

EVALUACIÓN COMPARATIVA DE EXPLANTES Y MEDIOS DE CULTIVO EN ESTABLECIMIENTO *IN VITRO* DEL CACAO BOLIVIANO (*Theobroma cacao* L.) EN LA ESTACIÓN EXPERIMENTAL SAPECHO

Comparative evaluation of explants and culture media in the *in vitro* establishment of bolivian cacao (*Theobroma cacao* L.) at the Sapecho Experimental Station

Erika Lima Marca^{1*}, Félix Fernando Manzaneda Delgado²,
Marco Antonio Echenique Quezada³, Juan José Aparicio Porres⁴

RESUMEN

Se buscaba mejorar la propagación y conservación del cacao nacional boliviano. Este estudio evaluó la eficiencia de explantes (estaminodios y pétalos) y medios de cultivo para la propagación *in vitro*. La investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología de la Estación Experimental de Sapecho, durante septiembre 2023 a junio 2024. Su metodología consistió en selección de botones florales de cacao, preparar medios de cultivo (M1, M2 y M3) basados en Murashige y Skoog, variando componentes como agua de coco, ácido giberélico, ácido ascórbico y ácido cítrico, luego se hizo la desinfección y establecimiento. Como resultados, los estaminodios presentaron menor contaminación (57 %) que los pétalos (97 %). El medio de cultivo M1 mostró menor tasa de contaminación (70 %), con agua de coco; en supervivencia, los estaminodios cultivados en el medio M1 mostraron la mayor tasa de supervivencia (41,67 %); mientras que, en formación de callos, los estaminodios en medios M1 y M3 presentaron mejores datos (40 % y 32 % respectivamente), mientras que el ácido giberélico en el medio M2 favorece la formación de callos en los pétalos (5 %). Como conclusión, los estaminodios son mejores explantes, ya que presentan menor contaminación y mayor tasa de supervivencia. El medio de cultivo M1, con agua de coco, fue el más adecuado para formación de callos en los estaminodios. La combinación explante y medio de cultivo influye significativamente en el éxito del cultivo *in vitro*. Estos hallazgos proporcionan una base para desarrollar protocolos de propagación *in vitro* más eficientes para el cacao nacional boliviano.

Palabras clave: *Theobroma cacao*, medio de cultivo, botones florales, establecimiento, *in vitro*.

ABSTRACT

The aim was to improve the propagation and conservation of Bolivian national cocoa. This study evaluated the efficiency of explants (staminodes and petals) and culture media for *in vitro* propagation. The research was conducted at the Biotechnology Laboratory of the Experimental Station of Sapecho, from September 2023 to June 2024. The methodology consisted of selecting cacao flower buds, preparing culture media (M1, M2, and M3) based on Murashige and Skoog, varying components such as coconut water, gibberellic acid, ascorbic acid, and citric acid, followed by disinfection and establishment. The results showed that staminodes had lower contamination (57 %) compared to petals (97 %). The M1 culture medium, with coconut water, showed the lowest contamination rate (70 %); in terms of survival, staminodes cultivated in the M1 medium showed the highest survival rate (41.67 %); while for callus formation, staminodes in M1 and M3 media presented better results (40% and 32% respectively), and gibberellic acid in the M2 medium favored callus formation in petals (5 %). In conclusion, staminodes are better explants as they show lower contamination and higher survival rates. The M1 culture medium, with coconut water, was the most suitable for callus formation in staminodes. The combination of explant and culture medium significantly influences the success of *in vitro* cultivation. These findings provide a basis for developing more efficient *in vitro* propagation protocols for Bolivian national cocoa.

Keywords: *Theobroma cacao*, culture medium, flower buds, establishment, *in vitro*.

