



UNIVERSIDAD ESTATAL DE BOLÍVAR
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS, RECURSOS
NATURALES Y DEL AMBIENTE

CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

TEMA:

EVALUACIÓN AGRONÓMICA DE DOS VARIEDADES DE CACAO
(Theobroma cacao) **MEDIANTE MULTIPLICACIÓN IN VITRO DE**
EMBRIONES MADUROS CON TRES DOSIS DE ÁCIDO GIBERÉLICO

Proyecto de investigación previo a la obtención del título de Ingeniero Agrónomo, otorgado por la Universidad Estatal de Bolívar, a través de la Facultad de Ciencias Agropecuarias, Recursos Naturales y del Ambiente, Carrera de Ingeniería Agronómica.

AUTOR:

BRUNO BAJAÑA PUMA

Director:

ING. WASHINGTON DONATO ORTIZ M.Sc.

GUARANDA – ECUADOR

2020

**EVALUACIÓN AGRONÓMICA DE DOS VARIEDADES DE CACAO
(*Theobroma cacao*) MEDIANTE MULTIPLICACIÓN IN VITRO DE
EMBRIONES MADUROS CON TRES DOSIS DE ÁCIDO GIBERÉLICO**
Revisado y aprobado por los miembros del tribunal

.....
ING WASHINGTON DONATO ORTIZ MSc.
DIRECTOR

.....
ING. KLEBER ESPINOZA MORA Mg.
BIOMETRISTA

.....
ING. SONIA FIERRO BORJA Mg.
ÁREA DE REDACCIÓN TÉCNICA



CERTIFICACIÓN DE AUTORÍA

Yo, Bruno Bajaña Puma con C.I. 1204728420; declaro que el trabajo y los resultados presentados en este informe técnico científico, no han sido previamente presentados para ningún grado o calificación profesional; y, que las referencias bibliográficas que se incluyen han sido consultadas y citadas con su respectivo autor.

La Universidad Estatal de Bolívar, puede hacer uso de los derechos de publicación correspondientes a este trabajo, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, su Reglamentación y la Normativa Institucional vigente.

BRUNO BAJAÑA PUMA

CI: 1204728420

AUTOR

ING. WASHINGTON DONATO ORTIZ MSc.

CI: 1801964550

DIRECTOR

ING. SONIA FIERRO BORJA Mg.

CI: 0201084712

ÁREA DE REDACCIÓN TÉCNICA

Lista de fuentes Bloques

Enlace/nombre de archivo	Categoría
tesis (1).docx	
PROYECTO FINAL GUARANICO.docx	
FINAL-FINAL.docx	
PROYECTO DE GRADO FECHICHE CORRE INS. VARIACIONAL	
Proyecto de Tesis en Completado gata 2017 Lomas de arbol albariza.pdf	

Documento [PROYECTO FINAL \(1\).docx](#) (D78804852)

Presentado 2020-09-08 21:42 (48:00)

Presentado por victorbarrene@gmail.com

Recibido donato.arb@analysis.urfkand.com

8% de estas 50 páginas, se componen de texto presente en 10 fuentes.

72% **1** **Activo** **registro Unimed: UNIVERSIDAD ESTATAL DE BOLIVAR / FINAL-FINAL.docx**

UNIVERSIDAD ESTATAL DE BOLIVAR FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS, RECURSOS NATURALES Y DEL AMBIENTE

CARRERA DE INGENIERIA AGRONOMICA

TEMA: de dos variedades de cacao (Theobroma cacao)

EVALUACION AGRONOMICA

DE DOS VARIEDADES DE CACAO (Theobroma cacao)

MEDIANTE MULTIPLICACION IN VITRO DE EMBRIONES MADUROS CON TRES DOSIS DE ACIDO GIBBERELICO

Proyecto de investigación previo a la obtención del título de Ingeniero Agrónomo, otorgado por la Universidad Estatal de Bolívar, a través de la Facultad de Ciencias Agropecuarias, Recursos Naturales y del Ambiente, Carrera de Ingeniería Agronómica.

AUTOR: BRUNO BAJAÑA PUJIA



DEDICATORIA

Dedico de corazón este proyecto primordialmente a Dios quien me permitió seguir adelante con fuerzas para culminar este sueño.

A mi esposa mi cuñada e hija quienes siempre estuvieron en todo momento dándome fuerzas y alientos para seguir encaminado para alcanzar mis metas.

A mis padres y hermanos quienes han sido el núcleo de mi vida en mi etapa como estudiante.

Bruno

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios padre por esa fortaleza que me transmite cada día, la cual no me dejó caer en los momentos que se me hacía difícil culminar el proyecto.

A la Universidad Estatal de Bolívar que me dio la oportunidad de estudiar y culminar mi carrera universitaria, para poder estar preparado en un futuro como profesional.

A mi director de Tesis Ing. Washington Donato Ortiz, por toda la ayuda brindada en mi proyecto

A la Ing. Sonia Fierro Borja, en el área de Redacción Técnica por sus correcciones técnicas.

Al Ing. Kleber Espinoza Mora, Biometrista por supervisar y encaminar mi proyecto en todo momento.

Bruno

INDICE DE CONTENIDO

CERTIFICACIÓN DE AUTORÍA	iii
DEDICATORIA	v
AGRADECIMIENTO	viÍ
INDICE DE CONTENIDO.....	vii
ÍNDICE DE TABLAS	xi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xii
ÍNDICE DE ANEXOS.....	xiii
RESUMEN.....	xiv
ABSTRACT.....	xv
I. INTRODUCCIÓN	1
II. PROBLEMA	4
III. MARCO TEÓRICO.....	5
3.1. Origen.....	5
3.2. Clasificación taxonómica	5
3.3. Descripción morfológica de la planta.....	5
3.3.1. Raíz.....	5
3.3.2. Hojas.....	6
3.3.3. Tallo y ramas	6
3.3.4. Flores	6
3.3.5. Fruto y semillas	6
3.4. Características edafoclimáticas	6
3.4.1. Suelos	7
3.4.2. Temperatura	7
3.4.3. Precipitación.....	7
3.4.4. Vientos	7
3.4.5. Biotecnología generalidades	8
3.4.6. Cultivo de tejidos	8
3.4.7. Generalidades del cultivo de tejidos.....	8
3.5. Cultivo de embriones.....	8
3.5.1. Cultivo de embriones maduros.....	9

3.5.2.	Cultivo de embriones inmaduros.....	9
3.6.	Micropropagación	9
3.6.1.	Enraizamiento in vitro.....	10
3.6.2.	Aclimatación de plántulas producidas in vitro.....	10
3.6.3.	Medios de cultivos in vitro.....	10
3.6.4.	Componentes inorgánicos del medio del cultivo	10
3.6.5.	Micronutrientes	11
3.7.	Componentes orgánicos del medio de cultivo.....	12
3.7.1.	Carbohidratos	12
3.7.2.	Vitaminas	12
3.7.3.	Ácido nicotínico	13
3.7.4.	Piridoxina (Vitamina B6).....	13
3.7.5.	Myo-inositol.....	13
3.7.6.	Ácido ascórbico y ácido cítrico.....	13
3.8.	Reguladores de crecimiento	13
3.8.1.	Auxinas.....	14
3.8.2.	Citoquininas	14
3.8.3.	Gibberalinas	14
IV.	MARCO METODOLÓGICO.....	16
4.1.	Materiales	16
4.1.1.	Localización de la investigación	16
4.1.2.	Situación climática y geográfica	16
4.1.3.	Zona de vida.....	16
4.1.4.	Material experimental	17
4.1.5.	Materiales de campo.....	17
4.1.6.	Materiales de laboratorio.....	17
4.1.7.	Materiales de oficina	18
4.2.	Métodos	18
4.2.1.	Factores en estudio	18
4.2.2.	Tratamientos.....	18
4.2.3.	Tipo de diseño	19
4.2.4.	Procedimiento.....	19
4.2.5.	Tipo de análisis.....	19

