además, estudios de Martínez-Hernández et al. (2024); Osorio et al. (2022), mencionan que las diversas condiciones climáticas en el momento de la recolección de flores generan variaciones en la cantidad de microorganismos en los cultivos, y que la aparición de hongos es más frecuente en las épocas de lluvia que en las épocas secas. En este contexto, los explantes usados para este estudio fueron recolectados en el mes de marzo, periodo de fuertes lluvias en el país, estas condiciones pudieron favorecer a la presencia de microorganismos.

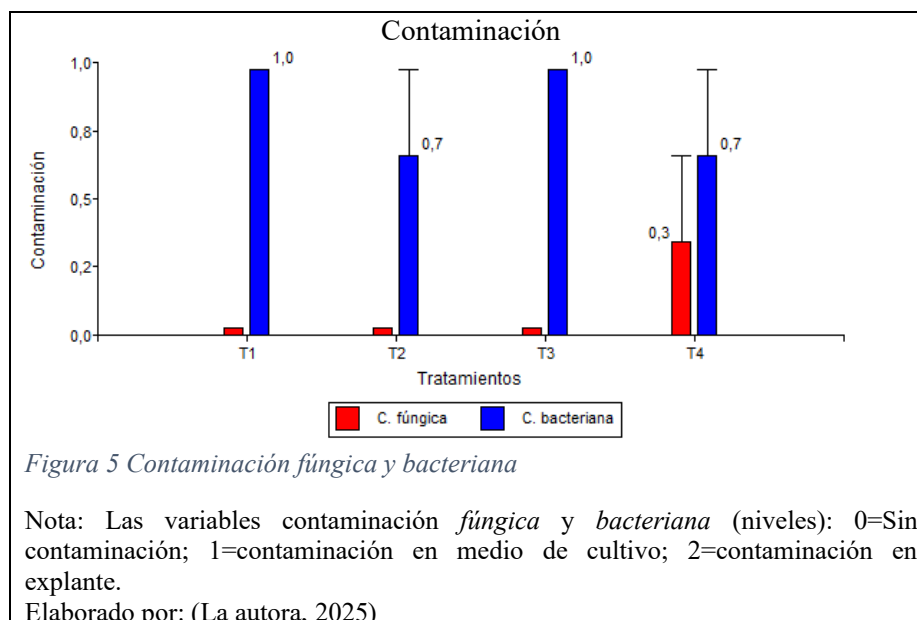
Respecto al fungicida, la azoxistrobina en campo presenta alta eficacia frente a hongos fitopatógenos que afectan al cacao, como *Moniliophthora roreri* (Torres de la Cruz et al., 2013), y *Lasioidiplodia pseudothiobromai* (Musdalifa et al., 2021); sin embargo, los resultados obtenidos en el presente trabajo no coinciden, ya que hubo 100% de contaminación y mortalidad, lo que podría deberse al bajo tiempo de exposición, la concentración insuficiente o la combinación de ambos factores que impidieron la eliminación efectiva de microorganismos.

4.2.1.3 Explante semillas

Las variables contaminación fúngica, contaminación bacteriana, número de hojas y número de raíces no siguen una distribución normal ($p \leq 0,05$) por lo que se aplicó la prueba no paramétrica Kruskal Wallis, mientras que germinación y longitud de tallo siguen una distribución normal ($p > 0,05$) por lo que se aplicó ANOVA para su evaluación.

Contaminación fúngica y bacteriana

Contaminación fúngica y bacteriana indican que no hay diferencia significativa entre tratamientos ($p > 0,05$). En la figura 5, se observa que los tratamientos T1 a T3 la contaminación fúngica en todos los explantes fue de nivel 0 (sin contaminación), mientras que T4 alcanzó un 0,3 de contaminación, lo que indica que al menos una de las repeticiones se contaminó con nivel 1. En cuanto a contaminación bacteriana en el T1 y T3 el 100% de los explantes presentaron nivel 1, es decir directamente en el medio de cultivo. Mientras que T2 y T4 llegan al 0,7 de contaminación lo que muestra que existió en uno o más de las repeticiones que no se contaminaron.



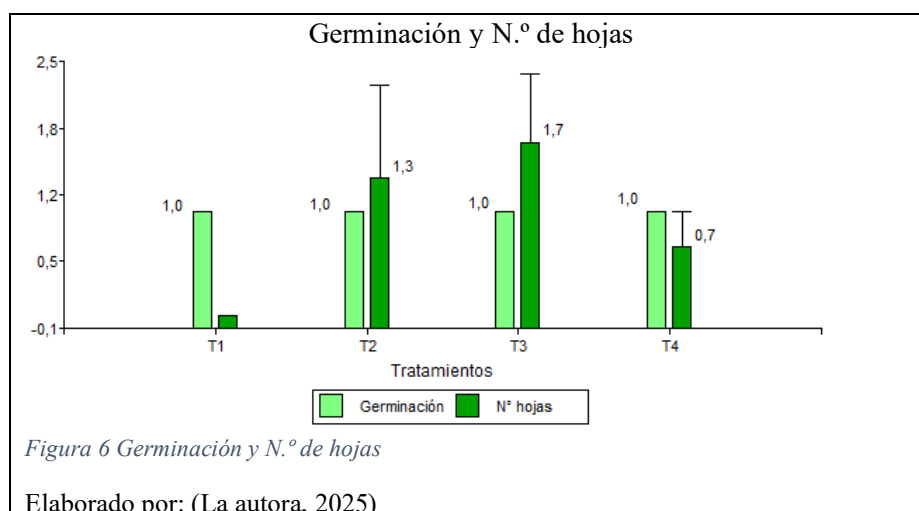
Castañeda et al. (2015), obtuvieron en sus siembras con semillas de cacao 63% de frascos contaminados con hongos y bacterias, a pesar de que su protocolo de desinfección fue con hipoclorito de sodio al 2,5% durante 15 minutos. Obtuvieron una tasa de germinación de 72,72% a pesar de que los explantes presentaron contaminación. La causa de la contaminación fue la ineficiencia del desinfectante para eliminar microorganismos internos y la falta de

manipulación en condiciones estériles. Estos resultados respaldan la idea de que el uso de hipoclorito de sodio, en concentraciones entre 1,5 y 5%, no garantiza una asepsia completa.

Una opción para disminuir la contaminación bacteriana es la aplicación de antibióticos al medio de cultivo. Abdalla et al. (2022), mencionan que al complementar el medio de cultivo con antibióticos se puede eliminar la contaminación bacteriana interna. Recomiendan usar antibióticos en concentraciones adecuadas ya que si la concentración es excesiva puede generar daños al explante y afectar la viabilidad. En el estudio de Pantoja et al. (2014), adicionaron 150 mg.L⁻¹ de estreptomicina el medio de cultivo y lograron la reducción de contaminación de hongos y bacterias en el cultivo, pero no es su totalidad. Una alternativa para reducir la contaminación bacteriana podría ser la adición de antibióticos como la estreptomicina al medio de cultivo, ya que demuestra efectividad en otros estudios.

Porcentaje de germinación

Para la variable porcentaje de germinación se encontró que no hay diferencia significativa entre los tratamientos ($p > 0,05$), alcanzando el 100% de germinación (Figura 6). La viabilidad de la semilla no se vio afectada en este estudio por los tratamientos de desinfección.