Artículo original

DOI: <https://doi.org/10.53287/zpav8693jf95q>

Recibido: 16/11/2024

Aceptado: 27/12/2024

^{1*}Autor de correspondencia: Facultad de Agronomía, Universidad Mayor de San Andrés, Bolivia. elimamarca@gmail.com

² Docente Investigador, Facultad de Agronomía, Universidad Mayor de San Andrés, Bolivia. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0169-2411>. fmanzaneda@umsa.bo

³ Docente Investigador, Instituto de Investigaciones Agropecuarias y de Recursos Naturales, Facultad de Agronomía, Universidad Mayor de San Andrés, Bolivia. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7574-2258>. maehenique@umsa.bo

⁴ Docente Investigador, Instituto de Investigaciones Agropecuarias y de Recursos Naturales, Facultad de Agronomía, Universidad Mayor de San Andrés, Bolivia. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4555-4037>. jjaparicio@umsa.bo

INTRODUCCIÓN

En Bolivia, se cultivan distintas variedades de cacao (*Theobroma cacao* L.): el cacao foráneo, que incluye grupos genéticos de la Amazonia, el cacao trinitario, que es una hibridación entre el cacao criollo y genotipos amazónicos, y el cacao nacional boliviano (CNB), que ha sido cultivado tradicionalmente desde la época colonial (Arvelo et al., 2017). En el norte de La Paz, se tienen comunidades que producen cacao nacional boliviano silvestre (Tacanas y Mosetenes). Estos cacaos son apreciados en los mercados especializados de cacao fino por sus características únicas de sabor y aroma, así como por su rusticidad en las condiciones de bosque y cierta resistencia a las enfermedades. Las cualidades organolépticas lo equiparan con el cacao Nacional de Ecuador, que es conocido en mercados especializados (July, 2007).

La producción de cacao está en manos de pequeños y medianos productores y la tecnología que se usa es manual en su mayor parte. Es por esta razón que el cacao boliviano goza de buena aceptabilidad, especialmente porque se maneja de forma sostenible u orgánica, motivo por el cual tiene acceso al mercado internacional (Maldonado et al., 2016). El cacao es uno de los cultivos más importantes de América Latina genera 1.5 millones de empleos. La propagación convencional no satisface la demanda de material genético mejorado, esto se podría lograr por medio de la propagación *in vitro*. (Ortega, 2022).

El cultivo de tejidos *in vitro* incluye técnicas que permiten establecer, mantener y manipular diversas partes de una planta, desde una célula hasta un organismo completo, en condiciones artificiales, asépticas y controladas. Estas técnicas son usadas principalmente para obtener plantas libres de patógenos, eliminando microorganismos como virus, bacterias y hongos presentes en los tejidos vegetales, mediante el uso de diversos productos y métodos de desinfección (Jiménez, 1998 citado por Solis, 2011).

El objetivo del presente trabajo, fue evaluar el tipo de explante para el establecimiento *in vitro* de cacao nacional. La investigación fue realizada en el marco del el Convenio Interinstitucional entre el Fondo Nacional de Desarrollo Forestal (FONABOSQUE) y la Universidad Mayor de San Andrés (UMSA) para la ejecución del proyecto “Manejo Integral y Bioconservación Ambiental de Frutos del Bosque en el Norte Amazónico del Departamento de La Paz (Fase I)”

MATERIALES Y MÉTODOS

Localización

La investigación se realizó en el Laboratorio de Biotecnología de la Estación Experimental de Sapecho (E.E.S.), dependiente de la Facultad de Agronomía de la Universidad Mayor de San Andrés, se ubica al Norte del departamento de La Paz, en la región de Alto Beni de la provincia Sud Yungas localidad de Sapecho a 15°33' Latitud Sur y 67° 20' Longitud Oeste, a 270 km del departamento de La Paz, a una altitud de 400 m s.n.m.

Materiales

Como material vegetal se utilizó botones florales, también se utilizó materiales de vidrio, equipos de laboratorio, indumentaria, reactivos químicos y sustancias desinfectantes.

Metodología

Selección de los botones florales adecuados (estaminodio y pétalos) para el cultivo *in vitro*, la recolección se realizó en las mañanas de 7:00 am, Se preparó las soluciones madres Stock, Las mismas están compuestas por cinco soluciones stock: A, B, C, D y E. Estas soluciones concentradas contienen, micronutrientes, macronutrientes, vitaminas y aminoácidos, en base a sales inorgánicas formuladas por Murashige y Skoog (1962).

Tabla 1. Medios de cultivo.