4.3.	Métodos de evaluación y datos tomados.....	19
4.3.1.	Días a la brotación (DB).....	19
4.3.2.	Porcentaje de semillas brotadas (%SB).....	20
4.3.3.	Número de frascos contaminados (NFC).....	20
4.3.4.	Longitud del explante (LE)	20
4.3.5.	Días a transferir a un medio de multiplicación (DTMM)	20
4.3.6.	Días al medio de enraizamiento (DME).....	20
4.3.7.	Días a la emisión de raíces (DER)	20
4.3.8.	Volumen de raíz (VR).....	20
4.3.9.	Días a la transferencia a condiciones medio ambientales externas (DTCME)	21
4.3.10	Porcentaje de mortalidad de las plantas al trasplante a condiciones externas (PMPTCE)	21
4.3.11	Altura de la planta (AP)	21
4.3.12	Longitud de las hojas. (LH)	21
4.3.13	Ancho de las hojas (AH).....	21
4.3.14	Diámetro del tallo (DT).....	21
4.3.15	Diámetro del Pecíolo (DP).....	22
4.3.16	Número de entrenudos (NE)	22
4.3.17	Longitud de entre nudos. (LEN)	22
4.4.	Manejo del experimento	22
4.4.1	Selección de plantas	22
4.4.2	Selección de mazorcas	22
4.4.3	Desinfección de las mazorcas	22
4.4.4	Elaboración del medio de cultivo.....	23
4.4.5	Preparación del agar para los embriones.....	23
4.4.6	Desinfección de la mazorca en el laboratorio	24
4.4.7	Preparación de los embriones a cada frasco.....	24
4.5.	Preparación de las plántulas de cacao obtenidas In vitro a condiciones medioambientales externas	25
V.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	26
5.1.	Variables agronómicas para el factor A: Variedad.....	26
5.1.1.	Variables registradas en la fase de laboratorio.....	28

5.1.2.	Variables registradas en la fase de campo.....	30
5.2.	Variables agronómicas para el factor B: Dosis de ácido giberélico	37
5.2.1.	Variables registradas en la fase de laboratorio.....	39
5.3.	Variables agronómicas: Interacción de factores A × B.....	48
5.3.1.	Variables registradas en la fase de laboratorio.....	50
5.3.2.	Variables registradas en la fase de campo.....	53
VI.	COMPROBACIÓN DE LA HIPÓTESIS.....	61
VII.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	62
7.1.	Conclusiones	62
7.2.	Recomendaciones	63
	BIBLIOGRAFÍA	64
	ANEXOS	68

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Localización de la investigación	16
Tabla 2: Características del sitio de investigación	16
Tabla 3: Tratamientos aplicados en la investigación	18
Tabla 4: ADEVA aplicado en la investigación	19
Tabla 5: Composición del medio de cultivo utilizado en la investigación	23
Tabla 6: Composición del agar utilizado en la investigación	24
Tabla 7. Resultados de la prueba de Tukey al 5% en el factor A:	26
Tabla 8: Resultados de la prueba de Tukey al 5% en el factor B:	37
Tabla 9: Resultados para comparar los promedios de tratamientos A x B:	48

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Días a la brotación por variedad	28
Figura 2: Longitud de explante a los 45 días por variedad	29
Figura 3: Longitud de explante a los 60 días por variedad	30
Figura 4: Volumen de raíz por variedad	31
Figura 5: Altura de la planta por variedad	32
Figura 6: Número de hojas por variedad.....	32
Figura 7: Longitud de hoja por variedad.....	33
Figura 8: Ancho de hoja por variedad.....	34
Figura 9: Diámetro de tallo por variedad	35
Figura 10: Diámetro de peciolo por variedad	35
Figura 11: Longitud de entrenudos por variedad	36
Figura 12: Días a la brotación por dosis de ácido giberélico	39
Figura 13: Longitud explante 45 días por dosis de ácido giberélico.....	40
Figura 14: Longitud explante 60 días por dosis de ácido giberélico.....	41
Figura 15: Volumen de raíz por dosis de ácido giberélico.....	42
Figura 16: Altura de planta por dosis de ácido giberélico	42
Figura 17: Número de hojas por dosis de ácido giberélico.....	43
Figura 19: Longitud de hojas por dosis de ácido giberélico	44
Figura 19: Ancho de hojas por dosis de ácido giberélico	45
Figura 20: Diámetro de tallo por dosis de ácido giberélico	45
Figura 21: Diámetro de peciolo por dosis de ácido giberélico.....	46
Figura 22: Longitud de entrenudos por dosis de ácido giberélico	47
Figura 23: Promedio de días de brotación por interacción factores A x B	50
Figura 24: Promedio longitud explante 45 días por interacción factores A x B ...	51
Figura 25: Promedio longitud explante 60 días por interacción factores A x B ...	52
Figura 26: Promedio volumen de raíz por interacción factores A x B.....	53
Figura 28: Promedio número de hojas por interacción factores A x B.....	55
Figura 29: Promedio longitud de hojas por interacción factores A x B.....	56
Figura 30: Promedio ancho de hojas por interacción factores A x B.....	57
Figura 31: Promedio diámetro de tallo por interacción factores A x B	58
Figura 32: Promedio diámetro de peciolo por interacción factores A x B.....	59
Figura 33: Promedio número de entrenudos por interacción factores A x B.....	60

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO N°	DENOMINACIÓN
1:	Mapa físico de la localidad donde realizara la investigación
2:	Base de datos recolectados en fase de laboratorio.
3:	Base de datos recolectados en fase de campo.
4:	Fotografías de la instalación, y evaluación de la investigación.
5:	Glosario de términos técnicos.

RESUMEN

El cacao como uno de los principales generadores de divisas para la economía ecuatoriana; siendo sin lugar a dudas, una de las principales motivaciones de investigación por parte de los agrónomos locales con respecto a las mejoras en los procesos de reproducción in vitro que permita mantener la sustentabilidad de las plantaciones de cacao. El objetivo del presente proyecto de investigación fue evaluar agronómicamente dos variedades de cacao mediante embriones maduros con tres dosis de ácido giberélico. Para el efecto, se realizó una investigación experimental en Lagucoto II, en los laboratorios de la Facultad de Ciencias Agropecuarias, ubicado en la parroquia Veintimilla del cantón Guaranda, provincia de Bolívar. Se utilizaron embriones maduros de dos variedades de cacao y tres dosis de ácido giberélico; bajo un tipo de diseño que consistió de Bloques Completas al Azar (DBCA) con una factorial de 2x3x3 repeticiones para la realización del análisis de varianza (ADEVA). Se utilizó la prueba de Tukey al 5% para comparar media de las variables agronómicas por variedad (FA), dosis de ácido giberélico (FB) y por interacción de ambos factores (FA x FB). Basado en los resultados estadísticos que se presentaron en el desarrollo de este proyecto, se concluyó que la respuesta agronómica es estadísticamente diferente; por lo tanto, se acepta la hipótesis alternativa, la respuesta agronómica de las dos variedades de cacao y las tres dosis de ácido giberélico mediante la multiplicación in vitro es diferente. Respecto al resultado de la interacción entre los factores A x B para el desarrollo de las plántulas en la etapa de proliferación, se demostró que la combinación entre la variedad CCN51 y una dosis de 6 mg de ácido giberélico, obtuvo mejores resultados en materia de características agronómicas de las plantas sujetos de estudio.

ABSTRACT

Cocoa as one of the main generators of foreign exchange for the Ecuadorian economy, being undoubtedly one of the main motivations of research by local agronomists with regard to improvements in in vitro reproduction processes that allow maintaining the sustainability of cocoa plantations. The objective of this research project is to agronomically evaluate two varieties of cocoa using mature embryos with three doses of gibberellic acid. For this purpose, an experimental investigation was carried out in Laguacoto II, in the laboratories of the Faculty of Agricultural Sciences, located in the Veintimilla parish of the Guaranda canton, province of Bolívar. Mature embryos of two cocoa varieties and three doses of gibberellic acid were used; under a type of design that consisted of Complete Random Blocks (CRB) with a factorial of 2x3x3 repetitions for the analysis of variance (ANOVA). The hypothesis test used was the 5% Tukey analysis to compare mean agronomic variables by variety (FA), dosage of gibberellic acid (FB) and by interaction of both factors (FA x FB). Based on the statistical results that will be presented in the development of this project, it was concluded that the agronomic response is statistically different; Therefore, the alternative hypothesis is accepted that the agronomic response of the two cocoa varieties and the three doses of gibberellic acid by in vitro multiplication is different. Likewise, the result of the interaction between the factors A x B for the development of the seedlings in the proliferation stage, it was demonstrated that the combination between the CCN51 variety and a dose of 6 mg of gibberellic acid, obtained better results in the matter of agronomic characteristics of the plants under study.

