

PROGRAMA UNIVERSITARIO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BASICAS

(nombre del programa universitario de investigación de la DIGI)

Establecimiento del protocolo para propagación *in vitro* de cacao criollo (*Theobroma cacao* L.)  
Malvaceae, de la Costa Sur de Guatemala.

nombre del proyecto de investigación

DES2CU-2021

código del proyecto de investigación

Instituto de Investigación y Desarrollo del Sur Occidente, Centro Universitario de Sur  
Occidente (CUNSUROC).

unidad académica o centro no adscrito a unidad académica avaladora

Coordinador: Ph.D. Reynaldo Humberto Alarcón Noguera  
Investigador principal: Ing. Agr. Sadrác Neftaly Cifuentes Gramajo

nombre del coordinador del proyecto y equipo de investigación contratado por DIGI

Mazatenango, Suchitepéquez 28 de febrero del 2022.

## **Autoridades**

Dr. Hugo René Pérez Noriega  
Director General de Investigación

Ing. Agr. MARN Julio Rufino Salazar Pérez  
Coordinador General de Programas

Ing. Agr. Julio Rufino Salazar  
Nombre Coordinador(a) del Programa de Investigación

## **Autores**

Nombre del coordinador(a) del proyecto: Ph.D. Reynaldo Humberto Alarcón Noguera  
Nombre del investigador(a): Ing. Agr. Sadrác Neftaly Cifuentes Gramajo

Colaboradores:

Mynor Raúl Otzoy Rosales, Investigador independiente  
Martín Salvador Sánchez Cruz, Investigador independiente

Universidad de San Carlos de Guatemala, Dirección General de Investigación (DIGI), 2021. El contenido de este informe de investigación es responsabilidad exclusiva de sus autores.

Esta investigación fue cofinanciada con recursos del Fondo de Investigación de la DIGI de la Universidad de San Carlos de Guatemala a través del código DES2CU-2021 en el Programa Universitario de Investigación en Ciencias Básicas.

Los autores son responsables del contenido, de las condiciones éticas y legales de la investigación desarrollada.



## Índice general



1.	7
2.	8
3.	9
4.	10
5.	11
5.1.	11
5.2.	11
6.	12
6.1.	12
6.2.	12
6.3.	12
6.4.	13
6.5.	13
6.6.	13
6.7.	14
6.8.	14
6.9.	14
7.	15
7.1.	15
7.2.	15
7.3.	16
7.4.	16
7.5.	17
7.6.	17
8.	18
8.1.	18

8.2.	18
9.	19
10.	20
10.1.	20
10.2.	20
10.3.	27
10.4.	28
10.5.	28
11.	29
11.1.	29
11.2.	34
12.	36
13.	39
14.	46
15.	46
16.	46
17.	47
18.	47
19.	47
20.	48

## Índice de tablas

Tabla 1. Taxonomía de <i>T. Cacao</i> APG (2016).	12
Tabla 2. Jardín clonal de granja docente experimental Zahorí.	14
Tabla 3. Componentes para medios de cultivo.	37
Tabla 4. Porcentaje de callo inducido en la etapa PCG.	38
Tabla 5. Análisis de varianza del porcentaje de callo formado.	40
Tabla 6. Prueba de Tukey al 5% para la concentración de 2, 4 D.	41
Tabla 7. Prueba de Tukey al 5% para el tipo de tejido.	41
Tabla 8. Porcentaje de callo inducido en la etapa SCG.	41
Tabla 9. Análisis de varianza del porcentaje de inducción de callo secundario.	42
Tabla 10. Prueba de Tukey al 5% para la concentración de 2, 4 D.	42

## Índice de figuras

Figura 1. Colecta de tejido en granja Zahorí.	20
Figura 2. Desinfección de tejido.	21
Figura 3. Siembra de tejidos (pétalos y estaminodios) en cajas petri.	22
Figura 4. Medios de cultivo para la fase PCG (crecimiento de callo primario).	23
Figura 6. Callo primario.	24
Figura 11. Frascos contaminados con hongos.	24
Figura 7. Callo secundario.	25
Figura 9. Callo friable.	25
Figura 8. Tejido establecido en el medio ED.	26
Figura 10. Elaboración de medios de subcultivo ED.	26
Figura 11. Identificación de materiales élite para cultivo in vitro de <i>T. cacao</i> .	29
Figura 12. Comparación de porcentajes de callo primario.	30
Figura 13. Comparación de callo en los tejidos estudiados.	30
Figura 14. Comparación de porcentajes de callo secundario.	31
Figura 14. Callo secundario inducido con medio de cultivo SCG.	31
Figura 15. Callo embriogénico.	32

## 1. Resumen

El cultivo de *Theobroma cacao* L. Es importante en Guatemala, pues está catalogado como uno de los 23 países que exportan cacao fino y de aroma, lo cual está relacionado a los cacaos criollos. Lo cual establece la necesidad de propagar estos materiales, pero actualmente el único banco *in situ* con cacao criollo se encuentra en granja Zahorí, pero se encuentran en estado de caracterización y no es factible propagarlos por los métodos tradicionales, pues eso los sometería a mucho estrés con lo cual se podría causar la muerte de dichos materiales.

Esta investigación presenta el objetivo general de evaluar el potencial de propagación de materiales promisorios establecidos en la granja docente experimental Zahorí, empleando la técnica de cultivo de tejido *in vitro*, determinando el procesamiento general desde la escogencia del material botánico y el procedimiento desde el material botánico hasta la producción de callo friable.

Por medio de un ANDEVA se encontró variabilidad en los tratamientos, y se demostró con una prueba de Tukey al 5% que se induce mayor porcentaje de callo primario al emplear 2, 4-D en concentración de 1 mg/l en el tejido estaminodio, ya que al emplear pétalos los porcentajes fueron inferiores. Para la etapa de crecimiento de callo secundario de la misma forma se demostró con una prueba de Tukey al 5% que se induce mayor porcentaje de callo secundario al emplear BAP en concentración de 2 mg/l en el tejido estaminodio, con lo cual se logró la inducción de callo friable y callo embriogénico.

Palabras clave: *In vitro*, cacao criollo, hormonas.

## 2. Abstract

The cultivation of *Theobroma cacao L.* is important in Guatemala, as it is listed as one of the 23 countries that export fine and aroma cacao, which is related to creole cacao. Which establishes the need to propagate these materials, but currently the only bank in situ with Creole cocoa is found in the Zahorí farm, but they are in a state of characterization and it is not feasible to propagate them by traditional methods, since that would subject them to a lot of stress. which could cause the death of said materials.

This research presents the general objective of evaluating the propagation potential of promising materials established in the Zahorí experimental teaching farm, using the *in vitro* tissue culture technique, determining the general processing from the selection of the botanical material and the procedure from the botanical material, until the production of friable callus.

By means of an ANOVA, variability was found in the treatments, and it was demonstrated with a 5% Tukey test that a higher percentage of primary callus is induced when using 2, 4-D in a concentration of 1 mg/l in the staminode tissue, since when using petals the percentages were lower. For the secondary callus growth stage, in the same way, it was demonstrated with a 5% Tukey test that a higher percentage of secondary callus is induced when using BAP in a concentration of 2 mg/l in the staminode tissue, with which it was achieved the induction of friable callus and embryogenic callus.

Keywords: *In vitro*, Creole cocoa, hormones.



### 3. Introducción

De la planta de *T. cacao* comúnmente conocida como cacao, se obtienen las semillas con las que se produce el chocolate, existen cacaos de diferentes calidades, los de mejor calidad y mejor pagados son los cacaos finos y de aroma, por lo cual, la demanda se mantiene en constante crecimiento de acuerdo a la (Organización Internacional del Cacao [ICCO], 2019), la cual también indica que Guatemala solo exporta el 50% de cacao fino y de aroma. Por lo tanto, es importante extender el cultivo de materiales que posean esas características organolépticas. En el año 2008 se recolectaron materiales criollos en diferentes zonas de Guatemala, los cuales fueron genéticamente identificados mediante análisis Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP), con lo cual se logró establecer un jardín clonal en la granja docente experimental Zahorí, en el municipio de Cuyotenango Suchitepéquez (Otzoy Rosales, 2013), el cual hasta la fecha es el único en todo el territorio nacional.

Sin embargo, no es posible propagarlos empleando las técnicas convencionales como lo son: el injerto, las estacas y acodos, porque al hacerlo, se estarían sometiendo las plantas a mucho estrés, lo cual suele ocasionar la muerte. Por lo cual la alternativa es emplear como herramienta la biotecnología. Una técnica que ha permitido clonar los materiales de cacao, es la de cultivo *in vitro* de tejidos (Maximova, Miller, & Mark 2005), sin embargo, los resultados siempre varían pues dependen en parte de la genética. En busca de una solución esta investigación tiene como objetivo evaluar el potencial de propagación de materiales promisorios de *Theobroma cacao* L. Malvaceae, de tipo criollo, establecidos en la granja docente experimental Zahorí, empleando la técnica de cultivo de tejido *in vitro* a modo de poder establecer las bases en la biotecnología para toda una línea de investigación en camino a generar materiales élite que puedan ser distribuidos en el sector cacaotero de Guatemala para que sean mejor remunerados y de esa forma poder mejorar su calidad de vida.

Por lo tanto, empleando la técnica de cultivo *in vitro*, se evaluaron como tejidos los pétalos y los estaminodios, así como también ácido 2, 4 diclorofenoxiacético y bencilaminopurina, esta técnica se divide en fases, fase de callo primario, callo secundario, callo friable, callo embriogénico, germinación de embriones. Con lo cual se pudo evidenciar que ambos tejidos inducen callo primario, secundario, friable y embriogénico, sin embargo, el que presentó mejores resultados fue el estaminodio, al aplicar 2, 4 D en concentración de 1 mg/l para la fase de callo primario y para la fase de callo secundario los mejores resultados se obtuvieron al aplicar BAP en concentración de 2 mg/l. De tal manera, que se ha demostrado que es posible la reproducción de cacao criollo empleando esta técnica.

## 4. Planteamiento del problema

El término de cacao “Fino de Aroma es una clasificación de la Organización Internacional del Cacao (ICCO) que describe un cacao de exquisito aroma y sabor, este tipo de cacao representa alrededor del 8% de la producción de cacao en el mundo” (Hidalgo Cevallos, 2016). Internacionalmente se reconocen 23 países como productores de cacao fino de aroma entre los cuales está Guatemala (ICCO, 2016).

Los granos de cacao criollo y trinitario corresponden a lo que en el mercado mundial se conoce como cacao fino de aroma y es comercializado en un mercado especializado ya que el producto se destina a la elaboración de chocolates de alta calidad, debido a las características de sus granos que poseen aromas y sabores especiales (Ministerio de Economía Guatemala [Mineco], 2015). En el 2015 Guatemala fue calificado con un potencial de producción del 50% de cacao fino de aroma el cual es cotizado a un rango de precios entre USD 3,500 y USD 4,000 por tonelada y el precio del cacao convencional oscila entre USD 1,900 y USD 3,000 por tonelada (ICCO, 2016).

El problema para los cacaos criollos en Guatemala inicia en la propagación de estos. Para el caso de la colección de materiales genéticos establecidos en la granja docente experimental Zahorí, no se puede realizar una propagación masiva, debido a que estos se encuentran en fase de caracterización. Si se extrae material vegetal por los métodos convencionales como propagación por estaca, injerto y acodos, se podría provocar la muerte de las plantas, por la poda excesiva. Una alternativa sería la propagación *in vitro*, pero actualmente no se tienen las técnicas y los procedimientos para propagar por este medio.