M1	M2	M3
Murashige y Skoog (1962)	Murashige y Skoog (1962)	Murashige y Skoog (1962)
10 ppm mioinotisol	10 ppm mioinotisol	10 ppm mioinotisol
1 ppm 2,4 Diclorofenoxiacetico	1 ppm 2,4 Diclorofenoxiacetico	1 ppm 2,4 Diclorofenoxiacetico
3 % sacarosa	3 % sacarosa	3 % sacarosa
10 ml Agua de coco	0,03 ml ácido giberelico	10 ml agua de coco
0,7 g Agar	20 mg de ácido ascórbico	20 mg de ácido ascórbico
	5 mg de ácido cítrico	5 mg de ácido cítrico
	0,7 g Agar	0,7 g Agar

Una vez hecha la desinfección, se realiza un corte a los botones florales con bisturí número 11 sobre una caja Petri, llegando así a un tamaño adecuado. Alcanzado el tamaño ideal del explante, con una pinza plana es sembrado en el medio Murashige y Skoog (MS) mencionado anteriormente. Realizada la siembra, se procede al sellado y marcado de las muestras, tomando en cuenta la fecha de establecimiento. Se lleva a la sala de incubación en donde se les sometió a las siguientes condiciones: temperatura 27 °C, humedad relativa de 66 %, con fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas oscuras.

Evaluación del desarrollo del explante:

- La primera evaluación se realizó a los catorce días en donde se cuantifico el número de explantes contaminados y establecidos.
- La segunda evaluación se realizó a los veintiocho días (muestra callos)
- La tercera evaluación se realizó a los cuarenta días, se cuantifico la cantidad de embriones somáticos que alcanzaron la maduración para ser tomados en cuenta como número de embriones somáticos por embrión cigótico.
- Se realizó el análisis de datos con el paquete estadístico Info Stat versión 2020.

Tiempo: El trabajo se realizó entre los meses de septiembre 2023 a junio 2024.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Porcentaje de contaminación por bacterias

Se realizó el respectivo análisis de varianza (ANVA) para porcentaje de contaminación por bacterias, las cuales son descritas en la Tabla 2.

Tabla 2. Análisis de varianza para contaminación por bacteria.

Fuentes de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F - calculado	p - valor	Significancia
Tipo explante	0,03	1	0,07	18,70	0,0002	**
Medio	0,01	2	2,9E-04	3,20	0,0585	N.S.
Tipo*medio	0,01	2	2,7E-03	3,20	0,0585	N.S.
Error	0,04	24	1,7E-03			
Total	0,09	29				

Nota: C.V. = 2.58; **= altamente significativo; *= significativo; NS = no significativo.

Los resultados presentados en el análisis de varianza en la Tabla 2, para el porcentaje de contaminación por bacteria, existe diferencia altamente significativa en el tipo de explante (Factor A), no existen diferencias significativas entre medios de cultivo (Factor B) y no existe diferencias significativas entre la interacción de (Factor A * B), teniendo un grado de confiabilidad de 2,58 % lo cual muestra que los datos fueron procesados correctamente.

Porcentaje de contaminación por hongos

Se realizó el respectivo análisis de varianza (ANVA) para porcentaje de contaminación por hongos, las cuales son descritas en la Tabla 3.

Tabla 3. Análisis de varianza para contaminación por hongos.

Fuentes de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F - calculado	p - valor	Significancia
Tipo explante	0,08	1	0,3	47,13	0,0001	**
Medio	4,8E-03	2	0,03	1,39	0,2691	N.S.
Tipo*medio	4,5E-03	2	0,08	1,30	0,2918	N.S.
Error	0,04	24	0,02			
Total	0,13	29				

Nota: C.V. = 2,47; **= altamente significativo; *= significativo; NS= no significativo.

Los resultados presentados en el análisis de varianza en la Tabla 3, nos indica que existe diferencia altamente significativa entre los tratamientos del factor A (tipo de explante), no existen diferencias significativas entre factor B (medios de cultivo) y no existe diferencias significativas entre la interacción de (Factor A * B), teniendo un grado de confiabilidad de 2,47 %, lo cual nos muestra que los datos fueron procesados correctamente.

Porcentaje de contaminación total

En la Figura 1, el explante estaminodio (EE) presenta menor contaminación con 57 %, en comparación con explante pétalos (EP) con 97 % de contaminación.