I. INTRODUCCIÓN

El cacao es considerado un importante producto agrícola en el ámbito mundial y se utiliza como materia prima para la industria chocolatera. Entre 2013 y 2017, las importaciones mundiales de cacao crecieron 6,3% promedio anual. Es importante decir que la demanda del cacao en grano proviene de la industria, la cual lo emplea para producir: Chocolates, alimentos procesados, entre otros. (Orlando, S. 2019).

Ecuador como importante exportador de cacao fino y de aroma, exportó en el 2016 cerca de 223.000 toneladas de cacao en grano, 25.000 toneladas en semielaborados y 1.700 toneladas en productos terminados, según información suministrada por la Asociación Nacional de Exportadores de Cacao (ANECACAO. 2015).

En la provincia de Bolívar, según el último censo agropecuario llevado a cabo por el Instituto Nacional de Estadística y Censos, existe aproximadamente una superficie sembrada de 11.030 hectáreas de cacao, de las cuales se encuentran en etapa de producción 10.006 hectáreas; consiguiendo un rendimiento de 4.063 toneladas de este producto (INEC. Instituto Nacional de Estadística y Censos. 2016).

En los cantones pertenecientes a la provincia de Bolívar, el (MAGAP), en los últimos años realizó la entrega de 72.058 plantas de cacao fino de aroma a los productores pertenecientes a los cantones Las Naves, Echeandía, Caluma, San Luis de Pambil, San José de Tambo y Balzapamba, implementando 116 hectáreas de cultivo con el fin de reactivar la producción de cacao fino de aroma. Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca (MAGAP. 2016).

El cacao CCN-51 permite una producción anual de 2000 a 3000 kilogramos por hectárea, a diferencia de la variedad nacional, cuya productividad anual es de 300 a 500 kilogramos por hectárea; ofrece como ventaja una mayor posibilidad de generar plazas de empleo. (Diario el Comercio, 2016).

El cacao nacional fino de aroma se lo considera como el mejor cacao del mundo, razón por la cual, el gobierno ecuatoriano a través del (MAGAP) desde junio del 2012 desarrolló el proyecto de reactivación del cacao nacional fino y de aroma, con el propósito de promover la producción de cacao como generador de divisas a través de las exportaciones (MAGAP, 2016).

EL cacao forastero es la variedad más común, pero también la más robusta y la que da más cantidad de frutos. Produce el grano menos aromático. Es cultivado principalmente en: Perú, Ecuador, Colombia, Brasil e incluso Venezuela (Vera, G. 2016).

EL Cacao criollo es la variedad mayor calidad, pero su producción representa menos de un 10% del total mundial. Es cultivado principalmente en México, Guatemala y Nicaragua en pequeñas cantidades (Hackeber, A 2015).

La agricultura a través de los tiempos, ha venido desarrollando nuevos métodos que se ajusten a las necesidades de la población agrícola y de los consumidores. Estos cambios han sido enfocados mediante estudios y técnicas científicas para aumentar la productividad de los cultivos mediante la biotecnología, con la cual se ha podido desarrollar muchas alternativas en cuanto a micro propagación mejoramiento genético y selección in vitro para la obtención de soma clones tolerantes a factores bióticos y abióticos, a través de la biotecnología se ha logrado la producción de plantas libres de patógenos y la conservación de germoplasma (INIAP. Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias de Ecuador. 2015).

La giberelina es un elemento muy importante durante la etapa de germinación de la semilla, durante este proceso, comienza a absorber agua del medio para alcanzar su objetivo. Esa absorción induce al embrión a producir giberelina, provocando de esta manera su germinación, y, consecuentemente su crecimiento (ECURED. Enciclopedia colaborativa en la red. 2005).

Con estos antecedentes, los objetivos planteados en el presente proyecto de investigación son los siguientes:

1. Determinar la dosis de ácido giberélico que tenga una mejor respuesta durante la fase de multiplicación in vitro de los embriones maduros de cacao.
2. Establecer la variedad de cacao que responda a la multiplicación in vitro de embriones maduros.
3. Evaluar la interacción de las dosis más adecuadas de ácido giberélico, con las dos variedades de cacao para el desarrollo de las plántulas en la etapa de proliferación.

II. PROBLEMA

Los mayores problemas que puede presentar el productor cacaotero son las enfermedades, provocando hasta un 80% de pérdidas en la producción de una huerta y una baja total de ingresos, indistintamente de los tipos de cacao que se haya sembrado y debido a que los sistemas tradicionales de propagación presenta desventajas tales como la demanda de labores intensivas, costos asociados, tasa de propagación frecuentemente bajas y un patrón de crecimiento arbustivo que presentan frecuentemente a utilizar estas técnicas.

La inexperiencia de multiplicación in vitro de plantas por medio de embriones maduros de cacao y la falta de recursos para poder adquirir un laboratorio, hace que no se realice este tipo de investigaciones que pueden mejorar la agricultura del Ecuador; y, por ende, los ingresos económicos a las familias agricultoras debido a la inexistencia de protocolos establecidos en biotecnología para la multiplicación de plantas de cacao en laboratorio a partir de embriones maduros.

Son pocos los viveros que provén plantas certificadas, debido a esto se presentan muchos problemas de plagas y enfermedades para el agricultor desde antes que comience con las labores de siembra.

La presente investigación busca obtener plantas de cacao libres de enfermedades y establecer un protocolo para la multiplicación in vitro de embriones maduros de cacao probando diferentes dosis de giberelinas y saber cuál de estas concentraciones será la más adecuada y eficaz para poder realizar la primera etapa de micro propagación en el laboratorio, esta información será de vital importancia ya que podrá servir como base para seguir con las investigaciones futuras.

III. MARCO TEÓRICO

3.1. Origen

Históricamente el origen de la domesticación del cacao se remonta a Mesoamérica (México, Guatemala y Honduras), donde su uso está documentado alrededor del año 2000 a.C. Sin embargo, diversos estudios realizados en la actualidad, han demostrado que por lo menos una variedad del (*Theobroma cacao*) se origina en la alta Amazonía desde hace más de 5 mil años. En Ecuador, esto se evidenció a la llegada de los españoles a la actual región litoral ecuatoriana, cuando se observaron grandes árboles de cacao demostrando de esta manera el conocimiento y la utilización de esta especie por parte de los aborígenes de dichos territorios (ANECACAO, 2015).

3.2. Clasificación taxonómica

Reino:	<i>Plantae</i>
División.	<i>Magnoliophyta</i>
Clase:	<i>Magnoliopsida</i>
Orden:	Malvales
Familia:	<i>Malvaceae</i>
Género:	<i>Theobroma</i>
Esp. Principales:	T. cacao

(Enríquez, G. 2010).

3.3. Descripción morfológica de la planta

3.3.1. Raíz

Posee una principal que crece hasta unos dos metros hacia abajo, y al mismo tiempo, cuenta con muchas raíces secundarias que salen hacia los lados de la raíz principal en los primeros treinta centímetros del suelo. La función de la raíz, además de sujetar la planta al suelo, es la de absorber y conducir los nutrientes del suelo por el interior de la planta (Batista, L. 2009).

3.3.2. Hojas

Sus hojas son simples, alargadas, enteras y de color verde; cuyos colores van desde el café claro pasando por el morado, rojizo y verde pálido (Enríquez, G. 2010).

3.3.3. Tallo y ramas

Como se observa en otras especies del género *Theobroma*, en el caso del árbol de cacao, sus ramas son dimórficas. Una parte de estas ramas son de crecimiento vertical hacia arriba, conocidas como ramas de crecimiento ortotrópico, constituyendo el tallo principal y los chupones. Mientras que, las demás ramas son de crecimiento oblicuo hacia fuera, y se las conoce como ramas de crecimiento plagiotrópico. En las plantas de cacao nacidas a partir de semillas, se desarrollan un tallo principal de crecimiento vertical que alcanza entre uno a dos metros de altura a la edad de doce a dieciocho meses (Batista, L. 2009).

3.3.4. Flores

Las flores de esta especie son pequeñas y se producen en racimos pequeños sobre el tejido maduro, esto es, en las zonas del tronco y las ramas que tengan una edad mayor a un año alrededor en los sitios donde antes existió hojas (Enríquez, G. 2010).