En esta investigación se removió la pulpa de la semilla y se quitó la testa sin dañar la superficie. Según Narvaez & Guaman (2019), en su estudio menciona que la retirar la testa de la semilla de cacao facilita significativamente la germinación. Esto ocurre porque la testa posee inhibidores químicos naturales, y al eliminarla se facilita el acceso directo del embrión a los nutrientes del medio de cultivo. Incluso se impide la transformación de lípidos a glucosa, disminuyendo el tiempo requerido para comenzar el crecimiento.

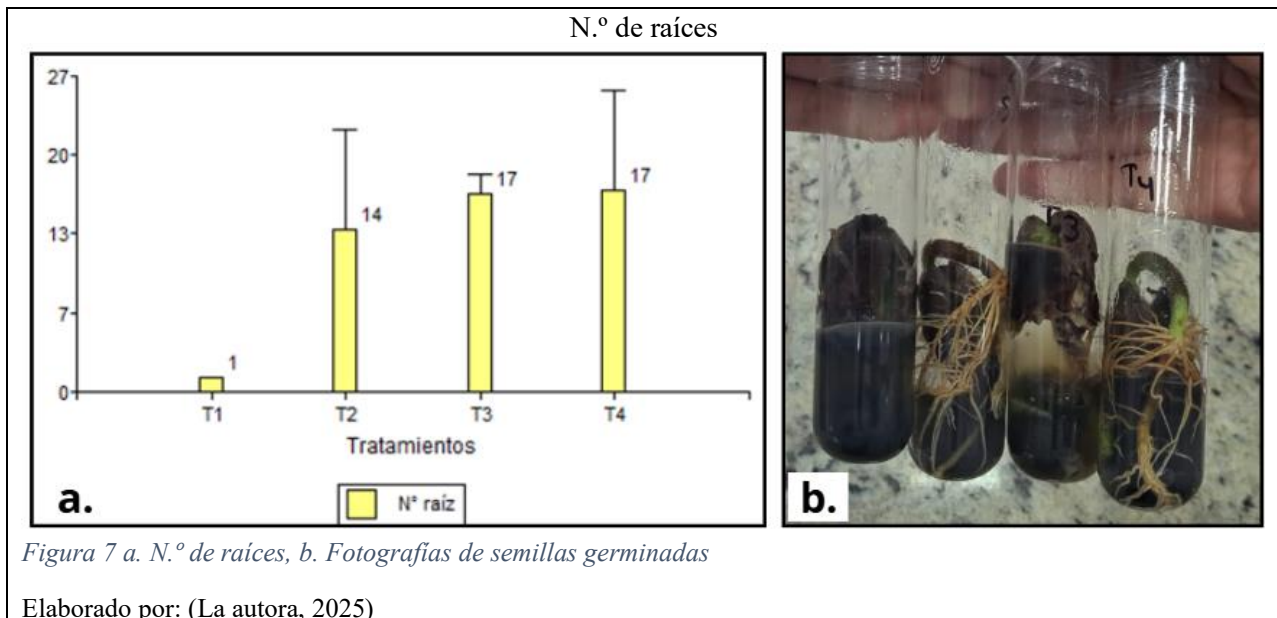
Número de hojas

La variable número de hojas no presentó diferencia significativa entre tratamientos ($p > 0,05$). En la Figura 6 se muestra que T1 tiene un menor número de hojas, mientras que T3 presenta un mayor número de hojas, T2 y T4 presentan valores intermedios de crecimiento de hojas.

Los tratamientos T2 y T3 lograron desarrollar el mayor número de hojas a pesar de la contaminación bacteriana que se presentó. Según Shaik & Thomas (2019), podría explicarse debido a la presencia de bacterias en estado viable pero no cultivable (VBNC) o en estado resistente al cultivo (CREB). Estas bacterias generalmente son endófitas por lo que permanecen inactivas y pueden activarse durante el crecimiento sin causar necesariamente. También Lara-Ascencio et al. (2021), menciona que algunos contaminantes, no afectan visiblemente el desarrollo inicial de los explantes, lo que coincide con los resultados del presente estudio.

Número de raíz

Para la variable número de raíz se encontró que no hay diferencias significativas entre los tratamientos ($p > 0,05$). La figura 7 muestra que T1 tiene un bajo número de raíces, seguida de T2 que tiene un promedio intermedio de crecimiento de raíces, mientras T3 y T4 presentan un alto número de raíces.



El tratamiento T1 produjo el menor desarrollo de raíces (1), en comparación a los demás. Este resultado podría atribuirse a la contaminación proveniente del medio de cultivo y el estrés generado, la cual pudo estresar influyendo en el desarrollo de las raíces. Según Cassells & Curry (2001), el estrés causado por medio de cultivo desequilibrado, heridas y factores ambientales, puede dar lugar a respuestas fisiológicas anormales, como envejecimiento prematuro del explante, disminución de la división celular u otros.

Longitud de tallo

La variable longitud de tallo no presenta diferencias significativas entre tratamientos ($p > 0,05$). En la figura 8, se observa que T1 tiene la menor longitud del tallo (2,11 cm), mientras que T3 alcanza una longitud de tallo mayor (5,01 cm). T2 y T4 registraron crecimientos de 3,62 cm y 4,22 cm, respectivamente.

Longitud de tallo y su correlación número de raíces y longitud del tallo

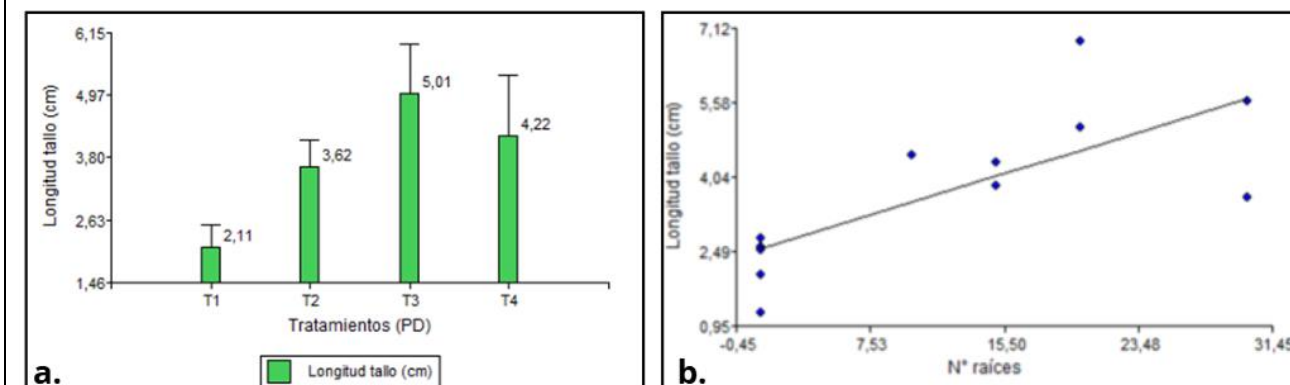


Figura 8 a. Longitud de tallo, b. Correlación número de raíces y longitud del tallo

Elaborado por: (La autora, 2025)

La menor longitud de tallo se observó en el tratamiento T1 (2,11 cm), esto podría deberse a que T1 también presentó el menor número de raíces, lo que impidió la absorción de nutrientes y el crecimiento de tallo se vio afectado. En la figura 8b, muestra la correlación existente entre el número de raíces y la longitud de tallo $p=0,0051$, en esta fase se evidencio una relación directamente proporcional, es decir, a mayor número de raíces se presenta una mayor longitud de tallo. En este estudio T3 y T4 presentaron el mayor número de raíces, con 17 raíces (Figura 7a) y los mismos tratamientos alcanzaron la mayor longitud de tallo 5,1 y 4,2 cm respectivamente.