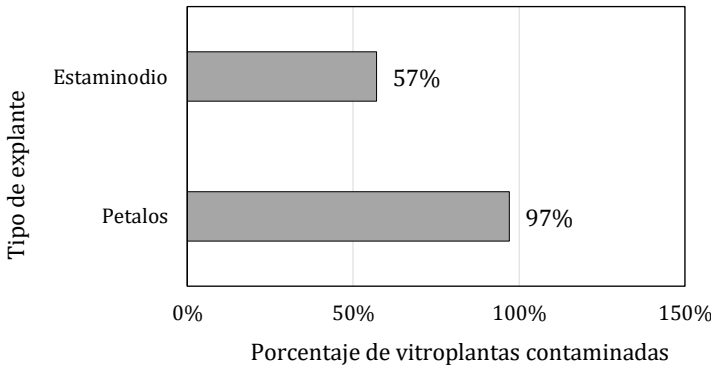


Figura 1. Porcentaje de contaminación: tipo de explante.

En un trabajo realizado con diferentes medios de cultivo, los explantes de estaminodios produjeron de 3 a 10 veces más embriones somáticos que los pétalos (Traore y Guiltinan, 2006). Los diferentes medios y protocolos de cultivo pueden influir en las tasas de contaminación. Los explantes de estaminodio preferían protocolos específicos que mejoraran su crecimiento y redujeran la contaminación (N'goran et al., 2023).

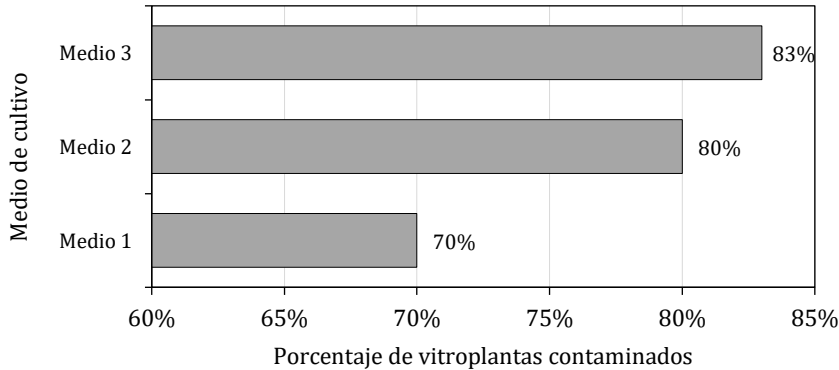


Figura 2. Porcentajes de contaminación: medio de cultivo.

En la Figura 2, el medio de cultivo (M1) que presenta menor contaminación con 70 %, en comparación con los medios de cultivo (M2 y M3) con 80 % y 83 % de contaminación respectivamente. La contaminación microbiana es uno de los problemas graves que limitan la extrapolación exitosa de las prácticas de cultivo de tejidos vegetales. Las fuentes de contaminación *in vitro* incluyen los recipientes de cultivo, los medios, los explantes, el equipo, el entorno de la sala de cultivo y el área de transferencia, y el personal operativo. El inicio exitoso del cultivo *in vitro* depende principalmente de la esterilización de la superficie de los explantes porque esta es la fuente principal (Sivanesan et al., 2021).

La elevada tasa de contaminación podría haber sido favorecida por las condiciones particulares del entorno, que está compuesto principalmente por árboles vigorosos y con un denso follaje. Junto con la alta densidad de siembra, estas características crean un ambiente de alta humedad y temperatura, con poca entrada de luz solar, ideal para el crecimiento de microorganismos como hongos y bacterias, que encuentran en las estructuras de las plantas los hospederos perfectos para su desarrollo.

Porcentaje de sobrevivencia

En la Figura 3, en explante pétalos se observa el porcentaje de sobrevivencia en el M2 con un 5 % que no presentan mucha diferencia entre los tres medios utilizados, pero en explante estaminodio se puede notar que el medio M1 si presenta la diferencia con los dos medios M2 y M3, se puede decir que el explante estaminodio logro adaptarse mejor en los medios propuestos.