3.3.5. Fruto y semillas

El fruto de esta planta se presenta dentro de una cáscara dura con relieves simétricos y longitudinales de forma alargada y ovalada. Una de las particularidades de este fruto es el hecho que surge directamente del tronco del árbol o de sus ramas más viejas, un grano de cacao constituye en la semilla fermentada y secada del (*Theobroma cacao*), del cual se obtienen los sólidos y la manteca de cacao (Arvelo, M. et. al. 2017).

3.4. Características edafoclimáticas

Las condiciones climáticas que afectan el óptimo desarrollo del cacao son principalmente la temperatura y la lluvia; no siendo menos el efecto del viento fuerte, la luz, radiación solar y la humedad relativa. Se adapta muy bien desde 0

msnm hasta los 800 msnm. En cuanto a la precipitación el cacao es muy sensible a los escasos de agua, así como su exceso la precipitación debe de ser de 1,500 a 2,500 mm al año. (Moreno, J. 2011).

3.4.1. Suelos

Para un óptimo desarrollo y productividad de la planta de cacao, es necesario contar con suelos altamente ricos en materia orgánica, esto es, que sean profundos de textura franco-arcillosa, cuenten con un buen sistema de drenaje y topografía regular. El principal factor limitante del suelo para un adecuado desarrollo de la planta es la delgada capa húmica, ya que esta capa se desgasta velozmente cuando la superficie del suelo se encuentra expuesta de manera directa al sol, al viento y a lluvia. Por este motivo, una práctica común en la agricultura cacaotera es el empleo de leguminosas auxiliares que suministren la sombra necesaria y constituyan una fuente de sustancias nitrogenadas para el cultivo. (García, A. 2015).

3.4.2. Temperatura

El mejor desarrollo del cacao se manifiesta en temperaturas promedio anuales de 21°C. Las temperaturas muy altas o bajas pueden llegar a producir alteraciones fisiológicas en el árbol. La temperatura ejerce su efecto en la formación de las flores. (Estrada, E. et. al. 2011).

3.4.3. Precipitación

Por ser sensible a la escasez de agua y al encharcamiento del mismo, uno de los requerimientos para el cultivo de cacao es la provisión de un buen drenaje para los suelos. Respecto a las necesidades de agua para la planta, el nivel de precipitación necesaria se ubica entre 1500 y 2500 mm en los sectores de baja altitud más cálidas; y, entre 1200 y 1500 mm en las zonas menos calurosas. (García, A. 2015).

3.4.4. Vientos

El viento fuerte incide en el desecamiento, muerte y caída de las hojas afectando así la capacidad de alimentarse de la planta, en zonas donde existe este problema deben de colocarse cortinas rompeviento para evitar los daños. Los cortavientos

consisten en formaciones de distintas especies arbóreas, que pueden ser frutales o madereras, que se cultivan en los alrededores de los árboles de cacao. (Estrada, E. et. al. 2011).

3.4.5. Biotecnología generalidades

Se entiende por biotecnología al conjunto de técnicas que manipulan organismos vivos, o partes de ellos, con el fin de obtener productos o modificarlos. Es decir, con la biotecnología se pueden mejorar plantas o animales, o en su defecto, desarrollar microorganismos en laboratorio con fines científicos (Benítez, A. 2005).

3.4.6. Cultivo de tejidos

El cultivo de tejidos puede ser definido como un conjunto muy heterogéneo de técnicas que presentan en común el hecho de que un explante (una parte separada del vegetal que pueden ser protoplastos –células desprovistas de pared celular– células, tejidos u órganos), se cultiva asépticamente en un medio artificial de composición química definida y se incuba en condiciones ambientales controladas (Cruz, F. 2012).

3.4.7. Generalidades del cultivo de tejidos

El cultivo in vitro de vegetales se basa esencialmente en el aislamiento de órganos, tejidos o células vegetales y en el ajuste de las condiciones necesarias para la obtención de respuestas fisiológicas o morfogénicas a partir de estos explantes. El cultivo de células y tejidos in vitro (CCTV) involucra diferentes técnicas a partir de diferente material vegetal tales como cloroplastos, células, tejidos, órganos e incluso plantas completas (Navarro, C. 2015).

3.5. Cultivo de embriones

Es la escisión desinfectada de un embrión inmaduro de un óvulo y posterior cultivo in vitro a un ambiente nutritivo adecuado. Los embriones híbridos resultantes del cruce entre especies con parentesco lejano, tienen altas probabilidades de sobrevivir a causa de una deficiente nutrición por el endospermo. En consecuencia, pueden malograrse o disminuir de volumen poco tiempo después de haberse formado el

cigoto, sin formarse semillas viables. Mediante esta clase de técnicas, existen altas probabilidades de salvar esta clase de embriones inmaduros y lograr su crecimiento, germinación y desarrollo en plántulas (Fernández, L. 2018).

3.5.1. Cultivo de embriones maduros

Para esta técnica se utilizan semillas maduras, teniendo una gran ventaja debido a que la mínima posibilidad de contaminación y se emplea un medio nutritivo simple, con agar, azúcar y minerales. (Cortez, V. 2017).

3.5.2. Cultivo de embriones inmaduros

Se realiza a partir de semillas no acabadas de madurar y se utiliza para impedir el aborto embrionario se pueden obtener plantas vigorosas libres de patógenos. (Cortez, V. 2017)

3.6. Micropropagación

Consiste en un conjunto de técnicas y métodos de cultivo en el que se usan tejidos vegetales para su reproducción asexual en forma rápida, eficiente y de forma masiva. Es aprovechada para multiplicar plantas nuevas, como es el caso de aquellas creadas por ingeniería genética. De igual forma, se la utiliza para obtener plantas inmunes a enfermedades o multiplicar especies que no se multiplican de manera eficiente. En la micropropagación a partir de un explanto de una planta seleccionada, denominada como planta madre, se crea una descendencia con plantas genéticamente idénticas llamadas clones. Para estos procesos in vitro, se utilizan básicamente las yemas vegetativas de las plantas. Los envases que contienen las plantas se disponen en estanterías conocidas como cámaras de crecimiento que cuentan con luz artificial y se fija la temperatura que fluctúa entre los 21 y 23°C. Además de vigilar las horas de luz y la temperatura ambiental, el medio de cultivo está compuesto de una combinación de sales minerales, vitaminas, reguladores de crecimiento, azúcar, agua y agar. (Calva, P. 2005).

3.6.1. Enraizamiento in vitro

En vista de las características anatómicas y fisiológicas de las plantas sujetas a micropropagación, se necesita para su supervivencia en condiciones in vitro se adapte a las condiciones medioambientales del invernadero o del campo (Encina, L. 2015).

3.6.2. Acimatación de plántulas producidas in vitro

Para una aplicación exitosa de la técnica de cultivo de tejidos vegetales como un instrumento en la propagación masiva de plantas, obedece a la capacidad para el manejo de las plantas a gran escala en el vivero durante el periodo de adaptación; de esta manera se logran altas tasas de sobrevivencia a bajo costo (Valerín, A. 2005).

3.6.3. Medios de cultivos in vitro

Los medios de cultivo in vitro constituyen un componente primordial para el cultivo in vitro de vegetales para conseguir su desarrollo en laboratorio. Estos medios contienen una serie de componentes generales y específicos, cuya presencia y concentración, estará relacionado con el objeto propuesto para su utilización. Los componentes que se utilizan para ello son sustancias minerales, vitaminas, aminoácidos, azúcares, reguladores del crecimiento y otros elementos. Es importante destacar que los cultivo in vitro aplicado en especies vegetales se realiza en medios de cultivos artificiales, que suministran los alimentos precisos que la planta tomaría de la tierra en su hábitat natural, y, precisamente su éxito está influenciado considerablemente por las características del medio de cultivo utilizado y otros factores ambientales (Castillo, A. 2004).

3.6.4. Componentes inorgánicos del medio del cultivo

Los medios de cultivo se forman a partir de componentes inorgánicos, que son los macronutrientes y se suministran en cantidades relativamente grandes, y, los micronutrientes que son agregados en menor cantidad. El nitrógeno se agrega al medio de cultivo en forma de nitrato o iones amonio, de manera combinada. Mientras que el sulfato de magnesio, satisface tanto el requerimiento de magnesio

como el de azufre. El fósforo puede adicionarse en cualquiera de las formas de fosfato de dihidrógeno de sodio monohidratado ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) o fosfato monopotásico. El potasio es un catión que se agrega en forma de cloruro de potasio (KCl), nitrato de potasio (KNO_3), o fosfato monopotásico (KH_2PO_4). El calcio se adiciona con cloruro de calcio dihidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), nitrato de calcio 4-hidrato ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) o la forma anhidra de cualquier sal y el cloro se presenta en forma de cloruro de potasio (KCl) o cloruro de calcio (CaCl_2) (Calva, P. 2005).