Como mencionan Ishida et al. (2023), la absorción de nutrientes por parte de las plantas está determinada por la estructura radicular y la tasa de crecimiento. Por esta razón, probablemente en el estudio el bajo desarrollo del tallo se debió a que las raíces no absorbieron los suficientes nutrientes.

Por otro lado, Lara-Ascencio et al. (2021), mencionan que la contaminación en el cultivo interfiere en el desarrollo de los explantes, debido a que los microorganismos que pueden estar

presentes utilizan los nutrientes para su crecimiento y por ende compiten con los explantes por nutrientes y oxígeno.

4.2.2 Fase 2.2: Evaluación de reguladores de crecimiento

Para los resultados obtenidos durante la evaluación de las diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento (2,4-D y kinetina), se realizó una prueba de Shapiro Wilk con la finalidad de determinar la distribución de los datos.

4.2.2.1 Cultivo de yemas

Para las variables evaluadas en el explante yema, se halló que contaminación fúngica y porcentaje de callo siguen una distribución normal ($p > 0,05$) por lo que se empleó la prueba de ANOVA. Contaminación bacteriana y brotación no siguen una distribución normal ($p \leq 0,05$) por lo que se empleó Kruskal Wallis.

Los resultados de ANOVA para contaminación fúngica y porcentaje de callo no presentaron diferencia significativa entre los tratamientos ($p > 0,05$). La contaminación fúngica indica que hubo presencia de hongos directamente en el explante de yemas (2), afectando el tejido vegetal, indicando que hubo 100% de contaminación en todos los tratamientos. Los resultados de Kruskal Wallis para contaminación bacteriana y brotación presentaron que no hay diferencia significativa entre tratamientos ($p > 0,05$), ya que todos los tratamientos respondieron de manera similar (Tabla 8). Respecto a contaminación bacteriana en la mayoría de los explantes las medias fueron 0,00 para los tratamientos RC0 y RD2 lo que significa que no hubo presencia de bacterias; mientras que RK1 obtuvo 0,25 esto se debe a que al menos una repetición presentó contaminación en el medio (1) o sobre el explante (2) (Tabla 8).

Tabla 8 Medias para las variables contaminación fúngica y porcentaje de callo, medias y medianas para contaminación bacteriana y brotación.

Tratamientos	Contaminación fúngica	Contaminación bacteriana		Brotación		Porcentaje de callo
	Medias	Medias	Medianas	Medias	Medianas	Medias
RC0	2,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
RK1	2,00	0,25	0,00	0,00	0,00	0,00
RD2	2,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Elaborado por: (La autora, 2025)

Nota: Las variables contaminación fúngica y bacteriana (niveles): 0=Sin contaminación; 1=contaminación en medio de cultivo; 2=contaminación en explante. Brotación: 0= sin brotación.

Para la brotación, los tratamientos RC0, RK1 y RD2 lograron medias de 0,00; lo que indica que las yemas no tuvieron indicios de desarrollo de brotes. Mientras que en la variable porcentaje de callo, las medias fueron de 0,00 en todos los tratamientos, indicando una ausencia completa de formación de callos en los explantes de yemas.

La elevada tasa de contaminación fúngica observada en este estudio podría estar relacionada con la presencia de microorganismos endofíticos resistentes a los métodos de desinfección utilizados. En el estudio de Pantoja et al. (2014), a pesar de aplicar un pretratamiento con benomyl al 2% y ácido ascórbico (10 Mm) durante 24 horas, y estreptomycin en el medio de cultivo, el autor obtuvo niveles altos de contaminación.

En la presente investigación en los explantes de yemas, los reguladores de crecimiento no promovieron respuestas morfogénicas. En el estudio realizado por Kahia et al. (2017), usaron como explante botones flores, evidenciaron que la combinación de 2,21 ppm de 2,4-D y 1,07 ppm de kinetina alcanzó una frecuencia embriogénica de 98,7% y mostró el mayor promedio

del número de embriones (28,0 embriones/explante), en el clon C1 de cacao, lo que demuestra la eficacia de los reguladores de crecimiento con otros explantes.

4.2.2.2 Cultivo de estaminodios

Se determinó que las variables contaminación fúngica y contaminación bacteriana no siguen una distribución normal por lo que se usó la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis. Por otro lado, la presencia de callo mostró que sigue una distribución normal, por ello se utilizó la prueba de ANOVA.

Las variables contaminación fúngica y bacteriana presentan un valor de $p > 0,05$, indicando que no hay diferencia significativa entre tratamientos. La variable contaminación fúngica refleja medianas de 2,00 para los tratamientos RK1 y RD2, se debe a que los tratamientos presentaron 100% de incidencia fúngica directamente sobre el explante (2). El tratamiento control (RC0) con una media de 1,75 indica que, en al menos una de sus repeticiones, presentó contaminación fúngica en el medio de cultivo (1), ya que todas las repeticiones se contaminaron. Respecto a la contaminación bacteriana las medias fueron de 0,00 en RC0 y RK1 ya que no hubo presencia de bacterias en los tratamientos, pero RD2 obtuvo 0,25 quiere decir que hubo incidencia bacteriana en el medio de cultivo de al menos una repetición (Tabla 9).

Tabla 9 Medianas para las variables contaminación fúngica y contaminación bacteriana, medias para presencia de callo.

Tratamiento	Contaminación fúngica		Contaminación bacteriana		Presencia de callo
	Medias	Medianas	Medias	Medianas	Medias
RC0	1,75	2,00	0,00	0,00	0,00
RK1	2,00	2,00	0,00	0,00	0,00
RD2	2,00	2,00	0,25	0,00	0,00

Elaborado por: (La autora, 2025)

Nota: Las variables contaminación *fúngica* y *bacteriana* (niveles): 0=Sin contaminación; 1=contaminación en medio de cultivo; 2=contaminación en explante. *Presencia de callo*: 0= ausencia de callo.

La variable presencia de callo no presentó diferencia significativa. Los valores de las medias fueron 0,00 esto se debe a que en ningún tratamiento hubo indicios de calogénesis. Los explantes de flores han mostrado excelentes respuestas morfogénicas, especialmente embriogénesis somática. Sin embargo, en el presente estudios tras un mes del cultivo *in vitro* no se observó ningún desarrollo morfogénico.

Ajijah et al. (2016), obtuvieron callos entre los días cinco a siete después de a ver cultivado en el medio de cultivo, mientras que el desarrollo somático del embrión se evidenció desde la cuarta hasta la novena semana. Consiguieron altos porcentajes de embriogénesis con las concentraciones kinetina y 2,4-D en proporción molar 1,0:3,9 en el medio de inducción de callo, consiguiendo embriones somáticos (5,6-66,7%), germinación (50%).