En cuanto a la presente investigación sobre las técnicas y procedimientos para propagar *in vitro*, se propone realizarla en el laboratorio de biotecnología del CUNSUROC, utilizando los cacaos criollos determinados por marcadores moleculares como lo es AFLP (Otzoy Rosales, 2013), durante el año 2021. A continuación, se pueden plantear las siguientes preguntas: ¿Se podrá establecer la técnica *in vitro* para propagar cacao criollo?, ¿Se podrá determinar el procedimiento general para obtener *in vitro* plántulas de cacao criollo?

## 5. Delimitación en tiempo y espacio

### 5.1. Delimitación en tiempo

Las actividades se iniciaron el día martes 02 de febrero y finalizaron el día lunes 28 de febrero, debido a que realizó una prórroga autorizada con el acuerdo de dirección DIGI 075-2021. Por lo cual el proyecto se desarrolló en un lapso de 13 meses.

### 5.2. Delimitación espacial

El experimento fue establecido en el laboratorio No.3 del Centro Universitario del Sur Occidente CUNSUROC, ubicado en Mazatenango Suchitepéquez.

## 6. Marco teórico

### 6.1. Cacao (*Theobroma cacao* L.)

El *T. cacao* se divide genéticamente en tres grandes grupos: Criollos, forasteros y trinitarios (De la Cruz Medina, Vargas Ortíz, & Del Angel Coronel, 2012). Se sabe que el cultivo radica desde antes de la llegada de los españoles a Centro América y que el grano antes de ser usado para elaborar bebidas, comidas o chocolate, se usó como moneda. Entre los años 1978 y 1980 Guatemala produjo alrededor de 3,720 TM/año (31% de la producción total en Centro América) (Malespín , 1982).

Tabla 1. Taxonomía de *T. Cacao* APG (2016).

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

Nota: Fuente: (Tropicos.org, 2020).

### 6.2. Biotecnología vegetal

Es una herramienta importante que está conformada por distintas técnicas mediante las cuales se desarrollan procesos con el fin de un mejoramiento vegetal, su mayor auge esta comprendido entre los años 1,944 y 1,999, que van desde el descubrimiento de la transferencia del ADN, hasta la secuenciación genética conocida como genoma vegetal. Durante tales hallazgos, se fue aprendiendo sobre protocolos que permiten lograr otros procesos, como la regeneración de plantas, identificación y mapeo de genes, aislamiento de genes y transferencia de genes (Roca & Ramírez, 2000).

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

El *T. cacao* es una planta que tiene gran diversidad genética debido a que es una planta alógama con un porcentaje de polinización cruzada superior al 95% (Paulin & Eskes, 1995), por lo cual se van perdiendo muchos materiales con el paso del tiempo debido al alto

intercambio de genes (Ruiz Erazo, 2014). Esto sucede puesto a que la reproducción se da por polinización cruzada, los materiales que se ven más afectados son los criollos debido a que se encuentran en menores poblaciones tal es el caso de los cacaos de Piura, Perú (Quiñones, Espinoza, Yovera, Cuchilla, & Castro, 2018).

## 6.4. Bancos de germoplasma

Los bancos de germoplasma enfocados al cultivo *in vitro* de plantas, permiten la preservación a corto y mediano plazo. Permiten propagar materiales libres de enfermedades, para su distribución y multiplicación (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación [FAO], 2014).

## 6.5. Cultivo *in vitro* de *T. cacao*

Los protocolos actuales se basan en cuatro fases durante el proceso de cultivo *in vitro* los cuales son: Inducción de callo friable, formación de embriones somáticos, maduración o geminación de embriones somáticos y mantenimiento, en esta última fase las plantas pasan por una transición de condiciones controladas a condiciones climáticas ambientales (Urrea Trujillo, Atehortúa Garcés, & Gallego Rúa, 2011). Se han realizado numerosas investigaciones en torno a la propagación *in vitro* de *T. cacao*. Sin embargo, han sido pocos los que han presentado resultados positivos, en la mayoría de las investigaciones el protocolo que mejores resultados ha generado es el empleado en Penn State University modificado por (Maximova, Miller, & Mark, 2005). El protocolo consta de 7 etapas PCG - Crecimiento primario de callos; SCG - Crecimiento secundario de callos; ED-Desarrollo embrionario; PEC - Conversión de embriones primarios; SEC - Embrión secundario Conversión; RI - Inducción de la raíz; RD - Desarrollo de la raíz, cada una de ellas constituye el medio de cultivo. Se han realizado numerosas investigaciones en torno a la propagación *in vitro* de *T. cacao*. De tal modo que se ha demostrado que inicialmente se divide en dos etapas dentro del cultivo *in vitro*, que son callogénesis y embriogénesis somática ( Osorio Montoya, Henao Ramirez, de la Hoz Vásquez, & Urrea Trujillo, 2022).

## 6.6. Componente de un medio de cultivo *in vitro*

Los medios de cultivo, son el sustrato que permite el desarrollo y crecimiento del tejido. Está conformado por componentes inorgánicos (Nitrógeno, fósforo, potasio, calcio, magnesio, hierro y micro elementos), componentes orgánicos (Vitaminas y Aminoácidos) y componentes naturales (Caseína hidrolizada y extracto de malta) (Usui, Okabe, Victores Pernillo, & Ramírez, 1996). En la mezcla de los componentes, es donde se descubre que elementos son limitantes para el desarrollo del cultivo de una especie en particular. Los componentes se agrupan formando soluciones madre o stock.

## 6.7. Ácido 2, 4 diclorofenoxiacético(2, 4-D)

El ácido 2, 4 diclorofenoxiacético inicialmente se utilizó como herbicida sistémico hormonal (Troyer, 2001) y aún en la actualidad es uno de los más usados para el control de malezas en hoja ancha a nivel mundial, sin embargo se descubrió que tenía propiedades en la producción de callo en diferentes tejidos y especies vegetales (Espinosa, Silva, Sariego, Cholo Masapanta, & Delgado, 2012). En la actualidad es muy útil en la producción *in vitro* de cacao (Maximova et al., 2005).

## 6.8. Selección de materiales élite

La creación de metodologías para la selección de materiales élite en el cultivo de cacao, ha sido muy lenta a lo largo de la historia, sin embargo, ha permitido aumentar su productividad. Uno de los primeros avances fue definir árboles madre para el proceso de propagación clonal empleando varetas, basándose principalmente en la capacidad de producción (Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas [IICA], 1952). Sin embargo con los avances tecnológicos que se han desarrollado, el método más eficiente en la actualidad es por medio del cultivo *in vitro* de tejidos, lo cual ha permitido aumentar exponencialmente el número de caracteres a tomar en cuenta para considerar un material como élite, tales como: Resistencia a plagas y las enfermedades de “*M. royeri* y *P. palmivora*” (Phillips & Krauss, 2001), características organolépticas, genotipo y fenotipo, rendimiento en kg/ha, adaptabilidad y habilidad combinatoria.

## 6.9. Tipos de callo

Tanto los pétalos como los estaminodios, pueden generar diferentes tipos de callo al someterlos al proceso de cultivo *in vitro* de tejidos, para facilitar es estudio de estos se han determinado como callo primario, callo secundario, callo friable y callo embriogénico. Al someter los tejidos al medio de cultivo inicial, pasadas las 2 semanas estos aumentan su volumen, y luego se inicia la formación del callo, aunque hay casos en los que el proceso es diferente, pues primero se necrosan los tejidos y después se forma el callo sin que exista aumento del volumen del tejido principal, lo cual puede estar ligado al genotipo, este tipo de callo se caracteriza por tener coloración blanca o translúcida y por ser de textura dura. El callo secundario se caracteriza inicialmente porque se induce desde el callo primario, no del tejido principal. El callo friable se caracteriza por que hay un aumento en el volumen del callo secundario, la textura se vuelve frágil y la coloración varía entre marrón, blanco y traslúcido. Y el callo embriogénico se caracteriza por tener formaciones globulares los cuales por lo general son indicios de la embriogénesis somática (Chanatásig Vaca, 2004).

## 7. Estado del arte

### 7.1. Cacaos criollos de Guatemala

En el año 2008 se inició el proyecto de búsqueda y colecta de materiales criollos de Guatemala en los departamentos de Petén, Alta Verapaz, Quiché, Izabal y Suchitepéquez, siendo Quiché el único departamento donde no se localizó material criollo, al realizarles el análisis de AFLP a los 11 materiales colectados se determinaron tres grupos de cacao, con los cuales se estableció un jardín clonal en la granja docente experimental Zahorí, ubicada en Cuyotenango Suchitepéquez (Otzoy Rosales, 2013), en la actualidad el jardín clonal cuenta solamente con 9 materiales, debido a que los materiales colectados en el departamento de Alta Verapaz no se encuentran dentro del mismo.

### 7.2. Cultivo *in vitro* de *T. cacao* mediante embriogénesis somática

Para lograr la inducción de embriones somáticos a partir de callo friable es importante mantener los medios de cultivo en oscuridad las 24 horas, renovar los medios de cultivo cada 14 días (Peña López, Azpeitia Morales, Mirafuentes Hernández, Ruíz Carrera, & Sáenz Carbonell, 2016). Primero se usa el medio Primary Callus Growth (PCG) para inducir la formación de callo primario en un periodo de 14 días, luego el medio Secondary Callus Growth (SCG) para formar callo secundario en un período de 14 días, seguido del medio ED el cual debe ser renovado cada 14 días hasta lograr la formación de embriones somáticos, estos suelen formarse a partir de un callo secundario que es de color marrón claro a oscuro y fragmentado (Maximova et al., 2005).

*Tabla 2. Jardín clonal de granja docente experimental Zahorí.*

No	Lugar	Coordenadas	Altura (msnm)	Disponibilidad	Nomenclatura
1	Finca La Manzanita, Livingston, Izabal	N 15° 42' 26.9" W 88° 58' 19.4"	2	SI	I-1
2	Finca La Manzanita, Livingston, Izabal	N 15° 42' 21.9" W 88° 58' 19.4"	2	SI	I-2
3	Aldea Barra Lámpara, Livingston, Izabal	N 15° 46' 21.9" W 88° 48' 50.4"	2	SI	I-3
4	Cahabón, Saquijá, Alta Verapaz	N 15° 34' 45.0" W 89° 54' 00.0"	201	NO	No hay
5	Lanquín, Seluc, Alta Verapaz	N 15° 33' 46.0" W 89° 58' 41.0"	465	NO	No hay
6	Cantón Chiguasté, Samayac, Suchitepéquez	N 14° 33' 10.9" W 91° 27' 29.4"	458	SI	M-1

# Informe final proyecto de investigación 2021

Dirección General de Investigación –DIGI-

7	Aldea El Progreso Mazatenango, Suchitepéquez	N 14° 31' 09.3" W 91° 28' 32.3"	326	SI	M-2
8	Cantón La Toma, San Antonio, Suchitepéquez	N 14° 29' 00.9" W 91° 24' 23.9"	332	SI	M-3
9	San Pablo Jocopilas, Suchitepéquez	N 14° 34' 35.78" W 91° 28' 05.46"	591	SI	M-4
10	Samayac, Suchitepéquez	N 14° 34' 32.7" W 91° 26' 39.2"	597	SI	M-5
11	Cantón Chacalté Sis, Cuyotenango, Suchitepéquez	N 14° 31' 34.6" W 91° 35' 00.07"	293	SI	Cantón Sis

Nota: Esta tabla se elaboró con los datos de la fuente, y fue modificada con datos colectados mediante esta investigación para mejorar la calidad de la información.