3.6.5. Micronutrientes

Generalmente se añaden a los medios de cultivo: hierro, níquel, cloro, manganeso, cinc, boro, cobre, y molibdeno. Estos elementos junto con el carbono, oxígeno e hidrógeno constituyen los diecisiete elementos esenciales para el crecimiento vegetal. Aunque este tipo de nutrientes son requeridos en menor cantidad, son indispensables para un apropiado metabolismo de las células vegetales en general (Domenech, A. 2001).

3.6.5.1.El hierro y el magnesio

La función más importante de estos elementos es la de átomo central en la molécula de clorofila. La clorofila es el pigmento que da a las plantas su color verde y lleva a cabo el proceso de la fotosíntesis; también interviene en la activación de un sinnúmero de enzimas necesarias para su desarrollo y contribuye a la síntesis de proteínas. Son primordiales para la síntesis de clorofila y la función de los cloroplastos (PROMIX, Productos, Hortícolas, Profesional. 2018).

3.6.5.2.El zinc

Zinc (Zn) es uno de los ocho micronutrientes esenciales. Es necesario para las plantas en pequeñas cantidades, pero crucial para su desarrollo. La deficiencia de zinc es probablemente la deficiencia de micronutrientes más común en los cultivos en todo el mundo, dando lugar a importantes pérdidas en los rendimientos de cultivos y a problemas nutricionales de la salud humana (Smart Biblioteca, 2020).

3.6.5.3.El molibdeno

Este elemento químico forma parte de las nitratorreductasas, nitrogenasas y bacterias fijadoras de nitrógeno. En combinación con el boro, es necesario para la conservación de la actividad meristemática. Está involucrado en la síntesis de bases nitrogenadas, particularmente del uracilo y adenina, aumentando los niveles de citocininas y ácidos nucleicos (Alcantara, J. et. al. 2019).

3.7. Componentes orgánicos del medio de cultivo

Entre los elementos orgánicos aplicados a los medios de cultivo se encuentran los siguientes: carbohidratos, vitaminas, aminoácidos, extractos naturales y reguladores del crecimiento vegetal (Puche, F. 2012).

3.7.1. Carbohidratos

La nutrición que se desarrolla bajo condiciones in vitro, a partir de los diferentes órganos y tejidos, son altamente heterótrofos con respecto al carbono por motivo de la poca o nula asimilación clorofílica. Entonces, se necesita agregar azúcares a los medios de cultivo a manera de provisión de energía y reguladores osmóticos. El tipo de azúcar empleado con frecuencia es la sacarosa, siguiendo en importancia las siguientes: glucosa, maltosa, rafinosa, fructosa y galactosa, entre otros (Castillo, A. 2004).

3.7.2. Vitaminas

Son necesarias en pequeñas cantidades para concretar una sucesión de reacciones catalíticas en el metabolismo. Entre las más empleadas se encuentran la tiamina (vitamina B1), que se agrega en la forma de hidrocloreuro de tiamina, constituyendo una vitamina básica para el desarrollo de células vegetales. Así mismo, es una coenzima de la descarboxilación de los cetoácidos piruvato y cetoglutarato y es fundamental para el crecimiento radical pues interviene en la elaboración de citocininas (Puche, F. 2012).

3.7.3. Ácido nicotínico

Es parte de las coenzimas nicotinamida adenina dinucleótido (NAD) y nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADP), las cuales actúan en la transmisión de hidrógeno. Aparte de ser precursor el triptófano, y, en consecuencia, tiene un efecto sinérgico con la creación de raíces y despliega la inhibición en el desarrollo de yemas axilares (Alcantara, J. et. al. 2019).

3.7.4. Piridoxina (Vitamina B6)

Se la agrega en la forma de hidrocloreuro de piridoxina (Piridoxina-HCl), participando como coenzima en el proceso metabólico de los aminoácidos, tales como el triptófano, precursor de AIA y ácido nicotínico; también favorece en la formación de raíces. (Puche, F. 2012).

3.7.5. Myo-inositol

Este elemento en realidad se trata de un azúcar-alcohol, el mismo que tiene un efecto sobre la multiplicación de tejidos y la aceleración de la organogénesis (Alcantara, J. et. al. 2019).

3.7.6. Ácido ascórbico y ácido cítrico

Su aplicación en los medios de cultivo es de manera ocasional como elementos antioxidantes para evitar el oscurecimiento de determinados tejidos. (Puche, F. 2012).

3.8. Reguladores de crecimiento

Conocidos también como hormonas, se las define como agregados naturales con la propiedad de moderar procesos fisiológicos en densidades muy bajas comparadas con los nutrientes y vitaminas; sin embargo, en dosis muy altas los afectarían significativamente. Los reguladores vegetales son compuestos sintetizados químicamente u obtenidos de otros organismos y son, en general, mucho más potentes que los análogos naturales. (Alcantara, J. et. al. 2019).

3.8.1. Auxinas

Son un tipo de fitohormonas especializadas en diferentes procesos a nivel vegetal. Los principales puntos de acción se encuentran a nivel celular, donde tienen la capacidad de dirigir e intervenir en los procesos de división, elongación y diferenciación celular, tratándose de auxinas sintéticas el AIB y el ANA. Se sintetizan a partir del L-triptófano en los primordios de hoja, hojas jóvenes y semillas en desarrollo. Las funciones de las auxinas son las siguientes: intervención en los tiempos S y G1 del ciclo celular; causando la duplicación del ADN, crecida de la extensibilidad de la pared celular, contribución en la diferenciación celular, estimulación de foto y gravitropismos, control de la abscisión, colaboración en el fenómeno de dominancia apical. (Azcón, T. et. al. 2019).

3.8.2. Citoquininas

Conocidas también como citocininas, corresponde a un grupo de fitohormonas responsables de la división y la diferenciación celular. El nombre se origina del término citocinesis que hace referencia al proceso de división celular. Estos compuestos son principales en el proceso de organogénesis vegetal y en el control de diversos procesos fisiológicos en los vegetales, tales como la fotosíntesis, la regulación del crecimiento o dominancia apical, senescencia, apoptosis vegetal o muerte programada, inmunidad vegetal, y, tolerancia y defensa ante herbívoros. (Melgarejo, L. 2010).

3.8.3. Giberelinas

Las Giberelinas (GAs) son compuestos naturales que actúan como reguladores endógenos esenciales del crecimiento y el desarrollo en los vegetales superiores. Los efectos más evidentes se observan en la estimulación del crecimiento del tallo, la inducción del desarrollo del fruto y la germinación de las semillas. Estas fitohormonas parcialmente son responsables de la división celular, la elongación del tallo y de otros tejidos. El descubrimiento de estos compuestos se dio a partir de investigaciones realizadas por japoneses respecto a una enfermedad que afectaba los cultivos de arroz. La enfermedad en cuestión provocaba que las plántulas recién germinadas obtenían una coloración amarilla y originaba una gran elongación del

tallos, conllevando a la caída y muerte del vegetal. A partir de esta experiencia, se han separado y descubierto varias clases de giberelinas, identificándolas con un número conforme se van descubriendo; de tal manera que se encuentran disponibles la GA1, GA2, GA3 y así sucesivamente. La denominación del GA3 es el ácido giberélico. (Cerezo, J. 2016).

3.8.3.1. Aplicación de las giberelinas

Comercialmente, se encuentra disponible el ácido giberélico o GA3, obtenida mediante la fermentación de los extractos del hongo giberella. Se emplea en el proceso agrícola de uva sin semillas y en la de manzanas, con el fin de incrementar el tamaño y la calidad de estas especies. Otra de sus utilidades conocidas, se encuentran en los cítricos autoincompatibles, cuyo efecto es el aumento en el cuajado del fruto. En términos generales, las giberelinas tienen la capacidad de estimular el cuajado de especies vegetales que contienen una cantidad limitada de óvulos tales como el melocotón, el albaricoque o la cereza. Mientras que en los cítricos, el cambio de coloración de verde a naranja se retarda con GA's, y al mismo tiempo, se previene de diversas alteraciones de la corteza. (Melgarejo, L. 2010).