Igualmente, Kouassi et al. (2017), manifestaron que una combinación de 1 mg.L⁻¹ de 2,4-D y 0,25–0,5 mg.L⁻¹ de kinetina promovía la formación de callos y embriones. Además, la respuesta morfogénica depende del tipo de explantes y de factores como la concentración de los reguladores de crecimiento que se usan, genotipo y la interacción pueden influir en el desarrollo

de callos, por ello, demostraron que en explantes de pétalos los tres factores ayudaron a obtener callos, mientras que con estaminodios fue lo contrario. En el estudio los resultados fueron contrarios lo que podría atribuirse a que los explantes fueron más sensibles.

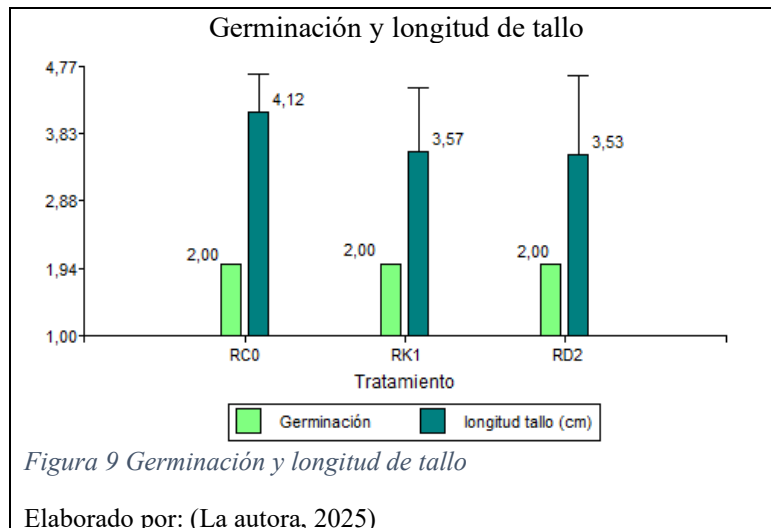
En el estudio se utilizó el medio de cultivo MS y no se obtuvo resultados favorables por lo que es importante la elección de medio de cultivo especialmente para cacao. Según Li et al. (1998), han demostrado que el uso del medio de cultivo DKW proporciona mejores resultados para el cultivo *in vitro* del cacao ya que posee mayores concentraciones de calcio, magnesio y azufre, elementos que son importantes para la diferenciación celular y formación de embriones somáticos. Es por lo que, en estudios de los autores Ajijah et al. (2016); Kahia et al. (2017); Kouassi et al. (2017), logran respuestas morfogénicas favorables utilizando el medio DKW en el cultivo *in vitro* de cacao.

4.2.2.3 Cultivo de semillas

Se analizaron las variables contaminación fúngica, contaminación bacteriana, número de raíces, número de hojas evidenciaron que no siguen una distribución normal con valores de $p \leq 0,05$, por lo que se aplicó la prueba de Kruskal Wallis. La germinación y longitud de tallo presentaron una distribución normal con valor de $p > 0,05$ por lo que se realizó la prueba de ANOVA.

Porcentaje de germinación

Los resultados para la germinación muestran que no hay diferencia significativa ($p > 0,05$), entre tratamientos; indicando una germinación del 100 % en nivel 2, porque todos los explantes emitieron radícula (nivel 1) y cotiledones (nivel 2), como se observa en la figura 9. Lo que indica que los tratamientos aplicados a las semillas no influyeron en la germinación.



En el presente estudio se usó semillas frescas, se removió el mucilago y la testa para el establecimiento *in vitro*. Adu et al. (2017), indica que el mucílago que contienen las semillas frescas puede afectar negativamente a la germinación y removerlo favorece a la tasa de germinación hasta un 80-100%.

La germinación de las semillas no se vio afectada por los tratamientos. Las semillas de cacao son recalcitrantes, contienen una gran cantidad de agua interna, carecen de latencia, no toleran bajas temperaturas, germinan rápidamente activadas por sus propias reservas internas (Anita-Sari et al., 2018). Según Bewley et al. (2013), señala que durante la germinación la semilla aprovecha las reservas almacenadas en el endospermo o en los cotiledones, que se sintetizan durante la maduración de la semilla y son suficientes para mantener las primeras etapas del desarrollo. Dado lo anterior, en el estudio la semilla germinó favorecida por su endospermo ya que todavía no tenía raíces, no pudo absorber los reguladores de crecimiento y por tanto los tratamientos no influenciaron en la germinación.

Los reguladores de crecimiento pueden tener efectos nulos o positivos sobre la germinación, dependiendo de varios factores, entre ellos la especie. En algunos casos estos compuestos son eficaces para romper la latencia en semillas y estimular el proceso de germinación (Moncada,

2016). En este estudio, tanto la kinetina como el 2,4-D no mostraron un efecto diferente al control, presentando respuesta germinativa en todos los tratamientos.

Longitud de tallo

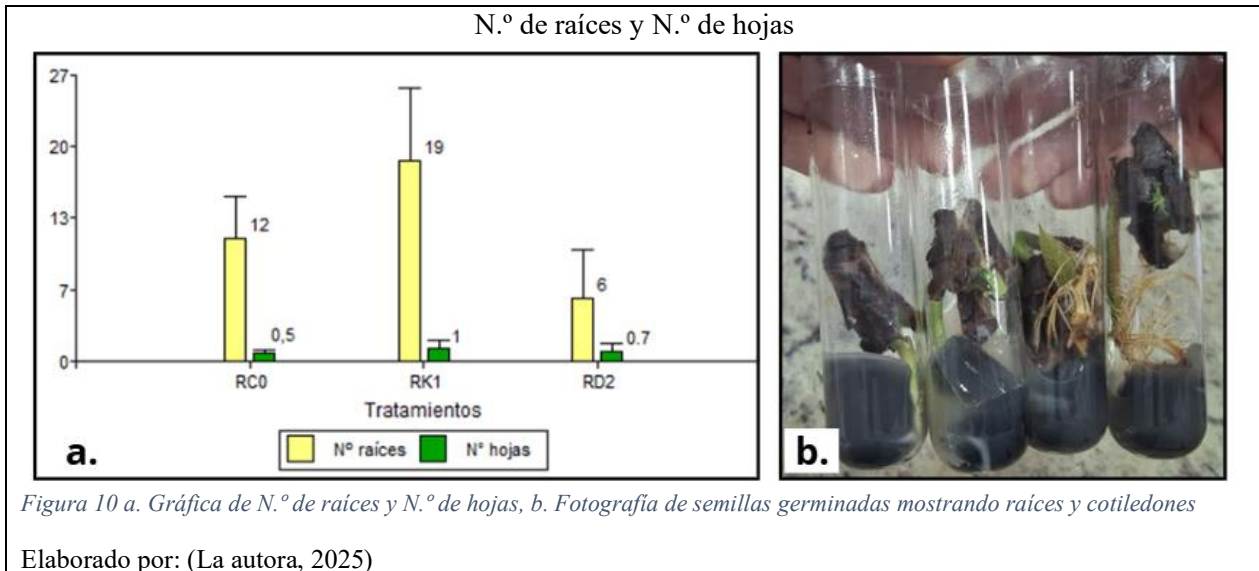
Para la variable de longitud de tallo no se encontraron diferencias significativas entre tratamientos ($p > 0,05$). En la figura 9 se observa que el control RC0 presenta la mayor longitud de tallo (4,12 cm). Mientras que RK1 y RD2 tienen un crecimiento intermedio, con medias de 3,57 y 3,53 cm, respectivamente. Bajo las condiciones evaluadas los reguladores de crecimiento aplicados no influyen significativamente en el crecimiento del tallo de las plántulas de cacao.