Fuente: (Otzoy Rosales, 2013).

El 50% de cacao producido en Guatemala tiene el potencial de ser comercializado como cacao fino de aroma por su origen y genética, que son aproximadamente 600 toneladas de cacao en grano, esto debido a la calificación del ICCO en el 2015. Se está promoviendo la siembra de cacao en la región norte que actualmente son aproximadamente 1,750 hectáreas y se planea llegar a más de 2500 hectáreas en los próximos 5 años (Ac Pangán, 2017).

### 7.3. Habilidad combinatoria de 11 materiales de cacao criollo

En el 2016 se determinó que existe habilidad combinatoria entre los materiales de *T. cacao* criollo del jardín clonal de la Granja Docente Zahorí, los materiales que presentaron crecimiento y desarrollo de frutos como resultado de polinizaciones cruzadas al trigésimo día fueron: M1xM4 (30%), M1xM6 (30%), M1xM7 (55%), y M4xM5 (30%), por lo cual se consideran Inter compatibles. Además, como resultado de autopolinizaciones se demostró que existe auto compatibilidad en los materiales M4 (40%) y M11 (75%). (Alvarado Güinac, Moreno Camey, & Montesdeoca Franco, 2016), es importante mencionar que esta nomenclatura está basada en el número del material listados en el proyecto de colecta de materiales de cacao criollo (ver Tabla 2.)

### 7.4. Caracterización de materiales criollos de cacao

Durante el 2020 se estimó la producción de los materiales de *T. cacao* establecido en el jardín clonal de la granja experimental docente Zahorí, proyectando para Mazate-4 48.054 kg/ha, Mazate-1 47.624 kg/ha y para Mazate-2 45.68 kg/ha. Además, estimo que estos clones tienen el mayor potencial para producción debido a que presentaron buen índice de peso en cuanto a la relación de grano fresco y grano seco (Lopreto, 2020).



## **7.5. Tejidos empleados para el cultivo *in vitro* de cacao**

Para la propagación de *T. cacao* se han realizado numerosas investigaciones con el fin de definir los tejidos que presentan una mayor respuesta a los medios de cultivo y los protocolos a seguir para obtener un mayor número de embriones somáticos. Se han hecho investigaciones con tejido a partir de segmentos de hojas, cotiledones embrionarios, estaminodios y pétalos, cada uno en diferentes etapas fenológicas propias de cada uno, pero solo los dos últimos han presentado respuestas positivas. Siendo los estaminodios los que mayor número de embriones reproducen (Calderon Acuña & Montes de Godoy, 2017).

## **7.6. Desinfección de botón floral de cacao**

El hipoclorito de sodio es uno de los compuestos que se emplean para la desinfección de tejidos en los procesos de cultivo *in vitro*, para el caso del cacao se pueden emplear concentraciones bajas, las cuales pueden oscilar entre 1% y 5%, con tiempos de inmersión que van de los 5 a 50 min, los resultados suelen ser mejores cuando se emplean estaminodios como tejido, ya que los pétalos presentan mayor porcentaje de oxidación. Y cuando el tiempo de inmersión es el menor posible, 5 min por ejemplo (Echenique Quezada & Calle Alanoca, 2020).

## 8. Objetivos

### 8.1. Objetivo General

Evaluar el potencial de propagación de materiales promisorios de *Theobroma cacao* L. Malvaceae Criollo, establecidos en la granja docente experimental Zahorí, empleando la técnica de cultivo de tejido *in vitro*, en Cuyotenango Suchitepéquez.

### 8.2. Objetivos específicos

1. Determinar el procedimiento general desde la escogencia del material botánico hasta la producción de plántulas de cacao criollo por la técnica *in vitro*.
2. Determinar el procedimiento desde el material botánico hasta la producción de callo friable de cacao criollo mediante el uso de la técnica de cultivo *in vitro* de tejidos.

## 9. Hipótesis

Ha: Al menos un tratamiento presentará diferente porcentaje de respuesta en cuanto a la formación callo.

## 10. Materiales y métodos

### 10.1. Enfoque de la investigación

La presente investigación tuvo un enfoque cuantitativo, las variables de respuesta se expresaron en porcentajes, pero fueron transformadas para poder realizar análisis estadísticos con el fin de determinar el tratamiento que presentó mejores resultados y finalmente pruebas de Tukey al 5% para determinar cuál fue el mejor tratamiento.

### 10.2. Método

Para alcanzar el objetivo específico 1 respecto a: Evaluar el potencial de propagación de materiales promisorios de *Theobroma cacao* L. Malvaceae Criollo, establecidos en la granja docente experimental Zahorí, empleando la técnica de cultivo de tejido *in vitro* se procedió trabajando con la metodología empleada por (Maximova et al., 2005), como base principal, modificando levemente esa metodología empleando sales DKW (Driver & Kuniyuki, 1984).

Proceso de colecta: Se colectaron los botones florales en horarios de 8 – 10 de la mañana, se guardaron en tubos de plástico con tapadera (cada tubo se identificó previamente con la nomenclatura del material y fueron llenados con agua bidestilada estéril), se almacenaron dentro de una hielera para evitar que se deshidratan durante el traslado al laboratorio.



Figura 1. Colecta de tejido en granja Zahorí.

*Nota: Los tejidos fueron transportados y sembrados en un lapso de 4 horas, para evitar que el proceso de oxidación perjudicara los resultados.*

Proceso de desinfección del tejido: El tejido se trasladó al laboratorio del Centro Universitario del Sur Occidente, los tubos se desinfectaron asperjándolos con alcohol al 70%,

luego fueron introducidos en la caja de asepsia para poder desinfectar los tejidos con NaClO al 1% durante 20 min manteniéndolos en constante agitación, para luego lavarlos 3 veces con agua bidestilada esterilizada, seguido se sumergieron en estreptomicina a 250 ppm por 20 min y finalmente se enjuagaron con agua bidestilada esterilizada tres veces.



*Figura 2. Desinfección de tejido.*

*Nota: Para llevar a cabo la desinfección de los tejidos, se empleó una caja aséptica.*

Siembra de tejidos (pétalos y estaminodios): Para la primera fase del experimento, denominada como PCG (crecimiento de callo primario), se colectaron 30 botones florales de cada uno de los materiales elite denominados M-1, M-2 y M-4, para un total de 90 botones florales. El tejido se manipuló con pinzas y bisturís esterilizados. Para realizar la siembra se cortaron los botones florales en la base del botón a un milímetro del pedúnculo a manera

de poder separar toda la estructura de la flor, para luego poder tomar con la pinza los 5 estaminodios uno por uno y colocarlos en un frasco de vidrio con capacidad de 100 ml con 20 ml del medio de cultivo y de la misma manera con los pétalos, finalmente se realizó la siembra de 450 tejidos, 5 tejidos por unidad experimental.



*Figura 3. Siembra de tejidos (pétalos y estaminodios) en cajas petri.*

*Nota: Para llevar a cabo la siembra de los tejidos, se empleó una caja aséptica.*

Fase de callo primario (PCG-crecimiento de callo primario): Durante esta fase el experimento se mantuvo en con un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad, se usó el medio de cultivo PCG (ver Tabla 10), complementado con hormonas 2,4-D (1, 2 y 3 mg/l) y TDZ 0.005 mg/l, gelrite 3g/l y pH de 5.8. Para poder preparar los medios de cultivo fue necesario previamente preparar las soluciones stock, tanto para las hormonas (2,4 D y TDZ).

Preparación de medio de subcultivo: Para aumentar el volumen del callo se realizó medio de cultivo PCG, con la acepción de que se elaboró sin agregar hormonas.





*Figura 4. Medios de cultivo para la fase PCG (crecimiento de callo primario).*

Nota: Se prepararon 3 litros de medio de cultivo, un litro para la concentración de 2,4 D a 1 mg/L, un litro para la concentración 2 mg/L y un litro para la concentración 3 mg/L.



*Figura 6. Callo primario.*

Nota: 30 días después de la siembra.

Autoclaveado de tejidos contaminados: Como parte del protocolo se contempla el mantenimiento constante del área de incubación. Siendo así que, al observar el crecimiento de hongos patógenos en 6 unidades experimentales, se retiraron del área para evitar contagios y luego de evidenciar con fotografías, estas fueron autoclaveadas y posteriormente eliminadas.

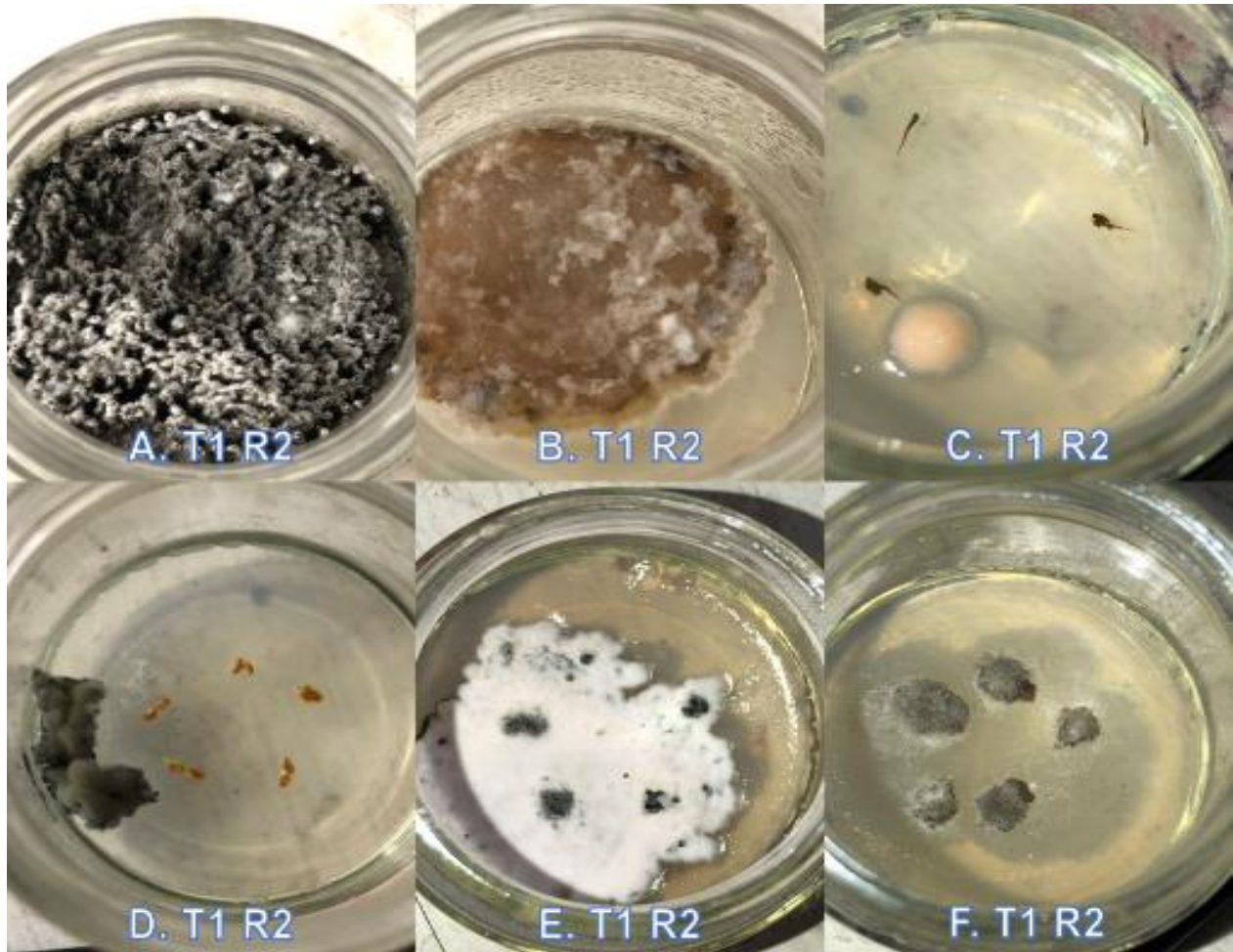


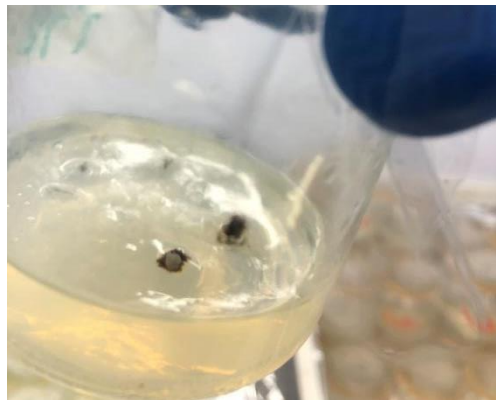
Figura 11. Frascos contaminados con hongos.