3.8.3.2. Ácido absisico

Esta hormona se encuentra relacionada de manera directa en los ciclos de senescencia y abscisión de hojas, flores y frutos, al igual que en la latencia de ciertas semillas, de la misma manera que el etileno, esta fitohormona provoca la manifestación de genes de resistencia a varios tipos de estrés. (Loreto, C. 2018).

3.8.3.3. Etileno

El etileno (C₂H₄.PM: 28) es una hormona gaseosa que es sintetizada por todos los órganos de la planta, incluidas las regiones meristemáticas. La producción de etileno aumenta durante la abscisión de la hoja y la senescencia floral, así como durante la maduración del fruto. Cualquier tipo de herida puede también inducir la biosíntesis de etileno, así como cualquier estrés por encharcamiento, congelación, infección, calor o déficit hídrico. (Luján, S. et. al. 2016).

IV. MARCO METODOLÓGICO

4.1. Materiales

4.1.1. Localización de la investigación

Tabla 1: Localización de la investigación

Provincia:	Bolívar
Cantón:	Guaranda
Parroquia:	Veintimilla
Sitio:	Laguacoto II
Dirección:	Km. 1.5 Vía Guaranda – San Simón

4.1.2. Situación climática y geográfica

En la tabla 2, se detalla acerca de la situación climática y geográfica del sitio en donde se realizó la investigación

Tabla 2: Características del sitio de investigación

Características	Valores
Localidad	Laguacoto II
Altitud	2622 msnm
Latitud	01° 36' 88'' S
Longitud	78° 59' 88'' W
Temperatura media anual	14,5°C
Temperatura máxima	23°C
Temperatura mínima	2°C
Precipitación media anual	880 mm
Heliofanía	850(h/l) año
Humedad relativa	70%

Fuente: Estación meteorológica Laguacoto II y GPS In Situ, Guaranda 2018

4.1.3. Zona de vida

La localidad en estudio conforme a las zonas de vida de Holdrige, corresponden al bosque seco montano bajo (bs – MB). (Andaluz, 2016).

4.1.4. Material experimental

Embriones maduros de dos variedades de cacao y tres dosis de ácido giberélico.

4.1.5. Materiales de campo

Embriones maduros, dos variedades de Cacao

- Cacao fino de Aroma Nacional
- Cacao Clonal CCN51

4.1.6. Materiales de laboratorio

- Ácido giberélico
- Agitador magnético
- Auto clave
- Balanza analítica
- Cajas petrel
- Cámara de flujo laminar
- Cubre cabello
- Destilador de agua
- Erlenmeyer
- Guantes
- Frascos
- Mandil
- Mascarilla
- Mecheros
- Microondas
- pH metro
- Pinzas
- Pipeta
- Pizetas
- Probetas de 25 - 100 - 500 ml
- Refrigerador
- Vaso de precipitación

4.1.7. Materiales de oficina

- Calculadora
- Computadora con sus respectivos accesorios
- Lápices
- Flash memory
- Papel boom
- Regla

4.2. Métodos

4.2.1. Factores en estudio

- **Factor A:** Variedades de Cacao.

A1= Cacao Nacional

A2= Cacao CCN51

- **Factor B:** Dosis de ácido giberélico.

B1= 2 mg/l

B2= 4 mg/l

B3= 6 mg/l

4.2.2. Tratamientos

Para el presente proyecto, se utilizó las siguientes combinaciones de los factores

AxB: 2x3x3 repeticiones:

Tabla 3: Tratamientos aplicados en la investigación

# T.	CÓDIGO	DETALLE
T1	A1B1	Cacao Nacional + 2 mg/l de Ácido Giberélico
T2	A1B2	Cacao Nacional + 4 mg/l de Ácido Giberélico
T3	A1B3	Cacao Nacional + 6 mg/l de Ácido Giberélico
T4	A2B1	Cacao CCN51 + 2 mg/l de Ácido Giberélico
T5	A2B2	Cacao CCN51 + 4 mg/l de Ácido Giberélico
T6	A2B3	Cacao CCN51 + 6 mg/l de Ácido Giberélico

Elaborado por: Autor

4.2.3. Tipo de diseño

Bloques Completas al Azar (DBCA). Factorial de 2x3x3.

4.2.4. Procedimiento

- Número de tratamientos: 6
- Número de repeticiones: 3
- Número de unidades experimentales: 18
- Número de embrión por unidad experimental: 2
- Número total de embriones: 36

4.2.5. Tipo de análisis

- Análisis de varianza (ADEVA):

Tabla 4: ADEVA aplicado en la investigación

Fuentes de variación	Grados de libertad	CME*
Bloq (r-1)	2	$f^2e+15 f^2$ bloques
FA Variedades (a-1)	1	f^2e 9 Θ^2 A
FB Acido giberélico (b-1)	2	f^2e 15 Θ^2 B
AxB (a-1) (b-1)	2	$f^2e+3 \Theta^2$ AxB
Error (axb-1) (r-1)	10	f^2e
Total (axb-r)-1	17	

*Cuadrados medios esperados modelo fijo tratamientos seleccionados por el investigador

Elaborado por: Autor

- Prueba de Tukey al 5% para factor A.
- Prueba de Tukey al 5% para comparar promedios de tratamiento y FB.

4.3. Métodos de evaluación y datos tomados

4.3.1. Días a la brotación (DB)

Variable que se registró contando los días desde la siembra de los embriones hasta cuando brotaron el 70% de ellos.

4.3.2. Porcentaje de semillas brotadas (%SB)

Esta variable se anotó a los 18 días luego de la siembra cuando brotaron los explantes en cada frasco.

4.3.3. Número de Frascos contaminados (NFC)

Dato que se registró mediante conteo directo a partir de las 48 horas después de la siembra, tomando en cuenta que no hubiese contaminación en todos los tratamientos.

4.3.4. Longitud del explante (LE)

Esta variable se midió en cm en tres explantes a los 45 y 60 días, con la ayuda de un flexómetro.

4.3.5. Días a transferir a un medio de multiplicación (DTMM)

Variable que se registró contando los días a partir de la siembra hasta cuando los explantes estuvieron óptimos para ser transferidos al medio de multiplicación en todos los tratamientos.

4.3.6. Días al medio de enraizamiento (DME)

Dato que se anotó contando los días desde la siembra hasta cuando los explantes obtuvieron tres raicillas en todos los tratamientos.

4.3.7. Días a la emisión de raíces (DER)

Variable que se registró a partir del periodo en que los explantes empezaron a presentar las primeras radículas hasta obtener un sistema radicular que les permitió absorber por sí solas los nutrientes.

4.3.8. Volumen de raíz (VR)

Dato que se tomó sumergiendo la raíz del explante en una probeta de 25 ml aforada con agua, y se calculó por diferencia de valores, su resultado fue expresado en ml, a los 85 días en el laboratorio.

4.3.9. Días a la transferencia a condiciones medio ambientales externas (DTCME)

Variable que se registró contando los días desde la siembra hasta cuando las plantas estuvieron listas para su transferencia a condiciones externas.

4.3.10. Porcentaje de mortalidad de las plantas al trasplante a condiciones externas (PMPTCE)

Se cuantifico en todos los tratamientos al trasplante por conteo directo en base al número de plantas trasplantadas y a la mortalidad de las mismas, se expresó en porcentaje.

4.3.11. Altura de la planta (AP)

Variable que se registró en 15 plantas con la ayuda de un flexómetro se midió en la base del tallo hasta el meristema terminal cuando la planta fue transferida a condiciones externas, los resultados fueron expresados en cm.

4.3.12. Longitud de las hojas (LH)

Dato que se evaluó en 15 plantas midiendo desde el punto de inserción de la hoja hasta el ápice con la ayuda de un flexómetro, los resultados fueron expresados en cm a los 160 días de su transferencia a condiciones externas.

4.3.13. Ancho de las hojas (AH)

Esta variable se midió en 15 plantas con la ayuda de un flexómetro en la parte media de la hoja, su resultado fue expresado en cm cuando las plantas fueron transferidas a condiciones externas.