Vanderhoef & Key (1968), han demostrado que la kinetina aplicada a hipocótilo de soja, inhibe directamente el crecimiento longitudinal. También en la investigación de Mohamad et al. (2022), observaron que al incrementar las concentraciones de kinetina sus resultados se vieron afectados en cuanto a la longitud de brotes. Esto podría explicar que la kinetina no favoreció un mayor crecimiento del tallo en condiciones *in vitro*, ya que el control presentó tallos más largos.

El regulador de crecimiento 2,4-D es una auxina que se usa especialmente para inducir embriogénesis somática y callos en varias plantas y no está enfocada en alargamientos de tallo. Neumeister (2013), menciona que esta auxina puede provocar producción excesiva de etileno y ácido abscísico lo que resulta crecimientos anormales o mortalidad. Además, en el estudio en campo de *Rubus idaeus* (frambuesa), se observó que una concentración superior al 0,3% de 2,4-D no promovieron el crecimiento de la altura de las plántulas (Mejía et al., 2015). Por estas razones, el 2,4-D pudo haber inhibido el crecimiento del tallo, ya que presentó el tallo más corto entre los tratamientos.

Número de raíces y hojas

El valor de $p > 0,05$ indica que no hay diferencia significativa entre tratamientos para ambas variables. En la figura 10 el tratamiento RK1 tiene la mayor cantidad de raíces (19 raíces y 1 hoja), el tratamiento control (RC0) presenta una cantidad intermedia (12 raíces y 0,5 hojas) y el tratamiento RD2 presenta la menor cantidad (6 raíces y 0,7 hojas).

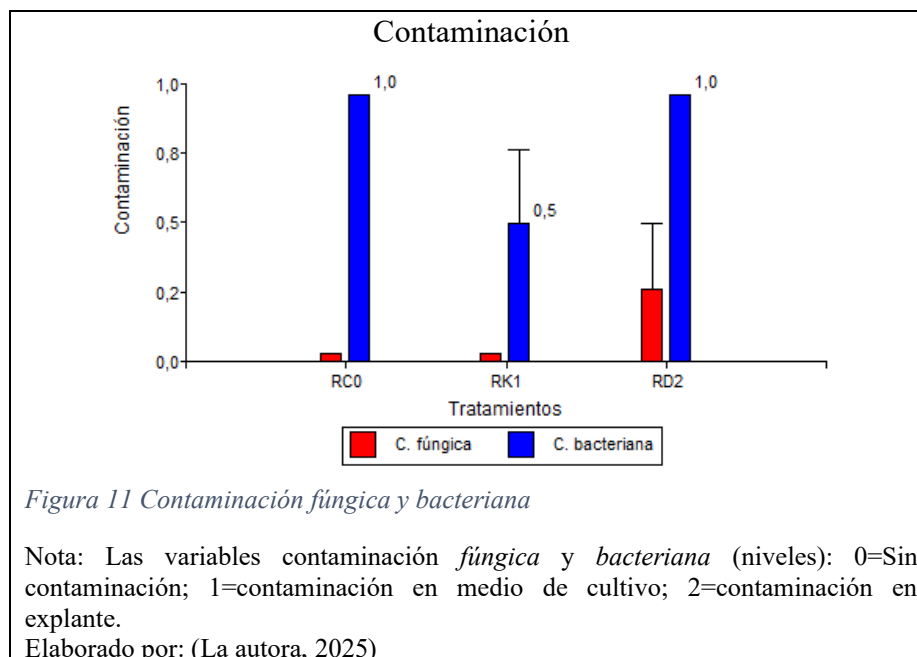


En el estudio de cacao se observó que la kinetina aumentó el número de raíces en comparación al control, según Šmeringai et al. (2023), sugiere que la kinetina podría mejorar la actividad meristemática y con ello la formación de raíces. La auxina (2,4-D), por otro lado, redujo significativamente la formación de raíces en comparación con el control. Hidalgo (2019), indica que esta auxina es más usada para desarrollar callos y embriogénesis somática.

Wang et al. (2016), demostraron que el crecimiento radicular vigoroso asegura la absorción eficiente de macro y micronutrientes en etapas tempranas. En nuestro caso, el mayor número de raíces en RK1 pudo aumentar la captación de nutrientes, impulsando así la formación de más raíces y a su vez más hojas.

Contaminación fúngica y bacteriana

Para las variables contaminación fúngica y bacteriana se encontró que no hay diferencia significativa entre tratamientos con valor de ($p > 0,05$). En la figura 11 la contaminación fúngica en RC0 y RK1 es de nivel 0 (sin contaminación), pero el tratamiento RD2 alcanzó 0,5 lo que indica que uno o más repeticiones se vio afectada (nivel 1). En cuanto a contaminación bacteriana se muestra que el tratamiento RK1 es el único que presentó menor contaminación (nivel 1), en comparación a RC0 y RD2 que presentaron el 100% de explantes con contaminación nivel 1.



En este caso, el uso de auxina (2,4-D) pudo haber favorecido el crecimiento bacteriano, coincidiendo con lo observado por Vaca (2008), que indica el mismo problema y señaló que la contaminación pudo haber sido afectada por el tipo de regulador de crecimiento, como la auxina que puede favorecer la proliferación de microorganismos. Además, menciona que ciertos reguladores de crecimiento reducen la contaminación ocasionada por algunos patógenos, como en la presente investigación la kinetina.

5 Conclusiones

En la revisión sistemática se seleccionaron 8 artículos de los cuales Ajijah et al. (2016); Garate-Navarro & Arévalo-Gardini, (2017), y Calderón & Montes de Godoy (2017), usaron hipoclorito de sodio y azoxistrobina en diferentes concentraciones en el protocolo de desinfección, su enfoque principal fue inducir respuestas morfogénicas en cacao, los autores reportan exitosa embriogénesis somática. Las mejores concentraciones fueron evaluadas en la fase de laboratorio.

Conforme la revisión bibliográfica la combinación y la elección adecuada de reguladores de crecimiento, además de otros factores influyen en la respuesta morfogénica. En el estudio de Kahia et al. (2017), se alcanzó una frecuencia embriogénica de 98,7%) en el clon C1 de cacao, adicionando 2,21 ppm de 2,4-D y 1,07 ppm de kinetina al medio. Por otro lado, Díaz-López et al. (2018), recomienda usar estaminodios cultivados en medio adicionado con 1,5 mg.L⁻¹ de 2,4-D con 6-BA para alcanzar 40% de embriogénesis; y en medio con 2 mgL⁻¹ de 2,4-D y 6-BA, para obtener el mayor número de embriones (15). Los reguladores de crecimiento y dosis recomendadas por los autores fueron usados en la fase de laboratorio.