*Nota: Las unidades experimentales no presentaron formación de callo y representan el 6.67% del experimento.*

Fase de callo secundario (SCG-crecimiento de callo secundario 1 y 2): Pasados los 30 días el tejido se traspasó al nuevo medio SCG (ver Tabla 10), con BAP en concentraciones de (2 y 3 mg/l), 50 mg/l agua de coco, gelrite 3g/l, pH 5.7, en un fotoperíodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad.



Preparación de medio para subcultivo SCG: Este medio de cultivo se renovó 3 veces cada 15 días, hasta generar callo secundario y luego 4 veces cada 15 días para generar callo friable, el subcultivo se elaboró solo con las sales, sin hormonas, para esta etapa solo se subcultivo el tejido estaminodio, debido a que fue el que presentó los mejores resultados en la fase PCG.



*Figura 7. Callo secundario.*

*Nota: Se subcultivaron un total de 30 unidades experimentales, que fueron las que presentaron callo primario, para un total de 150 tejidos.*



*Figura 9. Callo friable.*

*Nota: 150 días después de la siembra.*

Fase de incubación de tejido (TI- incubación de tejidos): Este medio de cultivo se empleó por 4 meses (ver Tabla 10).

Fase de callo embriogénico (ED-desarrollo de embriones somáticos): Este medio de cultivo se empleó por 30 días (ver Tabla 10).

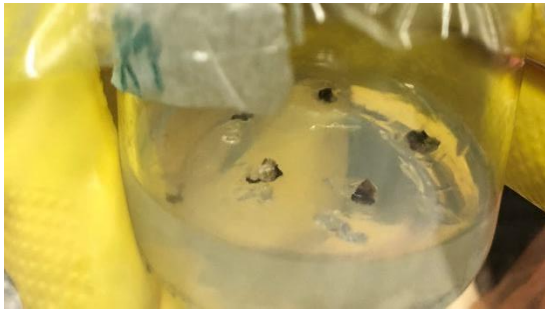


Figura 8. Tejido establecido en el medio ED.

Nota: Se subcultivaron un total de 15 unidades.

Preparación de medios de sub cultivo: Los medios de cultivo ED se renovaron cada 15 días.



Figura 10. Elaboración de medios de subcultivo ED.

Nota: Solo se hizo una renovación del medio de cultivo.

Fase de germinación de embriones somáticos PEC: Se elaboro el medio de cultivo PEC (ver Tabla 10), con ANA 0.1 mg/l, IBA 0.2mg/l en Oscuridad continua.

Para alcanzar el objetivo específico 2 respecto a: Determinar el procedimiento general desde la escogencia del material botánico hasta la producción de plántulas de cacao criollo por la técnica in vitro.

Selección del genotipo: Se tomarán en cuenta los resultados de los estudios realizados con anterioridad, los cuales son: Habilidad combinatoria de 11 materiales y Caracterización de

materiales de cacao criollo (Alvarado Güinac, Moreno Camey, & Montesdeoca Franco, 2016). Por lo cual se tomarán en cuenta los genotipos que presentaron los mejores porcentajes de inter compatibilidad y auto compatibilidad, en conjunto con los que presentaron mayor producción en kg/ha y mayor relación de peso de grano fresco y grano seco (Lopreto, 2020). Para lo cual será necesario realizar una matriz que nos permite seleccionar los mejores genotipos.

Previo a esta selección se realizaron las siguientes fases: Fase de colecta, fase de identificación genética mediante AFLP, fase de jardín clonal, fase de estudio de habilidad combinatoria.

Selección del clon (árbol): Debido a que existen varios materiales dentro de la misma clasificación, para los genotipos previamente seleccionados. Se tomarán flores de los árboles que presenten un mejor récord de producción, resistencia o tolerancia a enfermedades, para lo cual se identificarán los materiales escogidos con un lazo de ceda color amarillo para que resalte entre el color verde y café dentro del cacaotal.

Previo a esta selección se realizaron las siguientes fases: Fase de caracterización de materiales y fase de estimación de productividad.

Selección del tejido: Se seleccionarán flores que estén cerradas y que su tamaño sea de entre 6 y 8 mm (Calderon Acuña & Montes de Godoy, 2017). Los parámetros se irán modificando según se vayan dando las circunstancias.

En la presente investigación se realizará la fase de cultivo in vitro, con lo cual se podrá saber si es posible este tipo de propagación en los materiales de la granja experimental Zahorí.

### 10.3. Recolección de información

Todos los datos fueron recolectados en el laboratorio de biotecnología del CUNSUROC. Esto se hace con el fin de evitar que los medios de cultivo con los tejidos sufran contaminación o daño al tener que trasladarlos de un lugar a otro.

La principal variable de respuesta es la formación de embriones somáticos: Por lo cual se llevará a cabo un conteo, el cual se expresará en porcentaje para su posterior registro, debido a que las condiciones para cada unidad experimental serán homogéneas y controlables, se utilizará un diseño trifactorial completamente al azar con arreglo combinatorio. Para la identificación de los resultados se empleara el siguiente modelo estadístico  $Y_{ijkl} = \mu + A_i + B_j + C_k + (AB)_{ij} + (AC)_{ik} + (BC)_{jk} + (ABC)_{ijk} + \epsilon_{ijk}$ ; En donde:  $Y_{ijkl}$  = efecto de

la  $ijk$  – ésima unidad experimental;  $\mu$  = Media general;  $A_i$  = Efecto de la  $i$  – ésima concentración de 2, 4-D;  $B_j$  = Efecto del  $j$  – ésimo tejido;  $C_k$  = Efecto del  $k$  – ésimo clon;  $AB_{ij}$  = Interacción de la  $i$  – ésima concentración de 2, 4-D y del  $j$  – ésimo tejido;  $AC_{ik}$  = Interacción de la  $i$  – ésima concentración de 2, 4-D y el  $k$  – ésimo clon;  $BC_{jk}$  = Interacción del  $j$  – ésimo tejido y el  $k$  – ésimo clon;  $ABC_{ijk}$  = Interacción de la  $i$  – ésima concentración de 2, 4-D, el  $j$  – ésimo tejido y el  $k$  – ésimo clon;  $e_{ijkl}$  = Error experimental asociado a la  $ijkl$  - ésima unidad experimental.

Cada unidad experimental estuvo conformada por 5 secciones de tejido establecidas en un frasco de vidrio con 20 ml del medio de cultivo sólido modificado con hormonas. Se trabajaron 18 tratamientos y 5 repeticiones, lo cual da un total de 90 unidades experimentales, cada unidad experimental estará conformada por 5 secciones de tejido.

## 10.4. Técnicas e instrumentos

Selección artificial: Se realizará la selección de: Material vegetal, órganos y tejidos

- Material vegetal: Se emplearán flores cerradas de los clones: Mazate-1, Mazate-2 y Mazate-4. Previamente seleccionados por su potencial.
- Selección de botones florales: Se seleccionaron los botones que estén cerrados, esto evitará que los tejidos a emplear se contaminen y a que el proceso de desinfección en laboratorio sea más fácil.
- Selección de tejido: Con fines de investigación se emplearon únicamente los pétalos y los estaminodios.

Cultivo de tejidos: Para lograr la producción masiva de los clones de cacao criollo seleccionados, se utilizó la propagación in vitro.

Registro de resultados: Para tener un buen manejo de la investigación, se llevarán hojas de registro en Excel para crear tablas y gráficas en base a los resultados obtenidos en cada fase del cultivo, se capturan fotografías durante cada procedimiento con fines ilustrativos y se maneja una agenda para anotar todas las observaciones y hechos.

## 10.5. Procesamiento y análisis de la información

Se realizó un análisis de varianza con un nivel de significancia del 5%, en base al diseño experimental planteado como completamente al azar, para lo cual se empleó el software Infostat, para determinar las diferencias entre los porcentajes de la fase de callo primario y secundario. Posteriormente se realizó una prueba múltiple de medias, de Tukey al 5% de significancia.



## 11. Resultados y discusión

### 11.1. Resultados

**Materiales promisorios:** Con fines de investigación y aplicabilidad de los resultados que se pudieran generar, para este proyecto se tomaron como objeto de estudio los materiales M-1, M-2 y M-4, pues en comparación con los demás materiales criollos que se tienen establecidos en el jardín clonal de la granja docente experimental Zahorí, estos presentan mejores características en cuanto a producción, ya que se caracterizan por tener un mayor índice de fruta y de semilla, lo cual los hace promisorios para plantaciones con fines comerciales.

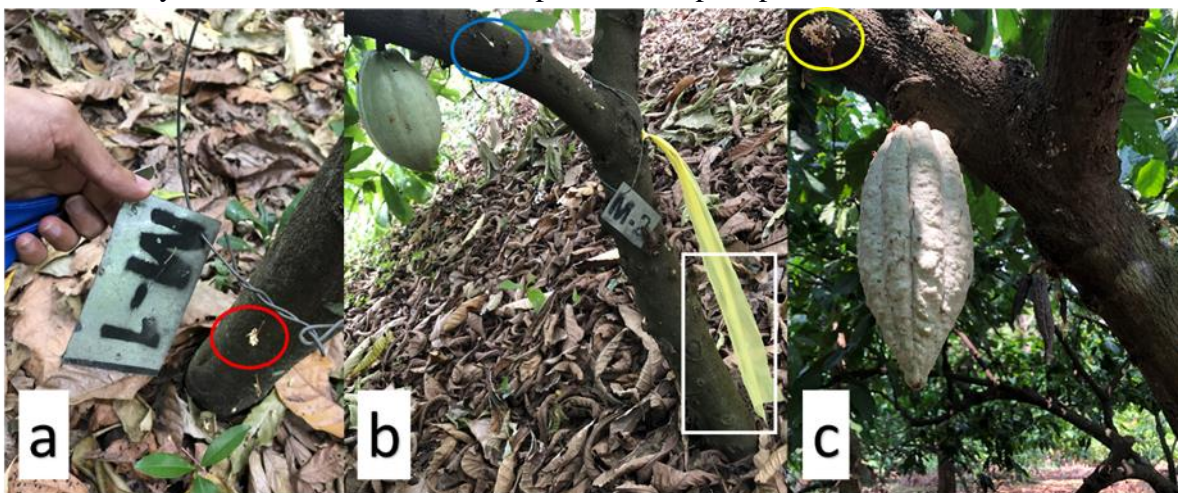


Figura 11. Identificación de materiales élite para cultivo *in vitro* de *T. cacao*.