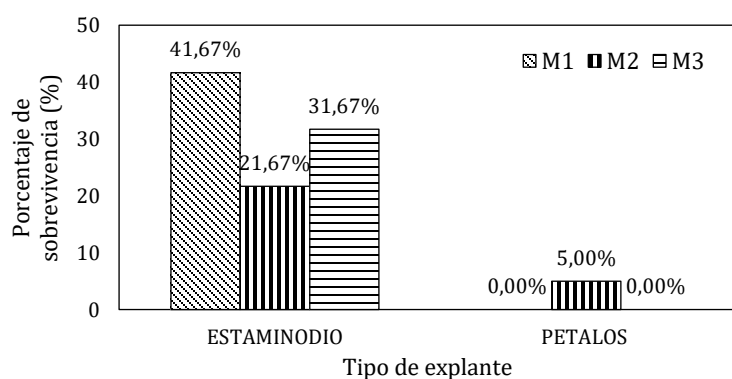


Figura 3. Porcentaje de sobrevivencia.

Gutiérrez (2009), señala que una de las principales desventajas al comenzar el cultivo *in vitro* es el porcentaje de sobrevivencia. Después del establecimiento, esto dependerá del manejo adecuado de los explantes, el medio de cultivo y el tipo de órgano utilizado, recomendándose en este caso el uso de botones florales.

Porcentaje de formación de callos

En la Figura 4, en el explante estaminodio los M1 y M3 muestran un mayor porcentaje de desarrollo, ya que estos medios tienen agua de coco, en el M2 y M3 se añadió además ácido cítrico y ácido ascórbico para mejorar la asepsia, en el M2 en vez de agua de coco se le añadió ácido giberelico es una hormona vegetal que promueve el crecimiento y la elongación celular que es usada en el cultivo *in vitro* para la formación de callos. En el explante pétalo en el M2 muestra un porcentaje de 5 % de formación de callo ya que este medio tiene ácido giberelico que promueve el crecimiento y la elongación celular que es usada en la formación de callos.

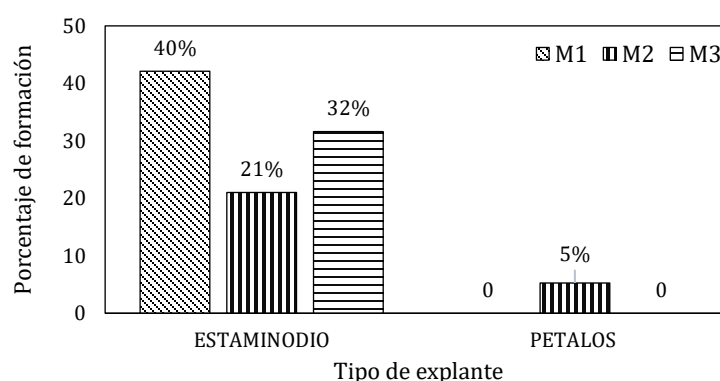


Figura 4. Porcentaje de formación de callos.

Chanatásig (2004), señala que a pesar de que la proliferación de callo se debe principalmente a la acción de los reguladores de crecimiento, éstos no actúan de manera independiente, sino que tienen una alta interacción con otros factores como los demás componentes del medio de cultivo, el genotipo y el tipo de explante que se utilice.

Miller (2009), afirma que la eficiencia no es aún la óptima para la regeneración de algunos genotipos, por lo que es necesario realizar los ajustes de los protocolos para cada genotipo en particular, pues se ha demostrado que el genotipo tiene un efecto importante en el resultado desde las primeras etapas del cultivo *in vitro*.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos indican que el explante estaminodio presentó una tasa de contaminación (57 %) significativamente menor en comparación con los pétalos (97 %). Esta diferencia podría atribuirse a la presencia de compuestos antifúngicos o bactericidas naturales en los estaminodios, o una mayor tolerancia de este tejido a los microorganismos. Además, la composición del medio de cultivo M1 (70 %), con su formulación específica, parece haber creado un ambiente menos favorable para el crecimiento de microorganismos contaminantes.

La combinación del explante estaminodio y el medio M1 resultó en la mayor tasa de supervivencia (41,67 %). La capacidad regenerativa del estaminodio, junto con la composición óptima del medio M1, crearon un ambiente favorable para el establecimiento y crecimiento de los cultivos. Estos resultados sugieren que la elección del explante y del medio de cultivo son factores interdependientes que deben considerarse cuidadosamente en los protocolos de cultivo *in vitro*.