En el protocolo de desinfección se evaluaron dos concentraciones de hipoclorito de sodio y fungicida sobre tres explantes, todos los tratamientos presentaron 100% de contaminación fúngica y 100% de mortalidad en yemas y estaminodios. Las semillas presentaron 100% de contaminación bacteriana, a pesar de ello, alcanzaron 100% de germinación. Los tratamientos no presentaron diferencias significativas, sin embargo, se puede mencionar que el T1 (MS 100%) inhibió la formación de raíces (1) y longitud de tallo (2,11 cm) en las plántulas. Además, se encontró relación positiva entre el número de raíces y longitud de tallo.

En la evaluación de los reguladores de crecimiento, los explantes de yemas y estaminodios presentaron 100% de contaminación fúngica y mortalidad. Mientras que, en explantes de

semillas alcanzaron 100% germinación, a pesar de mostrar 100% de contaminación bacteriana. Los tratamientos no presentaron diferencias significativas entre ellos, sin embargo, se observa que la kinetina (1ppm) estimuló una mayor formación de raíces (19) y hojas (0,7) en comparación con los demás tratamientos.

6 Bibliografía

- Abdalla, N., El-ramady, H., Seliem, M. K., El-mahrouk, M. E., Taha, N., Bayoumi, Y., Shalaby, T. A., & Dobr, J. (2022). An Academic and Technical Overview on Plant Micropropagation Challenges. *Horticulturae*, 8, 677. <https://doi.org/10.3390/horticulturae8080677>
- Adema, M. (2015). ¿Por dónde empezamos? Establecimiento de cultivos *in vitro*- plantas madres. Explantes. In *Notes and Queries* (Vol. 175, Issue 25, p. 440). <https://doi.org/10.1093/nq/175.25.440-a>
- Adu, M. O., Cobbinah, T., Asare, P. A., Yawson, D. O., & Taah, K. J. (2017). Demucilaging Freshly Stored Seeds of Cocoa (*Theobroma cacao* L.) Improves Seedling Emergence and Growth. *Journal of Botany*, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/1938359>
- Ajjjah, N., Hartati, R. S., Rubiyono, Sukma, D., & Sudarsono. (2016). Effective cacao somatic embryo regeneration on kinetin supplemented DKW medium and somaclonal variation assessment using SSRs markers. *Agrivita*, 38(1), 80–92. <https://doi.org/10.17503/agrivita.v38i1.619>
- Alcantara, J. S., Acero, J., Alcántara, J. D., & Sánchez, R. M. (2019). Principales reguladores hormonales y sus interacciones en el crecimiento vegetal. *Nova*, 17(32), 109–129. <https://doi.org/10.22490/24629448.3639>
- Anita-Sari, I., Setyawan, B., & Wahyu Susilo, A. (2018). Germination and Water Content of Cocoa Seeds After Storage Treatments. *Pelita Perkebunan (a Coffee and Cocoa Research Journal)*, 34(3), 146–155. <https://doi.org/10.22302/iccri.jur.pelitaperkebunan.v34i3.329>
- Barrezueta-Unda, S., Carpio, E. P., & Sarmiento, R. J. (2017). Características Del Comercio De Cacao A Nivel Intermediario En La Provincia De El Oro-Ecuador. *European Scientific Journal, ESJ*, 13(16), 273. <https://doi.org/10.19044/esj.2017.v13n16p273>
- Bewley, J. D., Bradford, K. J., Hilhorst, H. W. M., & Nonogaki, H. (2013). Seeds: Physiology of development, germination and dormancy, 3rd edition. In *Seeds: Physiology of Development, Germination and Dormancy, 3rd Edition* (Vol. 9781461446, Issue C, pp. 1–392). <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4693-4>
- Bhoite, H. A., & Palshikar, G. S. (2014). Plant Tissue Culture: A Review. *World J. Pharm. Sci.*, 2(6), 65–572. <http://www.wjpsonline.org/>
- Bogado F, Vera Bravo C, Ayala P, Sanberro P, & Luna C. (2016). Uso de distintos desinfectantes superficiales para el establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de *Grevillea robusta*. *Ciencias Agronómicas*, 1–6. <https://ri.conicet.gov.ar/handle/11336/25301>
- Calderón, 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, 6, 87–95.

<https://doi.org/10.5377/payds.v6i0.5721>

Cassells, A. C., & Curry, R. F. (2001). Oxidative stress and physiological, epigenetic and genetic variability in plant tissue culture: Implications for micropropagators and genetic engineers. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 64(2–3), 145–157.

<https://doi.org/10.1023/A:1010692104861>

Castañeda, S., Gutarra, B., & La Rosa, R. (2015). Introducción *in vitro* de *Theobroma cacao* L. mediante cultivo de embriones sexuales. *10mo Congreso Internacional de Biotecnología Vegetal, March 2016*.

https://www.researchgate.net/publication/296668067_Introduccion_in_vitro_de_Theobroma_cacao_L_mediante_cultivo_de_embryones_sexuales

Cedeño, M. (2024). Cifras del cacao. *Estadísticas de Exportación de Cacao - ANECACAO. Resultados Año Cacaotero 2022/2023*, 40. <https://anecacao.com/wp-content/uploads/2024/02/REVISTA-DIGITAL-ANECACAO-ENERO-2024.pdf>

Correia, S., & Matos, M. (2024). Advances in Blueberry (*Vaccinium* spp.) In Vitro Culture : A Review. *Horticulturae*.

<https://doi.org/10.3390/horticulturae10060533>

Delvalle, W. E. (2001). Propagación *in vitro* de *Stevia rebaudiana* B. a partir de segmentos nodales. *Zamorano*.

<https://bdigital.zamorano.edu/bitstream/11036/1437/1/CPA-2001-T028.pdf>

Díaz-López, A. A., Salazar-Yamarte, E. G., Albarrán-Rincón, J. G., Marín, C., & Vegas-García, A. L. (2018). Efecto de diferentes reguladores de crecimiento sobre la embriogénesis somática en tres cultivares de cacao. *Agronomía Tropical*, 68, 137–152.

<http://www.publicaciones.inia.gob.ve/index.php/agronomiatropical/article/view/477/373>

Echenique, M. A., & Calle, D. (2020). Efecto de diferentes métodos de desinfección en el establecimiento *in vitro* de Cacao (*Theobroma Cacao* L.) En la estación experimental Sapecho - Bolivia. *Revista de Investigación e Innovación Agropecuaria y de Recursos Naturales*, 7(1), 48–54.

http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2409-16182020000100007&lng=es&nrm=iso&tlng=es

Espinosa-Reyes, Á., Silva-Pupo, J. J., Bahi-Arevich, M., & Romero-Cabrera, D. (2019). Influencia del tamaño de las plantas *in vitro* y tipo de sustrato en la aclimatación de *Morus alba* L. *Pastos y Forrajes*, 42(1), 1–19.

<http://scielo.sld.cu/pdf/pyf/v42n1/2078-8452-pyf-42-01-23.pdf>

Fernández, C. F., Lezcano, M. I. D., & Segnana, L. R. G. (2016). Enraizamiento *in vitro* de embriones cigóticos de *acrocomia aculeata* (Jacq.) lodd ex mart. *Colombia Forestal*, 19(1), 67–78.