*Nota: Los círculos identifican los cojines florales de cada material y el cuadrado blanco identifica el nylon amarillo que se usó para distinguir los materiales seleccionados del jardín clonal.*

**Inducción de callo primario:** Mediante la técnica de cultivo *in vitro* de cacao, se emplearon como tejidos los pétalos y los estaminodios, colectados de botones florales completamente cerrados y esterilizados, en medio de cultivo PCG modificado con 2,4-D en concentraciones de 1mg/l, 2mg/l y 3mg/l. Para lo cual se trabajó con un diseño trifactorial completamente al azar, estableciendo 18 tratamientos y 4 repeticiones, los resultados fueron colectados 15 días después de la siembra y fueron transformados para poder realizar el análisis de varianza.

Con lo cual se demostró que existían diferencias altamente significativas en cuanto al efecto del 2,4-D en la inducción de callo primario, y diferencias significativas en cuanto al efecto del tejido en la inducción de callo primario. De tal modo que al realizar la prueba de Tukey al 5% para ambos casos, se determinó que los mejores tratamientos son: el T2 que alcanza un 50% de inducción de callo, el T4 que alcanza un 44% de inducción de callo y el T6 que alcanza un 48% de inducción de callo, cuando la concentración de 2,4-D es de 1mg/l y cuando el tejido es

el estaminodio, esto también permitió verificar que los tres materiales en estudio inducen callo primario.

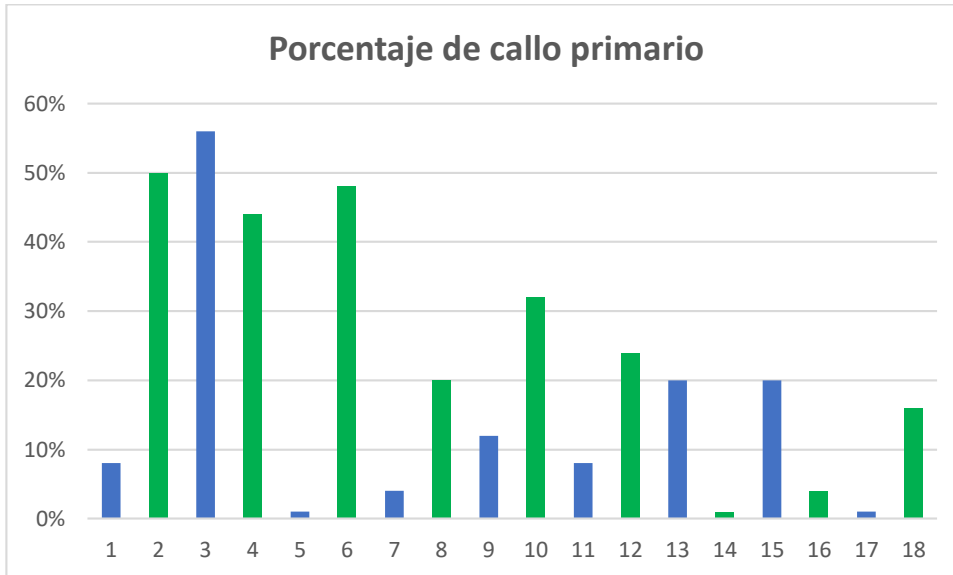


Figura 12. Comparación de porcentajes de callo primario.

Nota: Los porcentajes con color celeste corresponden al tejido pétalo y los de color verde a estaminodio, los tratamientos 1 y 2 corresponden al material Mazate-1, los tratamientos 3 y 4 al material Mazate-2 y los tratamientos 5 y 6 al material Mazate-4.

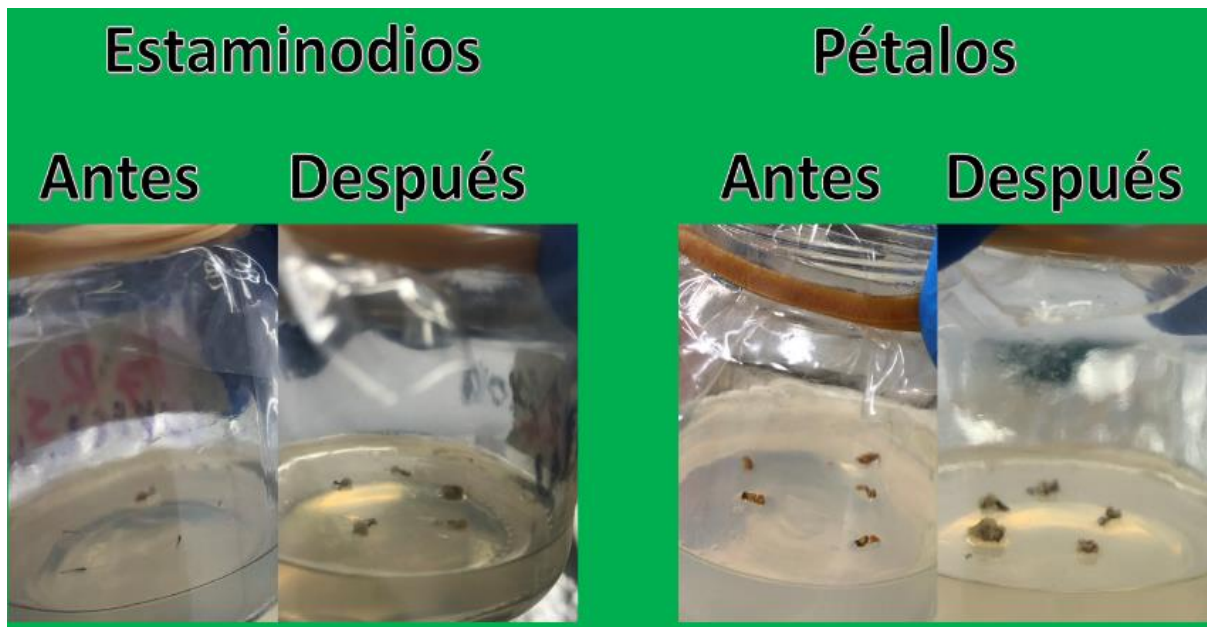


Figura 13. Comparación de callo en los tejidos estudiados.

Nota: Los tejidos, son estaminodios del lado izquierdo y pétalos del lado derecho.

En cuanto a las características del callo inducido, tanto en pétalos como en estaminodios y en los tres materiales genéticos, se indujo un callo primario solido o de textura dura, de color blanco a partir del tejido primario, los porcentajes de germinación no fueron homogéneos y aunque ambos tejidos presentaron oxidación, el mayor porcentaje de callo se logró en estaminodios.

**Callo secundario:** En la fase de inducción de callo secundario se evaluó BAP en concentración de 2mg/l y 3mg/l, los resultados fueron colectados 90 días después de la siembra, para el análisis de los resultados se transformaron los datos y se encontraron diferencias significativas en cuanto al efecto de la concentración de BAP en la inducción de callo secundario, para lo cual se procedió a realizar la prueba de Tukey al 5% con lo cual se determinó que los mejores tratamientos fueron el T1,T3 y T5 cuando la concentración de BAP es de 2mg/l.

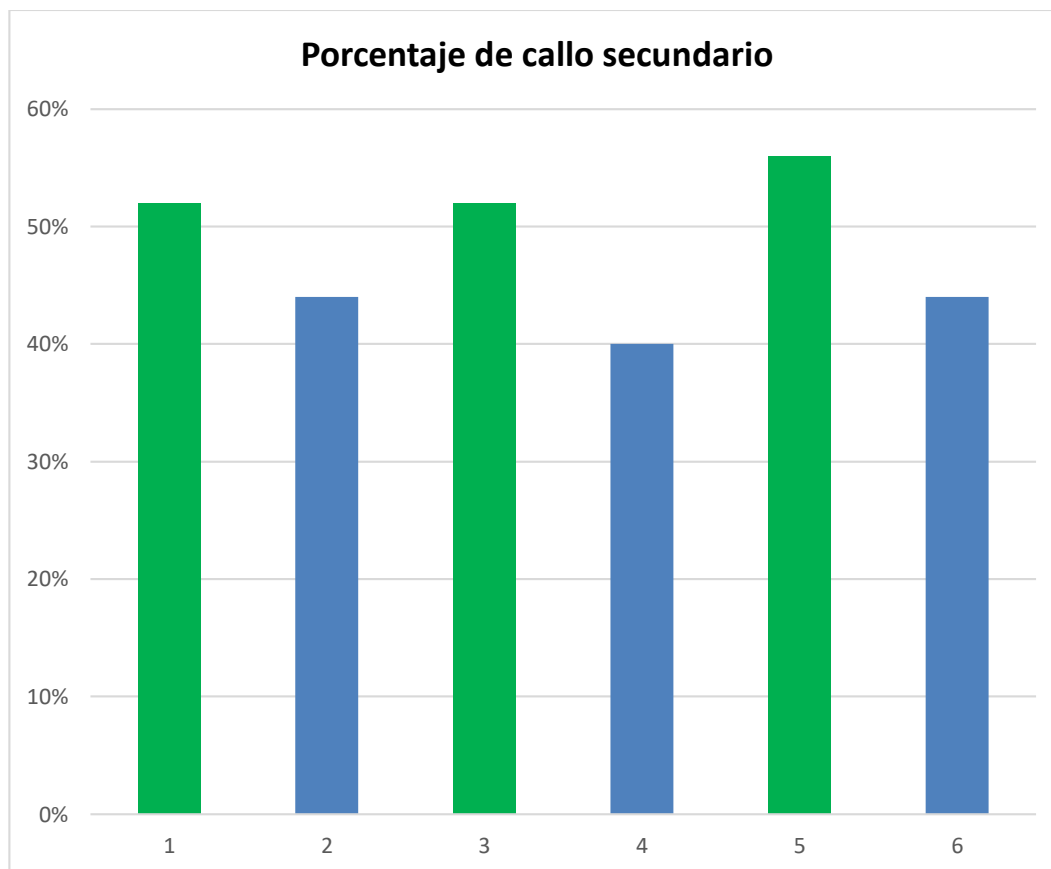
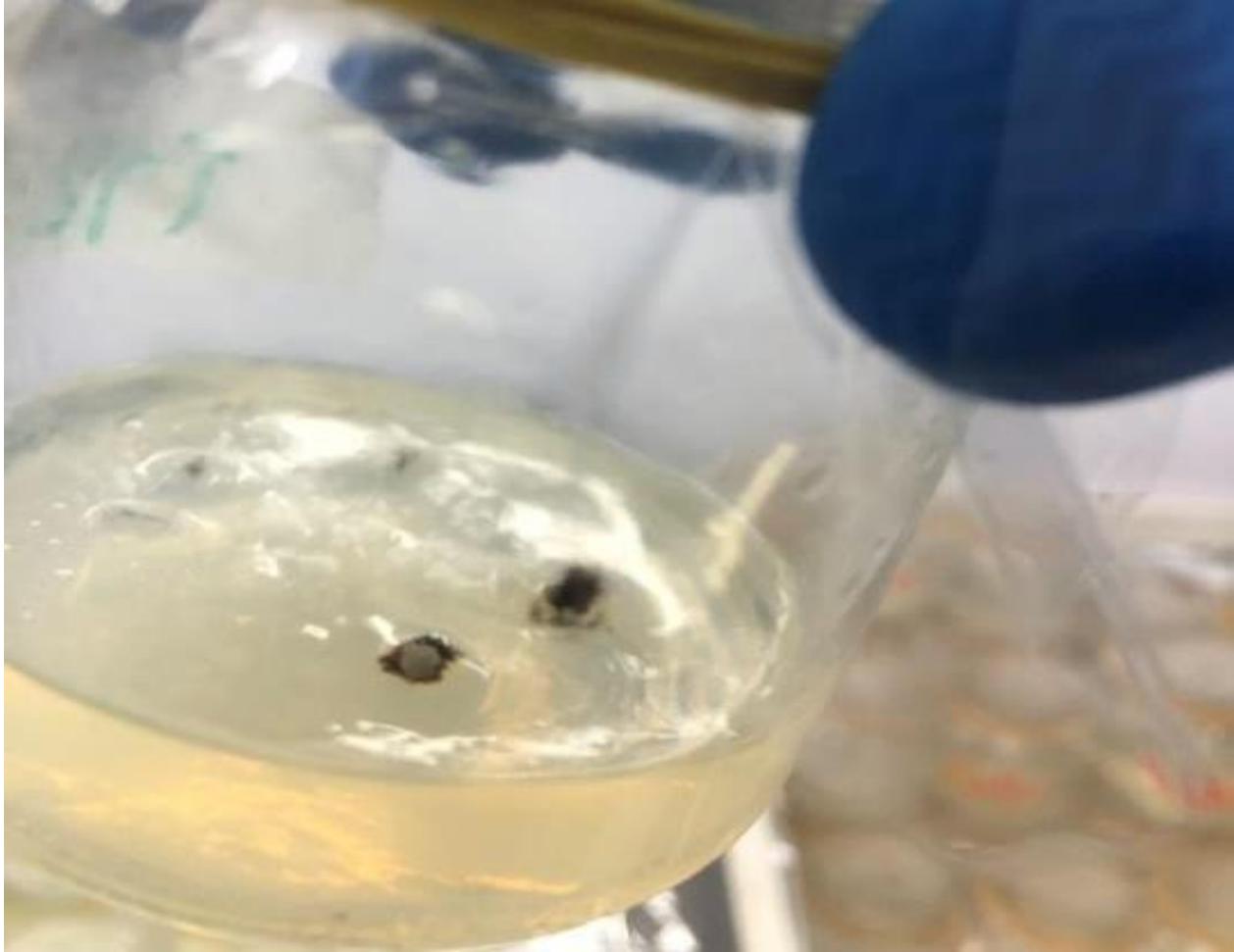