4.3.14. Diámetro del tallo (DT)

Variable que se determinó en 15 plantas utilizando un calibrador de Vernier en la parte media del tallo, su resultado fue expresado en cm cuando la planta fue transferida a condiciones externas, a los 160 días.

4.3.15. Diámetro del peciolo (DP)

Esta variable se midió en 15 plantas con la ayuda de un calibrador de Vernier en la parte media del peciolo su resultado fue expresado en mm, cuando las plantas fueron transferidas a condiciones externas a los 60 días.

4.3.16. Número de entrenudos (NE)

Dato que se tomó en 15 plantas por conteo directo cuando las plántulas fueron transferidas a condiciones externas a los 60 días en el invernadero.

4.3.17. Longitud de entre nudos (LEN)

Variable que se midió con la ayuda de un flexómetro en 15 plantas, en la distancia entre dos nudos consecutivos y su respuesta fue expresada en cm a los 60 días en el invernadero.

4.4. Manejo del experimento

4.4.1. Selección de plantas

Las plantas fueron seleccionadas de acuerdo a las condiciones en las que se encontraron, ya que para esta investigación se necesitó plantas vigorosas y con un buen manejo fitosanitario en condiciones ambientales favorables para su desarrollo y formación de frutos.

4.4.2. Selección de mazorcas

Las mazorcas de cacao fueron seleccionadas por su color y tamaño, utilizando tijeras de podar, se realizó un corte desde la inserción de la mazorca y se depositaron en las gavetas para su posterior traslado al laboratorio.

4.4.3. Desinfección de las mazorcas

Las mazorcas de cacao fueron sumergidas en cloro al 100% durante 14 horas antes de ser llevadas hacia el laboratorio, para eliminar toda contaminación antes de su manejo en el proceso de multiplicación in vitro.

4.4.4. Elaboración del medio de cultivo

4.4.4.1. Selección del medio a utilizar

Se aplicó el medio de cultivo según Murashige y Skoog, en el que se añadió, macronutrientes, micronutrientes, vitaminas, agar y reguladores de crecimiento (ácido giberélico) en tres concentraciones 2 mg/l, 4mg/l y 6mg/l. con un pH de 5.6.

Tabla 5: Composición del medio de cultivo utilizado en la investigación

Constituyente Macro	Concentración de (g/l)	Volumen de la solución madre
NH ₄ N ₃	16,5	100ml
KN ₃	19	
CaCl ₂	4,4	
MgS ₄	3,7	
KH ₂ P ₄	1.7	
Microorganismo		
MnS ₄	1,69	10 ml
ZnS ₄ .	0,86	
H ₃ B ₃	0,62	
KI	0,083	
Na ₂ Mo ₄	0,025	
Fuente de Hierro		
FeS ₄	0.00556	10 ml
Na ₂ EDTA	0.00746	
Vitaminas		
Inositol	10	
Nicotínico	0,05	10 ml

Elaborado por: Autor

4.4.5. Preparación del agar para los embriones

Se colocó en un vaso de precipitación agua destilada en una tercera parte del volumen final a prepararse, pesando 30g de azúcar, 7g de agar y otros componentes en estado sólido, el azúcar se añadió en ese momento, mientras que el agar se dejó para el final y se añadió las soluciones madres, vitaminas y reguladores de crecimiento (ácido giberélico) en tres concentraciones 2, 4 y 6 mg/l., de cada solución se tomó cantidades exactas, de acuerdo a lo presentado en la tabla 6.

Tabla 6: Composición del agar utilizado en la investigación

SOLUCIONES CONCENTRADAS	cc/l
STOCK N.-1	100
S STOCK N.-2	10
S STOCK N.-3	10
VITAMINAS	10

Elaborado por: Autor

Se midieron las concentraciones de ácido giberélico al 2, 4 y 6 mg/l. utilizados y se procedió a diluir adecuadamente. Una vez disuelto, se añadió la solución, después se aforó el contenido utilizando agua destilada y se ajustó al volumen total. Luego se midió el pH de la solución y ajuste al pH deseado para los embriones de cacao en este caso de 5.6. Se procedió a calentar el medio preparado para luego añadir el agar en los frascos de vidrio.

4.4.6. Desinfección de la mazorca en el laboratorio

En la cámara de flujo laminar se introdujeron las mazorcas de cacao previamente desinfectadas en cloro, luego se realizó una última desinfección flameándola con el mechero para su posterior partición y obtención de semillas.

4.4.7. Preparación de los embriones a cada frasco

De inmediato se cortó la mazorca por la mitad utilizando una pinza y el bisturí previamente desinfectados, para proceder a la extracción de la semilla, las mismas que fueron puestas en una caja petri para comenzar el proceso de extracción del mucílago, utilizando la pinza para sostener la semilla y con el bisturí se fue removiendo con cuidado sin dañar el embrión.

Posteriormente fueron colocadas en los frascos que contenían el medio de cultivo en sus diferentes concentraciones de ácido giberélico al 2, 4 y 6 mg/l, luego se introdujo en la cama de incubación donde recibió 16 horas luz.

4.5. Preparación de las plántulas de cacao obtenidas in vitro a condiciones medioambientales externas

En esta última etapa del proyecto de investigación, las plántulas obtenidas in vitro comenzaron a reducir gradualmente la humedad relativa en los mini invernaderos en frascos plásticos con sustrato previamente esterilizado, que permitió el cierre estomático y una mejor formación de la cutícula disminuyendo la pérdida de agua.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Variables agronómicas para el factor A: Variedad

Tabla 7. Resultados de la prueba de Tukey al 5% en el factor A: Variedades de cacao: A1: Cacao Nacional, A2: Cacao CCN51

PROMEDIOS				
Factor A: Variedad de Cacao				
Variables	A1: Cacao Nacional	A2: Cacao CCN51	Media general	CV%
Fase de laboratorio				
DB (**)	A1	A2	17.28 \cong 17 días	3.87
	17.67A	16.88 B		
PSB	A1	A2	100.00%	0.00
	100.00	100.00		
NFC	A1	A2	0 frascos	0.00
	0	0		
LE45 (**)	A1	A2	9.84 cm	19.56
	8.63 B	11.05 A		
LE60 (NS)	A1	A2	11.92 cm	17.45
	11.02 A	12.82 A		
DTMM	A1	A2	45 días	0.00
	45	45		
Fase de campo				
DME	A1	A2	120 días	0.00
	120	120		
DER	A1	A2	155 días	0.00
	155	155		
VR (NS)	A1	A2	2.17 ml	12.98
	2.09 A	2.26 A		
DTMCE	A1	A2	180 días	0.00
	180	180		
PMPTCE	A1	A2	0.00%	0.00
	0	0		
AP (**)	A1	A2	20.57 cm	12.48
	18.22 B	22.23 A		
NH (**)	A1	A2	5.49	17.49
	4.79 B	5.98 A		
LH (**)	A1	A2	9.03 cm	28.62
	7.19 B	10.34 A		

PROMEDIOS				
Factor A: Variedad de Cacao				
Variables	A1: Cacao Nacional	A2: Cacao CCN51	Media general	CV%
(Continúa)				
AH (**)	A1	A2	5.71 cm	27.78
	4.22 B	6.76 A		
DT (**)	A1	A2	4.05 cm	2.81
	4.00 B	4.09 A		
DP (**)	A1	A2	1.16 mm	8.20
	1.07 B	1.22 A		
NEN	A1	A2	3.00	0.00
	3.00	3.00		
LEN (**)	A1	A2	6.80 cm	13.16
	6.00 B	7.38 A		

Fuente: Investigación en el laboratorio y en el campo 2018.

Elaborado por: Autor

Como se puede notar en la tabla 6, en la cual se presentaran los resultados de la prueba Tukey considerando el factor A, tuvieron diferencias altamente significativas en las variables: días a la brotación (DB), longitud del explante a los 45 días (LE45), altura de planta (AP), número de hojas (NH), longitud de la hoja (LH), ancho de la hoja (AH), diámetro del tallo (DT), diámetro del pecíolo (DP), y, longitud de entrenudos (LEN).

En tanto que en las siguientes variables se obtuvieron diferencias no significativas: longitud del explante a los 60 días (LE60) y volumen de raíz (VR).