<https://doi.org/10.14483/udistrital.jour.colomb.for.2016.1.a05>

- Garate-Navarro, M. A., & Arévalo-Gardini, E. (2017). Induction of Somatic Embryogenesis from Cocoa Farmer Field Collection of ICT - Peru. *International Annals of Science*, 2(1), 6–11. <https://doi.org/10.21467/ias.2.1.6-11>
- Gil, A., López, E., & López, A. (2016). Efecto sinérgico del ácido indolacético, ácido giberélico y 6-bencilaminopurina en la propagación in vitro de “papaya” *Carica papaya* L. (Caricaceae). *Arnaldoa*, 23(2). <https://doi.org/10.22497/arnaldoa.232.23210>
- Giménez, I. (1989). Ensayos sobre la fitotoxicidad del benomyl , triforina y thiocur , en plántulas de naranjo amargo (*Citrus aurantium* L .). *Bol. San. Veg. Plagas*, 15, 57–65.
- Gómez, S. (2010). Evaluación de la propagación in vitro en cinco clones promisorios de cacao (*Theobroma cacao* L.). Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Henao, A. M., Morales, J. D., Vanegas, D. M., Hernández, R. T., & Urrea-Trujillo, A. I. (2023). Regeneration of cocoa (*Theobroma cacao* L.) via somatic embryogenesis: Key aspects in the *in vitro* conversion stage and in the *ex vitro* adaptation of plantlets. *Bionatura*, 8(1). <https://doi.org/10.21931/RB/2023.08.01.10>
- Hidalgo, C. (2014). Estudio preliminar para la obtención de explantes de cacao *Theobroma cacao* L. a través de embriogénesis somática [Universidad de Guayaquil]. <https://repositorio.ug.edu.ec/items/5d8554e7-7286-4956-bfae-85d53b7d7f64>
- Hidalgo, S. (2019). Evaluación de dos medios de cultivo para la formación de callo en pétalos y estaminoides de cacao (*Theobroma cacao* L.) cultivados *in vitro*. <https://bdigital.zamorano.edu/server/api/core/bitstreams/6fa4e4aa-ca55-4fbf-9a1e-0559bf8d74d0/content>
- Imán, S., Samanamud, A., Paredes, C., Chuquizuta, B., & Arévalo, M. (2024). *Descriptores para cacao*. 40. <https://hdl.handle.net/20.500.12955/2457>
- Indacochea, B., Parrales, J., Hernández, A., & Castro, C. (2018). *Evaluación De Medios De Cultivo in Vitro Para Especies*. 42(1), 63–89.
- Indacochea-Ganchozo, B., Parrales-Villacreses, J., Castro-Piguave, C., Vera-Tumbaco, M., & Gabriel-Ortega, J. (2017). Aclimatación *in vitro* de especies forestales nativas del Sur de Manabí en peligro de extinción . *Journal of the Selva Andina Research Society*, 8(2), 124–134. <https://doi.org/10.36610/j.jsars.2017.080200124>
- Ishida, A., Ogiwara, I., & Suzuki, S. (2023). Elevated CO2 Influences the Growth, Root Morphology, and Leaf Photosynthesis of Cacao (*Theobroma cacao* L.) Seedlings. *Agronomy*, 13(9), 1–13. <https://doi.org/10.3390/agronomy13092264>
- Kahia, J., Kone, S., Diby, L., Ngoran, G., Dadjo, C., & Kouame, C. (2017). Enhanced plantlet regeneration in two cacao (*Theobroma cacao*) clones from immature inflorescence explants. *HortScience*, 52(6), 892–895. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI11844-17>

- Kouassi, M. K., Kahia, J., Kouame, C. N., Tahi, M. G., & Koffi, E. K. (2017). Comparing the effect of plant growth regulators on callus and somatic embryogenesis induction in four elite *Theobroma cacao* L. genotypes. *HortScience*, 52(1), 142–145. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI11092-16>
- Lara-Ascencio, M., Andrade-Rodríguez, M., Guillén-Sánchez, D., Sotelo-Nava, H., & Villegas-Torres, O. G. (2021). Establishment of in vitro aseptic culture of *Philodendron xanadu* Croat. *Revista Ciencia Agronomica*, 52(2), 1–9. <https://doi.org/10.5935/1806-6690.20210024>
- Li, Z., Traore, A., Maximova, S., & Gultinan, M. J. (1998). Somatic embryogenesis and plant regeneration from floral explants of cacao (*Theobroma cacao* L.) using thidiazuron. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 34(4), 293–299. <https://doi.org/10.1007/BF02822737>
- Loor, M. A. N., Ponce, F. C. M., & Pico-Mendoza, J. (2024). Propagación *in vitro* de *Annona deceptrix* (westra) H. Rainer (Annonaceae) una especie en peligro de extinción en Ecuador. *Newsletter of Japan Society for Comparative Endocrinology*, 1, 12. https://doi.org/10.5983/nl2001jsce.2003.111_52
- Maldonado, Casto. (2015). Efecto del manejo en la reducción de incidencia de enfermedades (Moniliasis, Escoba de Bruja y Mazorca Negra) en el cultivo de Cacao (*Theobroma cacao* L.) en la Estación Experimental de Sapecho | Apthapi. *Apthapi*, 1(1), 88–93. <http://apthapi.agro.umsa.bo/index.php/ATP/article/view/132>
- Martínez, M. (2015). *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni - A Review. *Indian Journal of Natural Products and Resources*, 1(3), 267–286.
- Martínez-Hernández, N. C., Dávila-Figueroa, C. A., Morales-Sema, J. A., Castro-Cerritos, K. V., Martínez-Galero, N. X., López-Arjona, H., & Villalobos-Amador, E. (2024). 6-benzylaminopurine induces somatic embryogenesis in staminodia of new genotypes of *Theobroma cacao* L. from the Papaloapan Basin of Mexico and reveals differences with *T. bicolor*. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 157, 157(July). <https://doi.org/10.1007/s11240-024-02783-9>
- Mejía, F., López, E., De la Cruz, J., & Gonza, A. (2015). Efecto de la concentración “frambueso” en condiciones de invernadero. 2(2), 17–26.
- Mendoza, E. Y., Cervantes, X., & Zamora, E. A. (2022). Recorrido histórico de la importancia del cacao para la economía de Ecuador. *Sinergias Educativas*, 1(1), 13. <https://doi.org/https://doi.org/10.37954/se.vi.193>
- Mohamad, M. E., Awad, A. A., Majrashi, A., Esadek, O. A. A., El-Saadony, M. T., Saad, A. M., & Gendy, A. S. (2022). *In vitro* study on the effect of cytokines and auxins addition to growth medium on the micropropagation and rooting of Paulownia species (*Paulownia hybrid* and *Paulownia tomentosa*). *Saudi Journal of Biological Sciences*, 29(3), 1598–1603. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.11.003>
- Molins, F., & Serrano, M. A. (2019). Bases neurales de la aversión a las pérdidas en contextos económicos: revisión sistemática según las directrices PRISMA. *Revista de Neurología*, 68(02), 47. <https://doi.org/10.33588/rn.6802.2018276>