Figura 14. Comparación de porcentajes de callo secundario.

Nota: Las barras de color azul corresponden a la concentración de BAP 3 mg/l y las de color verde a la concentración de BAP 2mg/l.



*Figura 14. Callo secundario inducido con medio de cultivo SCG.*

Nota: En la figura se puede diferenciar el callo primario que se ve de color marrón del callo secundario que es de color blanco.

En cuanto a las características de este proceso se pudo observar que al hacer el cambio del medio de cultivo PCG al SCG el callo primario se empieza a necrosar u oxidar, sin embargo, a partir de ese mismo tejido se inició el crecimiento de un callo secundario, el cual se diferenció por tener un mayor volumen de crecimiento. Dentro del mismo callo secundario se da el proceso de crecimiento de callo friable, ya que al mantener los subcultivos periódicos cada 15 días el tejido se mantiene en constante desarrollo, lográndose formar 150 días después de la siembra un callo en tonalidades entre marrón, blanco y traslúcido.

**Callo embriogénico:** El experimento se inició con 90 unidades experimentales, luego se disminuyó a 30 para continuar con el estudio dejando solo las unidades que habían presentado los mejores resultados y finalmente solo se dejaron 15 unidades experimentales



de las cuales el 66.66% presentó callo embriogénico, las cuales estuvieron conformadas por 5 unidades del material M1, 5 del M2 y 5 del M4. De tal modo que se ha demostrado que los tres materiales estudiados son promisorios para propagación *in vitro*. Ya que se logró inducir callo embriogénico 300 días después de la siembra del tejido.



Figura 15. Callo embriogénico.

Nota: Se pueden observar las diferentes tonalidades e incluso las distintas formaciones que toma el tejido conforme se va desarrollando de una etapa a otra.

## 11.2. Discusión de resultados

En la fase de crecimiento de callo primario (PCG) se logró inducir un callo blanco rígido 15 días después de la siembra, tanto en pétalos como en estaminodios, sin embargo, mediante la prueba de Tukey al 5% se demostró que se produjo un mayor porcentaje de callo en los estaminodios, está de acuerdo con los resultados de (Echenique Quezada & Calle Alanoca, 2020). Donde se ha demostrado que para la técnica de cultivo *in vitro* de tejidos resulta más viable el uso de estaminodios, ya que estos tienen un menor porcentaje de oxidación en comparación con los pétalos. Esto también se puede evidenciar al observar la siguiente gráfica (ver Figura 12), ya que al analizarla se puede comprobar que los tratamientos en los que se usó pétalos como tejido, presentaron muy bajo porcentaje de callo al menos al trabajar con los materiales Mazate-1 y Mazate-4, ya que en el caso del material Mazate-2 fue mayor el porcentaje de callo al usar pétalos como tejido, lo cual evidencia que la genética de los materiales si interfiere en los procesos de cultivo *in vitro*.

Otro factor importante en la inducción de callo fue la concentración de 2, 4-D, ya que los mejores porcentajes de callo primario se indujeron al aplicar 1 mg/l de la hormona, lo cual difiere con (Quimbita Guanoluisa, 2011), donde al usar 2 mg/l de la misma hormona han tenido mayor porcentaje de callo lo cual demuestra el efecto del material genético sobre los resultados en los procesos *in vitro*, tal como lo evidenciaron (Osorio Montoya, Henao Ramirez, de la Hoz Vásquez, & Urrea Trujillo, 2022), y como se evidencia en esta investigación.

En la fase de crecimiento de callo secundario inicialmente se observó necrosamiento del tejido, pero 90 días después de la siembra se logró obtener un callo blanco con formaciones filamentosas, el cual se consideró como callo secundario, ya que este crece a partir del callo inicial según (Urrea Trujillo, Atehortúa Garcés, & Gallego Rúa, 2011). Este callo fue aumentado de volumen y se fueron formando tejidos globulares, traslucidos, marrones y blancos, que al momento de los subcultivos se pudo comprobar que su textura era frágil, de tal modo que pasados los 150 días después de la siembra se pudo generar callo friable, de la misma manera en que (Calderon Acuña & Montes de Godoy, 2017), lo describen al realizar, el proceso de cultivo *in vitro* de tejidos.

Para la fase de incubación se usaron las sales básicas para cultivo de tejidos, sin agregar vitaminas, aminoácidos y hormonas al cual se le denominó TI, con lo cual se pudo evidenciar que el callo entra en un periodo de dormancia, ya que se pudo observar que el tejido inició un proceso de necrosamiento y compresión, disminuyendo notoriamente su volumen, este proceso duró 120 días.

Luego se pasaron los tejidos al medio de cultivo ED, con lo cual se pudo comprobar que el tejido retoma su proceso de división celular al generar crecimiento de callo nuevamente, con la diferencia de que en esta etapa se generó el crecimiento de tejidos globulares, con tonalidades entre marrón, blanco y transparente, descrito en otras palabras como cristalino con formaciones globulares, lo cual se puede considerar como un callo con probabilidad de generar embriones somáticos, aunque es algo que suele variar, ya que (Chanatásig Vaca, 2004), mencionan que la mayoría de autores difieren en ello, de tal modo que 300 días después de la siembra se obtuvo callo embriogénico.

## 12. Referencias

- Alvarado Güinac, D., Moreno Camey, D. E., & Montesdeoca Franco, J. R. (2016). *Determinación de la habilidad combinatorio de 11 materiales de cacao (Theobroma cacao L.) de tipo criollo, en granja Zahorí, Cuyotenango, Suchitepéquez*. Centro Universitario de Sur Occidente (CUNSUROC) y Dirección General de Investigación (DIGI), Guatemala.
- Ac Pangán, W. O. (Noviembre de 2017). *Plan de negocios para el establecimiento de una exportadora de cacao fino de aroma en Cobán, Alta Verapaz, Guatemala*. Recuperado el 22 de Junio de 2021, de Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano: <https://bdigital.zamorano.edu/bitstream/11036/6136/1/AGN-2017-001.pdf>
- Calderon Acuña, H. O., & Montes de Godoy, M. E. (2017). Micro propagación de variedades nativas de cacao (Theobroma cacao) mediante embriogenesis somática. *Producción Agropecuaria y Desarrollo Sostenible*, 87.
- Chanatásig Vaca, C. I. (2004). *Inducción de la embriogénesis somática en clones superiores de cacao (Theobroma cacao L.), con resistencia a enfermedades fungosas*. Costa Rica: Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza, Programa de Educación para el Desarrollo y la Conservación. Recuperado el 12 de febrero de 2022, de <http://www.sidalc.net/repdoc/a0275e/a0275e.pdf>
- De la Cruz Medina, J., Vargas Ortíz, M. A., & Del Angel Coronel, O. A. (2012). *Cacao: Operaciones post cosecha: Variedades "Compendio de post cosecha"*. (P. F. AGST/FAO Danilo Mejía, Editor, & y. e. Instituto Tecnológico de Veracruz, Productor) Recuperado el 17 de Junio de 2020, de (FAO) La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura : <http://www.fao.org/3/a-au995s.pdf>
- Echenique Quezada , M. A., & Calle Alanoca , 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. Recuperado el 12 de febrero de 2022, de [http://www.scielo.org.bo/pdf/riiarn/v7n1/v7n1\\_a07.pdf](http://www.scielo.org.bo/pdf/riiarn/v7n1/v7n1_a07.pdf)
- Espinosa, A., Silva, J., Sariago, S., Cholo Masapanta, L., & Delgado, H. (Septiembre-diciembre de 2012). *Efecto del tipo de explante y la concentración de ácido 2,4-diclorofenoxiacético en la formación de callos en Morus alba L.* Recuperado el 17 de Junio de 2020, de Scielo: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0864-03942012000400006](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-03942012000400006)
- Hidalgo Cevallos, A. A. (2016). *Factores que afectan la demanda de cacao en Estados Unidos y exportaciones de cacao en grano de Ecuador*. Proyecto especial, Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano, Honduras.
- Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas. (1952). *Manual del curso de cacao*. Recuperado el 22 de Junio de 2021, de Mantenimiento y mejora de los campos: <https://books.google.com.gt/books?id=I9gOAQAIAAJ&pg=PA216&lpg=PA216&dq=selecci%C3%B3n+de+materiales++de+cacao+promisorios+para+propagaci%C3%B3n&source=>

[bl&ots=El6Pp1lPfu&sig=ACfU3U2jfYvvKgLovv9Z1D T QpmQpTMxQ&hl=es&sa=X&ved=2ahUKEwjT25DHypXqAhWURTABHfI8CO](https://doi.org/10.1080/15538362.2021.2023067)