La presencia de agua de coco en los medios M1 y M3 promovió una mayor formación de callos en los estaminodios (40 % y 32 % respectivamente). Sin embargo, la adición de ácido giberélico al medio M2 favoreció la formación de callos en los pétalos (5 %), lo que sugiere un efecto sinérgico entre este regulador de crecimiento y el tipo de explante. Estos hallazgos resaltan la importancia de la composición del medio de cultivo en la inducción de callos y sugieren que la combinación de diferentes componentes puede optimizar la respuesta de los explantes.

BIBLIOGRAFÍA

- Arvelo, M. Á., González, D., Maroto, S., Delgado, T., & Montoya, P. (2017). Manual técnico del cultivo de cacao: prácticas latinoamericanas. San José, Costa Rica: IICA.
<https://repositorio.iica.int/bitstream/11324/6181/1/BVE17089191e.pdf>
- Chanatasig, C. (2004). Inducción de la embriogénesis somática en clones superiores de cacao (*Theobroma cacao* L.), con resistencia a enfermedades fungosas. Turrialba, Costa Rica.
- Gutierrez, Q. (2009). Comportamiento morfológico y conservación *in vitro* de diez genotipos comerciales de papa (*Solanum sp.*) procedentes de las provincias: Aroma, Ingavi y los Andes. La Paz, Bolivia.

- July, W. (2007). Caracterización morfológica y molecular del Cacao Nacional Boliviano y de selecciones élites del Alto Beni, Bolivia. Tesis de Maestría. Turrialba, Costa Rica: Centro Agronómica Tropical de Investigación y Enseñanza. https://repositorio.catie.ac.cr/bitstream/handle/11554/5354/Morphologic_and_molecular_characterization.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Maldonado, C., Pérez, E., Quispe, J., & Condori, M. (2016). Genotipos de cacao en Alto Beni - Bolivia. Catálogo de selecciones locales de cacao. La Paz, Bolivia: Instituto Nacional de innovación Agropecuaria y Forestal (INIAF). <https://repositorio.umsa.bo/handle/123456789/23648>
- Miller, C. (2009). An integrated in vitro and greenhouse orthotropic clonal propagation system for *Theobroma cacao* L Ph. D. Thesis. Pennsylvania, US.
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15, pp. 473-497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- N'goran, K. G., Minyaka, E., Kouassi, K. M., Kone, S., Djeni, T., Kouamé, C., & N'zi, J.-C. (2023). Preferential expression of somatic embryogenesis in five elite genotypes of *Theobroma cacao* (L.) associated with explant type and protocols used. *African Journal of Biotechnology*, 22(12), pp. 347-359. <https://doi.org/10.5897/AJB2023.17568>
- Ortega Palacios, M. A. (2022). Establecimiento in vitro de Cacao (*Theobroma cacao* L.) híbrido CCN-51 usando explantes foliares. Honduras, Honduras: Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano. <https://bdigital.zamorano.edu/server/api/core/bitstreams/be8b31f5-edae-4c0e-a551-16f3dc8d6150/content>
- Sivanesan, I., Muthu, M., Gopal, J., De Shadma, T., Doo Hwan, K., & Wook Oh, K. (2021). A fumigation-based surface sterilization approach for plant tissue culture. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(5), pp. 11. <https://doi.org/10.3390/ijerph18052282>
- Solis, L. R., Olivera, S. J., & La Rosa, L. R. S. (2011). Propagación in vitro de *Carica papaya* var. PTM-331 a partir de meristemos apicales. *Revista Peruana de Biología*, 18(3), pp- 343-347. <http://www.scielo.org.pe/pdf/rpb/v18n3/a12v18n3.pdf>
- Traore, A., & Gultinan, M. J. (2006). Effects of carbon source and explant type on somatic embryogenesis of four cacao genotypes. *HortScience*, 41(3), pp. 753-758. <https://typeset.io/pdf/effects-of-carbon-source-and-explant-type-on-somatic-xgaskwbi3i.pdf>