- Moncada, A. (2016). Influencia de los reguladores de crecimiento Kinetina y Ácido giberélico sobre la germinación de semillas de *Bixa Orellana* en cultivo *in vitro*.
- Mongelós-Franco, Y., Mussi-Cataldi, C., Duarte-Ovejero, N., & Díaz-Lezcano, M. (2020). Protocolo de desinfección para establecimiento *in vitro* de meristema apical de banano *Musa spp.* *Cedamaz*, 10(2), 47–50.
<https://revistas.unl.edu.ec/index.php/cedamaz/article/view/815>
<https://revistas.unl.edu.ec/index.php/cedamaz/article/view/815>
- Montesinos, H., Raúl, A., Pérez, P., Abreu Cruz, J. ;, Herrera Villafranca, A. ;, Herrera García, M. ;, & Segundo, R. (2023). Evaluation of the effect of disinfection of Cuba CT-115 grass explants with sodium hypochlorite. *Cuban Journal of Agricultural Science*, 57. <https://orcid.org/0000-0003>
- Morales, F. L., Carrillo, M. D., Ferreira, J. A., Peña, M. M., Briones, W. R., & Albán, M. N. (2018). Cadena de comercialización del cacao nacional en la provincia de Los Ríos, Ecuador. *Ciencia y Tecnología*, 11(1), 58–64.
<https://doi.org/10.18779/cyt.v11i1.131>
- Musdalifa, Asman, A., & Rosmana, A. (2021). The response of different fungicides against *Lasiodiplodia pseudotheobromae* causing dieback disease of cocoa through *in vitro* test. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 807(2).
<https://doi.org/10.1088/1755-1315/807/2/022091>
- Narvaez, R., & Guaman, R. (2019). Evaluación de la germinación *in vitro* de embriones de cacao (*Theobroma cacao L.*) en dos medios de cultivos con diferentes dosis de Giberelinas. https://www.redisd.org/index.php/es/resumen-recibidos-mt1/716-evaluacion-de-la-germinacion-in-vitro-de-embriones-de-cacao-theobroma-cacao-l-en-dos-medios-de-cultivos-con-diferentes-dosis-de-giberelinas-2?utm_source=chatgpt.com
- Neumeister, L. (2013). Riesgos del Herbicida 2,4-D. *La Tierra*, 18–19.
- Osorio, T., Henao, A. M., de la Hoz Vasquez, T., & Urrea, A. I. (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>
- Pantoja, I. P., Vásquez, J. P., & Chia, J. A. (2014). Resultados preliminares del control de la contaminación *in vitro* en micropropagación de *Theobroma cacao L.* en la ... (Issue January).
- Pantone. (2025). *Tabla de colores Pantone*. <https://www.logorapid.com/pantone>
- Peña-López, J. L., Azpeitia-Morales, A., Mirafuentes-Hernández, F., Ruíz-Carrera, V., Sáenz-Carbonell, L., Peña-López, J. L., Azpeitia-Morales, A., Mirafuentes-Hernández, F., Ruíz-Carrera, V., & Sáenz-Carbonell, L. (2016). Incremento de embriones somáticos de Cacao (*Theobroma cacao L.*) en sistema de inmersión automático. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios*, 3(8), 215–224.
http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-90282016000200215&lng=es&nrm=iso&tlng=es

- Sampayo-Maldonado, S., Castillo-Martínez, C. R., Jasso-Mata, J., Jiménez-Casas, M., López-Upton, J., & Sánchez-Monsalvo, V. (2016). Efecto del medio de cultivo en la propagación *in vitro* de genotipos de *Cedrela odorata* L. *Agroproductividad*, 9(2), 62–69.
<http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=fap&AN=114248578&site=ehost-live>
- Shaik, S. P., & Thomas, P. (2019). In vitro activation of seed-transmitted cultivation-recalcitrant endophytic bacteria in tomato and host–endophyte mutualism. *Microorganisms*, 7(5). <https://doi.org/10.3390/microorganisms7050132>
- Šmeringai, J., Schruppfová, P. P., & Pernisová, M. (2023). Cytokinins – regulators of de novo shoot organogenesis. *Frontiers in Plant Science*, 14(August), 1–15.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1239133>
- Solis, K., Peñaherrera, S., & Vera, D. (2021). Las enfermedades del cacao y las prácticas agronómicas para su manejo. *Mocache, EC: INIAP, Estación Experimental Tropical Pichilingue., Guía Número, 22.*
<http://repositorio.iniap.gob.ec/handle/41000/5747>
- Sornoza, Lady, Valencia, L., Corozo, L., Sánchez, F., Peña, M. G., & Salas-Macías, C. (2022). Recursos genéticos de variedades de cacao tipo Nacional en Ecuador: una revisión sistemática. *Ciencia y Tecnología*, 15(2), 31–44.
- Teixeira da Silva, J. A., Gulyás, A., Magyar-Tábori, K., Wang, M. R., Wang, Q. C., & Dobránszki, J. (2019). *In vitro* tissue culture of apple and other Malus species: recent advances and applications. In *Planta* (Vol. 249, Issue 4). Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/s00425-019-03100-x>
- Torres de la Cruz, M., Ortiz, C., Téliz, D., Mora, A., & Nava, C. (2013). Efecto del Azoxystrobin Sobre *Moniliophthora roreri*, Agente Causal de la Moniliasis del Cacao (*Theobroma cacao*). *Revista Mexicana De Fitopatología*, 31(1), 65–69.
<http://www.scielo.org.mx/pdf/rmfi/v31n1/v31n1a7.pdf>
- Ureta, M. I., Mera, R. B., Franco Faria de Sousa, S. M., & Vera, J. M. (2023). Factores culturales en la producción de cacao en Manabí-Ecuador. *ReHuSo: Revista de Ciencias Humanísticas y Sociales*, 8(2), 60–74.
<https://doi.org/10.33936/rehuso.v8i2.5744>
- Vaca, I. (2008). Incremento del número de brotes de Babaco (*Vasconcellea x heilbornii* cv BABACO) *in vitro* mediante la interacción de reguladores de crecimiento para la regeneración de plantas completas [Escuela Politécnica del Ejército].
<https://scispace.com/pdf/incremento-del-numero-de-brotes-de-babaco-vasconcellea-x-1zr6jdywjn.pdf>
- Vanderhoef, L. N., & Key, J. L. (1968). Inhibition by kinetin of cell elongation and RNA synthesis in excised soybean hypocotyl. *Plant and Cell Physiology*, 9(2), 343–351.
<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a079350>
- Villarreal, B. (2015). ¿Cómo se forman los nuevos órganos *in vitro*? In *Notes and Queries* (Vol. 175, Issue 25, p. 440). <https://doi.org/10.1093/nq/175.25.440-a>

Wang, Y., Thorup-Kristensen, K., Jensen, L. S., & Magid, J. (2016). Vigorous root growth is a better indicator of early nutrient uptake than root hair traits in spring wheat grown under low fertility. *Frontiers in Plant Science*, 7(JUNE2016), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00865>

Wang, Y., Zhang, X., Jiang, Z., Yang, X., Liu, X., Ou, X., Su, W., & Chen, R. (2023). Establishment and Optimization of Micropropagation System for Southern Highbush Blueberry. *Horticulturae*, 9(8), 1–14. <https://doi.org/10.3390/horticulturae9080893>

Zambrano, L. (2025, April 6). El cacao consolida su momento de gloria superando al banano. *El Expreso*. <https://www.expreso.ec/actualidad/economia/cacao-consolidamomento-gloria-superando-banano-228488.html>

7 Anexos