- Lopreto, K. A. (2020). *Caracterización de materiales criollos de cacao Theobroma cacao L. en granja docente experimental Zahorí*. CUNSUROC-USAC, Suchitepéquez, Guatemala.
- Malespín, M. (1982). *El cacao* (Vol. I). Managua, Nicaragua: Ministerio de desarrollo Agropecuario y Reforma Agraria; IICA. Fondo Simón Bolívar.
- Maximova, S. N., A. Y., Miller C, P. S., A. T., & Mark J, G. (2005). Integrated system for propagation of *Theobroma cacao* L.,. In: *Protocol for Somatic Embryogenesis in Woody Plants, Series:*.
- MINECO. (2015). Recuperado el 22 de Junio de 2021, de <https://www.mineco.gob.gt/sites/default/files/Inversion%20y%20Competencia/ag-170-2015.pdf>
- Osorio Montoya, T., Henao Ramirez, A. M., de la Hoz Vásquez, T., & Urrea Trujillo, Y. I. (2022). Propagación de IMC67 Plantas, Cacao Universal (*Theobroma cacao* L.) Portainjerto a través de embriogénesis somática. *Revista Internacional de Ciencias de la Fruta*, 22(1), 78-94. doi:<https://doi.org/10.1080/15538362.2021.2023067>
- Organización Internacional del Cacao. (Mayo de 2016). Recuperado el 22 de junio de 2020, de El panel ICCO reconoce a 23 países como exportadores de cacao fino y saborizante: <https://www.icco.org/about-us/icco-news/319-icco-panel-recognizes-23-countries-as-fine-and-flavour-cocoa-exporters.html>
- Organización Internacional del Cacao. (13 de Mayo de 2019). Recuperado el 29 de Junio de 2020, de Cacao Fino o de Sabor: <https://www.icco.org/about-cocoa/fine-or-flavour-cocoa.html>
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación (FAO). (2014). *Normas para bancos de recursos fitogenéticos para la alimentación y la agricultura*. Recuperado el 24 de Mayo de 2021, de <http://www.fao.org/3/a-i3704s.pdf>
- Otzoy Rosales, M. R. (2013). *Búsqueda, rescate, caracterización agromorfológica, botánica, molecular y conservación de cacao (theobroma cacao L.) tipo criollo, de los departamentos de Alta Verapaz, Izabal, Petén, Suchitepéquez y el Quiché*. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONCYT), Secretaria Nacional de Ciencia y Tecnología (SENACYT), Fondo Nacional de Ciencia y Tecnología (FONACYT), Centro Universitario de Sur Occidente (CUNSUROC) y Universidad de San Carlos de Guatemala (USAC), Guatemala.
- Paulin, D., & Eskes, A. (1995). *Le cacaoyer: stratégies de selection plantations, recherché, depeloment*. 5-18.
- Peña López, J., 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 automatico. *Ecosistemas y recursos agropecuarios*, 3(8), 215-224.
- Phillips, W., & Krauss, U. (2001). *Investigaciones Recientes Del Catie Sobre Agroecosistemas de Cacao*. Recuperado el 22 de Junio de 2021, de (CATIE) Centro Agronomico Tropical de Investigación y Enseñanza. Recuperado de

- [http://repositorio.bibliotecaorton.catie.ac.cr/bitstream/handle/11554/2624/Investigaciones\\_recientes\\_del\\_CATIE.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://repositorio.bibliotecaorton.catie.ac.cr/bitstream/handle/11554/2624/Investigaciones_recientes_del_CATIE.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- Quimbita Guanoluisa, B. E. (2011). *Efecto de la concentración de 2,4-D y el tipo de explanta en la formación de callos embriogénicos en el cultivo in vitro de cacao (Theobroma cacao L)*. UNIVERSIDAD DE GRANMA, UNIVERSIDAD DE COTOPAXI . Recuperado el 24 de febrero de 2022, de <http://repositorio.utc.edu.ec/bitstream/27000/958/1/T-UTC-1254.pdf>
- Quiñones, M., Espinoza, E., Yovera, F., Cuchilla, Y., & Castro, D. (2018). Identificación, georreferenciación y caracterización morfológica de árboles superiores de Theobroma Cacao L. 1753 cultivar cacao blanco de Piura, Perú. *The Biologist (Lima)*, 16(1).
- Roca, W. M., & Ramírez, H. (2000). *Introducción a la Biotecnología Vegetal*. Centro para el Desarrollo Agropecuario y Forestal, Inc. (CEDAF), Republica Dominicana. Recuperado el 22 de febrero de 2022, de <https://d1wqtxts1xzle7.cloudfront.net/37150671/BIOTECNOLOGIA-with-cover-page-v2.PDF?Expires=1645579133&Signature=Sbb0awpyWb0ZReoz8RK~DoT20NdbqEaiHcMi8tzzPBf66ENo9K1nWJYDZIxof0XHtSGWpHObsv~9hLkJodIcjEGZRxo6OMXOhaGRNYBFztnTzYo6Xq~3CTyQh8Ue1qV4ZsqBQI6PU-EQEb>
- Ruiz Erazo, X. (2014). *Diversidad genética de cacao Theobroma cacao L. con marcadores moleculares microsatélites*. ( Tesis de Maestría). Universidad Nacional de Colombia.
- Troyer, J. R. (2001). *In the beginning: the multiple discovery of the first hormone herbicides*. Recuperado el 17 de Junio de 2020, de Weed Science: <https://web.archive.org/web/20090914170653/http://www.agron.iastate.edu/courses/agron317/2005/readings/2,4Dhistory.pdf>
- Urrea Trujillo, A. I., Atehortúa Garcés, L., & Gallego Rúa, A. M. (2011). Regeneración vía embriogénesis somática de una variedad colombiana élite de Theobroma cacao L. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 13, 39 - 50. doi:10.15446/rev.colomb.biote
- Usui, K., Okabe, K., Victores Pernillo, R., & Ramírez, A. E. (1996). *Principio básicos del cultivo de tejidos vegetales*. ICTA-JOCV, Guatemala.

## 13. Apéndice

*Tabla 3. Componentes para medios de cultivo.*

Componentes para medios	PCG gr/l	SCG gr/l	TI gr/l	ED gr/l	PEC gr/l
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1.4160	0.4000	1.4160	1.4160	1.4160
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	1.9690		1.9690	1.9690	1.9690
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.1490		0.1490	0.1490	0.1490
CaCl <sub>2</sub>		0.0725			
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>		0.3860			
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1.5590	0.9900	1.5590	1.5590	1.5590
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.7400		0.7400	0.7400	0.7400
MgSO <sub>4</sub>		0.1807			
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.2650	0.1700	0.2650	0.2650	0.2650
Zn(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0.0170		0.0170	0.0170	0.0170
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	0.0334	0.0223	0.0334	0.0334	0.0334
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0.0003	0.0003	0.0003	0.0003	0.0003
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.0048	0.0062	0.0048	0.0048	0.0048
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.0004	0.0003	0.0004	0.0004	0.0004
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.0338	0.0278	0.0338	0.0338	0.0338
Na <sub>2</sub> -EDTA	0.0454	0.0373	0.0454	0.0454	0.0454
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O		0.0086			
myo-Inositol	0.2000	0.1000		0.1000	0.1000
Glutamina	0.2500				
Thiamina-HCL	0.0020	0.0100		0.0020	0.0020
Acido nicotínico	0.0010	0.0010		0.0010	0.0010
Glycine	0.0020			0.0020	0.0022
Pyridoxine		0.0010			
Arginine					0.0004
Leucine					0.0003
Lysine					0.0005
Tryptophane					0.0005
KNO <sub>3</sub>					0.3000
Glucosa	20.0000	20.0000	10.0000	10.0000	20.0000
Sacarosa		10.0000	20.0000	20.0000	10.0000
Thidiazuron	0.0050				
2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid	0.0010				
Bencilaminopurina		0.2000			
Kinetina				0.0020	
Ácido indolbutírico					0.0002



# Informe final proyecto de investigación 2021

Dirección General de Investigación –DIGI-

Ácido naftalenacético					0.0001
Gelrite	3.0000	3.0000	3.0000	3.0000	3.0000
pH					

Nota: Los medios de cultivo están basados en la estructura del protocolo de Maximova, los cuales para efectos de investigación fueron modificados. Fuente: (Maximova, A, Miller C, A, & Mark J, 2005).

*Tabla 4. Porcentaje de callo inducido en la etapa PCG.*

Tratamiento	2, 4 D	Tejido	Material	% de callo
1	1 mg/l	Pétalos	M1	1.00
1	1 mg/l	Pétalos	M1	1.00
1	1 mg/l	Pétalos	M1	1.00
1	1 mg/l	Pétalos	M1	1.00
1	1 mg/l	Pétalos	M1	1.18
2	1 mg/l	Estaminodios	M1	1.41
2	1 mg/l	Estaminodios	M1	1.18
2	1 mg/l	Estaminodios	M1	1.18
2	1 mg/l	Estaminodios	M1	1.34
2	1 mg/l	Estaminodios	M1	1.18
3	1 mg/l	Pétalos	M2	1.34
3	1 mg/l	Pétalos	M2	1.41
3	1 mg/l	Pétalos	M2	1.00
3	1 mg/l	Pétalos	M2	1.00
3	1 mg/l	Pétalos	M2	1.41
4	1 mg/l	Estaminodios	M2	1.18
4	1 mg/l	Estaminodios	M2	1.34
4	1 mg/l	Estaminodios	M2	1.00
4	1 mg/l	Estaminodios	M2	1.00
4	1 mg/l	Estaminodios	M2	1.41



# Informe final proyecto de investigación 2021

Dirección General de Investigación –DIGI-

5	1 mg/l	Pétalos	M4	1.00
5	1 mg/l	Pétalos	M4	1.00
5	1 mg/l	Pétalos	M4	1.00
5	1 mg/l	Pétalos	M4	1.00
5	1 mg/l	Pétalos	M4	1.00
6	1 mg/l	Estaminodios	M4	1.00
6	1 mg/l	Estaminodios	M4	1.10
6	1 mg/l	Estaminodios	M4	1.26
6	1 mg/l	Estaminodios	M4	1.34
6	1 mg/l	Estaminodios	M4	1.34
7	2 mg/l	Pétalos	M1	1.00
7	2 mg/l	Pétalos	M1	1.00
7	2 mg/l	Pétalos	M1	1.00
7	2 mg/l	Pétalos	M1	1.10
7	2 mg/l	Pétalos	M1	1.00
8	2 mg/l	Estaminodios	M1	1.00
8	2 mg/l	Estaminodios	M1	1.00
8	2 mg/l	Estaminodios	M1	1.00
8	2 mg/l	Estaminodios	M1	1.41
8	2 mg/l	Estaminodios	M1	1.00
9	2 mg/l	Pétalos	M2	1.00
9	2 mg/l	Pétalos	M2	1.00
9	2 mg/l	Pétalos	M2	1.00
9	2 mg/l	Pétalos	M2	1.00
9	2 mg/l	Pétalos	M2	1.26
10	2 mg/l	Estaminodios	M2	1.00
10	2 mg/l	Estaminodios	M2	1.00
10	2 mg/l	Estaminodios	M2	1.00

# Informe final proyecto de investigación 2021

Dirección General de Investigación –DIGI–

10	2 mg/l	Estaminodios	M2	1.26
10	2 mg/l	Estaminodios	M2	1.41
11	2 mg/l	Pétalos	M4	1.00
11	2 mg/l	Pétalos	M4	1.00
11	2 mg/l	Pétalos	M4	1.00
11	2 mg/l	Pétalos	M4	1.00
11	2 mg/l	Pétalos	M4	1.18
12	2 mg/l	Estaminodios	M4	1.00
12	2 mg/l	Estaminodios	M4	1.00
12	2 mg/l	Estaminodios	M4	1.00
12	2 mg/l	Estaminodios	M4	1.18
12	2 mg/l	Estaminodios	M4	1.34
13	3 mg/l	Pétalos	M1	1.41
13	3 mg/l	Pétalos	M1	1.00
13	3 mg/l	Pétalos	M1	1.00
13	3 mg/l	Pétalos	M1	1.00
13	3 mg/l	Pétalos	M1	1.00
14	3 mg/l	Estaminodios	M1	1.00
14	3 mg/l	Estaminodios	M1	1.00
14	3 mg/l	Estaminodios	M1	1.00
14	3 mg/l	Estaminodios	M1	1.00
14	3 mg/l	Estaminodios	M1	1.00
15	3 mg/l	Pétalos	M2	1.41
15	3 mg/l	Pétalos	M2	1.00
15	3 mg/l	Pétalos	M2	1.00
15	3 mg/l	Pétalos	M2	1.00
15	3 mg/l	Pétalos	M2	1.00
16	3 mg/l	Estaminodios	M2	1.00

# Informe final proyecto de investigación 2021

Dirección General de Investigación –DIGI-

16	3 mg/l	Estaminodios	M2	1.00
16	3 mg/l	Estaminodios	M2	1.00
16	3 mg/l	Estaminodios	M2	1.10
16	3 mg/l	Estaminodios	M2	1.00
17	3 mg/l	Pétalos	M4	1.00
17	3 mg/l	Pétalos	M4	1.00
17	3 mg/l	Pétalos	M4	1.00
17	3 mg/l	Pétalos	M4	1.00
17	3 mg/l	Pétalos	M4	1.00
18	3 mg/l	Estaminodios	M4	1.00
18	3 mg/l	Estaminodios	M4	1.00
18	3 mg/l	Estaminodios	M4	1.00
18	3 mg/l	Estaminodios	M4	1.18
18	3 mg/l	Estaminodios	M4	1.18

Nota: Debido a que no todas las unidades experimentales presentaron callo, se empleó la fórmula de  $\sqrt{x+1}$  para transformar los resultados y poder someterlos a un análisis de varianza con el fin de cumplir con los supuestos del ANDEVA.

*Tabla 5. Análisis de varianza del porcentaje de callo formado.*

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0.58	17	0.03	1.93	0.029
2, 4 D	0.2	2	0.1	5.61	0.0054* *
Tejido	0.08	1	0.08	4.32	0.0412*
2, 4 D*tejido	0.09	2	0.04	2.5	0.0888
Material	0.04	2	0.02	1.08	0.3452
2, 4 D*material	0.03	4	0.01	0.39	0.814
Tejido*Material	0.06	2	0.03	1.68	0.194

# Informe final proyecto de investigación 2021

Dirección General de Investigación –DIGI-

2, 4 D*tejido* material	0.09	4	0.02	1.28	0.2869
Error	1.27	72	0.02		
Total	1.85	89			

Nota: Para el análisis de varianza se empleó el software Infostat. Con lo cual se puede evidenciar que existen diferencias significativas para la concentración de 2,4-D y para el tipo de tejido empleado. Es importante mencionar que el coeficiente de variación es de 12.20% lo cual demuestra un buen manejo del experimento.

*Tabla 6. Prueba de Tukey al 5% para la concentración de 2, 4 D.*

2, 4 D	Medias	n	E.E.		
1 mg/l	1.15	30	0.02	A	
2 mg/l	1.07	30	0.02	A	B
3 mg/l	1.04	30	0.02		B

Nota: Mediante la prueba de medias de Tukey al 5% se pudo comprobar que se induce un mayor porcentaje de callo al utilizar 1 mg/l del ácido 2, 4 diclorofenoxiacético (2, 4 D).

*Tabla 7. Prueba de Tukey al 5% para el tipo de tejido.*

Tejido	Medias	n	E.E.		
Estaminodios	1.12	45	0.02	A	
Pétalos	1.06	45	0.02		B

Nota: Mediante la prueba de Tukey al 5% se demostró que el tejido más promisorio para el cultivo *in vitro* de *T. cacao* es el estaminodio, pues se indujo un mayor porcentaje de callo.

*Tabla 8. Porcentaje de callo inducido en la etapa SCG.*

Tratamiento	Material	BAP	% de callo
1	M1	2 mg/l	1.18
1	M1	2 mg/l	1.26
1	M1	2 mg/l	1.26
1	M1	2 mg/l	1.26
1	M1	2 mg/l	1.18
2	M1	3mg/l	1.26
2	M1	3mg/l	1.18
2	M1	3mg/l	1.18
2	M1	3mg/l	1.18
2	M1	3mg/l	1.18

# Informe final proyecto de investigación 2021

Dirección General de Investigación –DIGI-

3	M2	2 mg/l	1.34
3	M2	2 mg/l	1.26
3	M2	2 mg/l	1.18
3	M2	2 mg/l	1.18
3	M2	2 mg/l	1.18
4	M2	3mg/l	1.18
4	M2	3mg/l	1.18
4	M2	3mg/l	1.18
4	M2	3mg/l	1.18
4	M2	3mg/l	1.18
5	M4	2 mg/l	1.26
5	M4	2 mg/l	1.26
5	M4	2 mg/l	1.18
5	M4	2 mg/l	1.34
5	M4	2 mg/l	1.18
6	M4	3mg/l	1.18
6	M4	3mg/l	1.18
6	M4	3mg/l	1.26
6	M4	3mg/l	1.18
6	M4	3mg/l	1.18

Nota: Debido a que la variable de repuesta “callo”, es una variable discreta, se empleó la fórmula de  $\sqrt{x+1}$  para convertir los valores en continuos. Y los resultados se sometieron a un análisis de varianza con el fin de cumplir con los supuestos del ANDEVA.

*Tabla 9. Análisis de varianza del porcentaje de inducción de callo secundario.*

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0.01553761	5	0.00310752	1.31623398	0.29060735
Material	0.00133646	2	0.00066823	0.28303836	0.75597121
BAP	0.01380866	1	0.01380866	5.84884581	0.02353867*
Material*BAP	0.0003925	2	0.00019625	0.08312368	0.92050108
Error	0.05666208	24	0.00236092		
Total	0.07219969	29			

Nota: Para el análisis de varianza se empleó el software Infostat. Con lo cual se puede evidenciar que existen diferencias significativas para la concentración de BAP y en el caso del material o clon se evidencia que no hay diferencias significativas. Es importante mencionar que el coeficiente de variación es de 4% lo cual demuestra un muy buen manejo del experimento.

Tabla 10. Prueba de Tukey al 5% para la concentración de 2, 4 D.

BAP	Medias	n	E.E.		
2 mg/l	1.23701731	15	0.012545703	A	
3mg/l	1.194108638	15	0.012545703		B

Nota: Mediante la prueba de medias de Tukey al 5% se pudo comprobar que se induce un mayor porcentaje de callo secundario al utilizar 2 mg/l de bencilaminopurina (BAP).

#### 14. Aspectos éticos y legales (si aplica)

No fue requerido.

#### 15. Estrategia de difusión, divulgación y protección intelectual

Como parte de las actividades de divulgación se programó la visita de la Secretaría Nacional de Ciencia y Tecnología de Guatemala, los cuales realizaron una entrevista acerca de los proyectos que se han realizado hasta el presente año en el centro Universitario del Sur Occidente CUNSUROC, dentro de los cuales se contempla el proyecto DES2CU-2021, dicha institución dio realce al mismo, razón por la cual publicaron una nota en su página oficial: <https://www.facebook.com/senacytgt/photos/pcb.2139893136150268/2139875966151985/>.

También se realizó la presentación del avance de resultados en el Webinar anual de investigaciones sobre cacao de CUNSUROC. Hora: 17:00 pm, lugar: reunión virtual, mediante plataforma Meet Código: rjg-wcen-hur. Fecha: 22 de octubre del 2021, y de igual modo en el Congreso anual Agrícola de INTECAP. Hora: 9:00 am, lugar: reunión virtual, mediante plataforma ZOOM ID: 836 9698 5836. Fecha: 27 de octubre del 2021. Para complementar las actividades de divulgación, se redactaron un artículo y un manual.

#### 16. Aporte de la propuesta de investigación a los ODS:

Objetivo 2: HAMBRE CERO

Los Objetivos de Desarrollo Sostenible buscan terminar con todas las formas de hambre y desnutrición para 2030 y velar por el acceso de todas las personas, en especial los niños, a una alimentación suficiente y nutritiva durante todo el año. Esta tarea implica promover prácticas agrícolas sostenibles a través del apoyo a los pequeños agricultores y el acceso igualitario a la tierra, la tecnología y los mercados. Además, se requiere el fomento de la cooperación internacional para asegurar la inversión en la infraestructura y la tecnología necesaria para mejorar la productividad agrícola. (<https://www.un.org/sustainabledevelopment/es/>)

# Informe final proyecto de investigación 2021

Dirección General de Investigación –DIGI-

## 17. Orden de pago final

Nombres y apellidos	Categoría (investigador /auxiliar)	Registro de personal	Procede pago de mes (Sí / No)	Firma
Sadrác Neftaly Cifuentes Gramajo	Investigador	20210528	sí	

## 18. Declaración del coordinador(a) del proyecto de investigación

El coordinador de proyecto de investigación con base en el Reglamento para el desarrollo de los proyectos de investigación financiados por medio del Fondo de Investigación, artículos 13 y 20, deja constancia que el personal contratado para el proyecto de investigación que coordina ha cumplido a satisfacción con la entrega de informes individuales por lo que es procedente hacer efectivo el pago correspondiente.

Ph.D. Reynaldo Humberto Alarcón Noguera	Firma
Fecha: 28/02/2022	

## 19. Aval del director(a) del instituto, centro o departamento de investigación o Coordinador de investigación del centro regional universitario

De conformidad con el artículo 13 y 19 del Reglamento para el desarrollo de los proyectos de investigación financiados por medio del Fondo de Investigación otorgó el aval al presente informe final de las actividades realizadas en el proyecto (Establecimiento del protocolo para propagación *in vitro* de cacao criollo (*Theobroma cacao* L.) Malvaceae, de la Costa Sur de Guatemala.) en mi calidad de Coordinador del Instituto de Investigación y Desarrollo del Sur Occidente), mismo que ha sido revisado y cumple su ejecución de acuerdo a lo planificado.

# Informe final proyecto de investigación 2021

Dirección General de Investigación –DIGI-

Vo.Bo. Ing. Agr. David Alvarado Güinac Coordinador del Instituto de Investigación del Sur Occidente	Firma
Fecha: 28/02/2022	

## 20. Visado de la Dirección General de Investigación

Ing.Agr. Julio Rufino Salazar  Vo.Bo. Nombre Coordinador(a) del Programa Universitario de Investigación	Firma
Fecha: 28/02/2022	

Ing.Agr. Julio Rufino Salazar  Vo.Bo. Nombre Coordinador General de Programas Universitarios de Investigación	Firma
Fecha: 28/02/2022	