Es importante mencionar que las siguientes variables no se lograron realizar la prueba estadística de Tukey por tener exactamente el mismo promedio en ambas variedades: porcentaje de semillas brotadas (PSB), número de frascos contaminados (NFC), días a transferir a un medio de multiplicación (DTMM), días al medio de enraizamiento (DME), días a la emisión de raíces (DER), días a la transferencia a condiciones medioambientales externas (DTCME), porcentaje de mortalidad de las plantas al trasplante a condiciones externas (PMPTCE) y número

de entrenados (NEN). En consecuencia, se concluye que el factor variedad es independiente respecto a las variables anteriormente mencionadas.

5.1.1. Variables registradas en la fase de laboratorio

En esta sección, se presentaron los resultados de las pruebas estadísticas realizadas a las variables registradas en la fase de laboratorio para las dos variedades de cacao: nacional y CCN51. Para este análisis estadístico, se toma en cuenta únicamente a las variables que obtuvieron diferencias de mayor o menor significancia en las pruebas de Tukey.

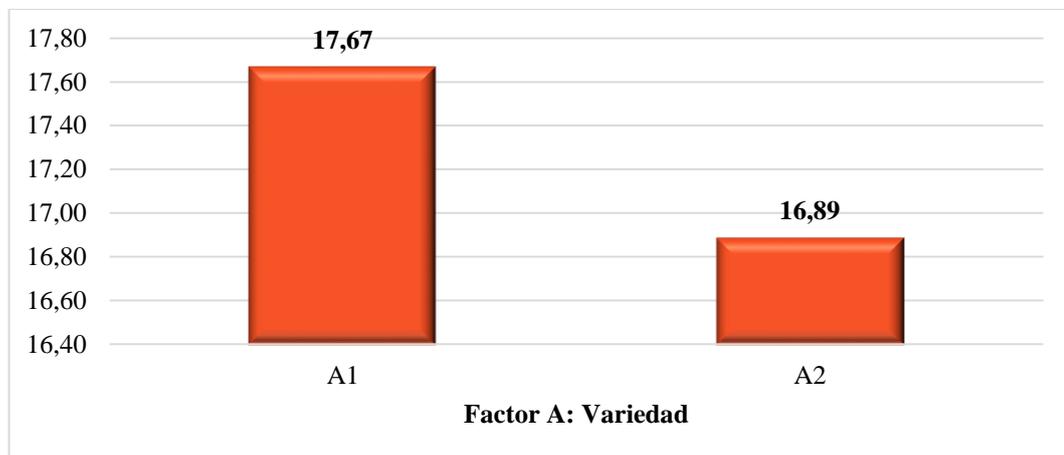


Figura 1: Días a la brotación por variedad (**)

Fuente: Datos del estudio
Elaborado por: Autor

En la figura 1, de acuerdo con la prueba de Tukey al 5% la respuesta fue la existencia de una diferencia significativa, es decir, la variedad A2 (CCN51) tuvo un menor tiempo de brotación con una media de 16.89 días comparado a los 17.67 días que demora la brotación en la variedad A1 (Nacional). En consecuencia, las variedades fueron factores dependientes en esta variable; de igual manera se concluye que las semillas de la variedad A2 tuvo un menor tiempo de brotación, si se compara con las semillas de la variedad A1.

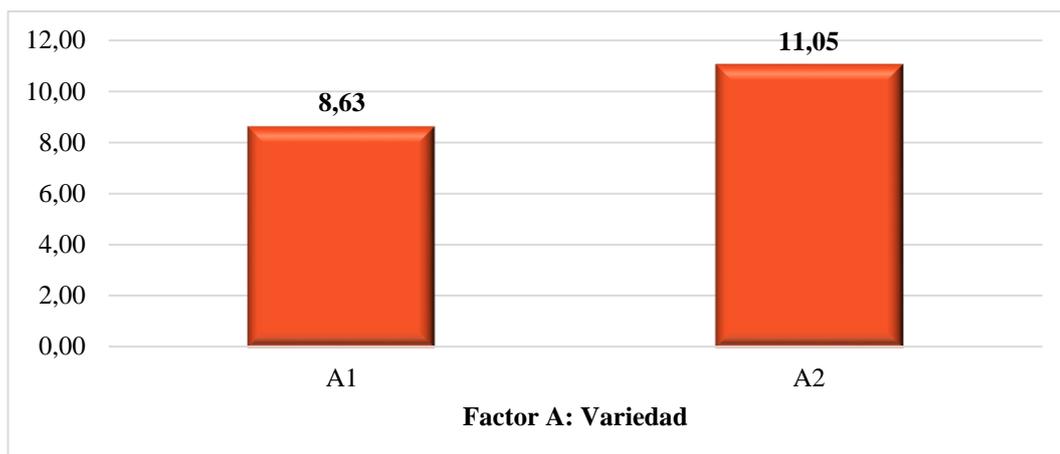


Figura 2: Longitud de explante a los 45 días por variedad (**)

Fuente: Datos del estudio

Elaborado por: Autor

Acerca de la longitud del explante luego de 45 días, en la prueba Tukey al 5% obtuvo como respuesta que existe una diferencia altamente significativa entre las variedades A1 y A2 (ver Figura 2).

Esto es, que los explantes de la variedad A2 alcanzaron en promedio una altura promedio de 11.05 cm; a diferencia de la variedad A1, cuyos explantes en promedio alcanzaron los 8.63 cm. Los resultados presentados demuestran por lo tanto que, las variedades fueron factores dependientes a la variable presentada en este apartado y depende de la interacción genotipo ambiente.

Respecto a la longitud de los explantes a los 60 días, el resultado de la prueba Tukey al 5% demuestra que no existe una diferencia altamente significativa entre las variedades estudiadas, como lo muestra la figura 3.

Es decir, que los explantes de la variedad A2 alcanzaron en promedio una altura de 12.82 cm a diferencia de la variedad A1, cuyos explantes en promedio alcanzaron los 11.02 cm. Los resultados demuestran por lo tanto que, las variedades fueron factores dependientes a la variable longitud del explante y principalmente a que cada órgano, tejido o célula es diferente en ambas variedades.

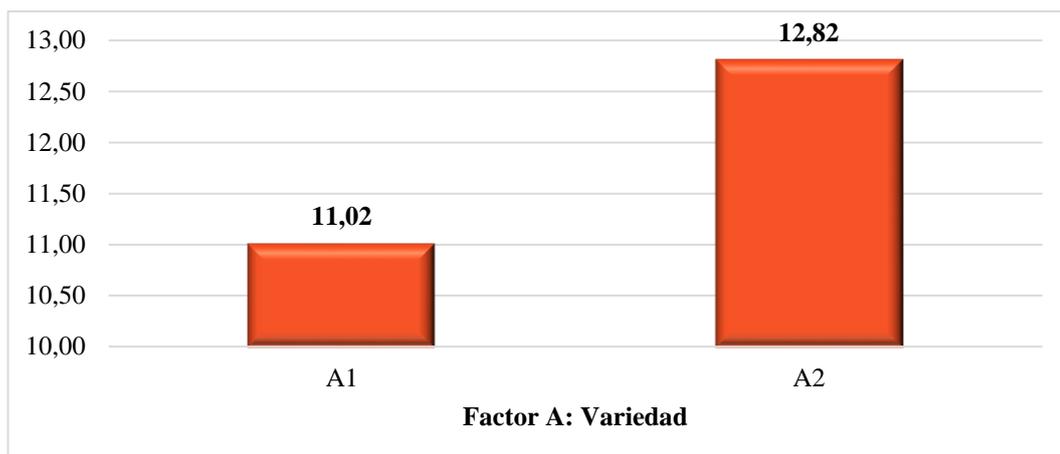


Figura 3: Longitud de explante a los 60 días por variedad (NS)

Fuente: Datos del estudio

Elaborado por: Autor

5.1.2. Variables registradas en la fase de campo

A continuación, se presentarán los resultados de las pruebas estadísticas realizadas a las variables registradas en campo en la fase de campo para las dos variedades de cacao nacional y CCN51.

Para ello se toma en cuenta únicamente a las variables que obtuvieron diferencias con mayor o menor significancia en las pruebas de Tukey.

En primer lugar, se analizó la variable volumen de raíz (figura 4), en la cual se ratifica la existencia de una diferencia no significativa entre las variedades objeto de estudio según lo obtenido en la prueba de Tukey al 5%.

La variedad con mayor volumen de raíz corresponde a la A2 que en promedio fue de 2.26 ml, comparado con la variedad A1 cuyo promedio fue de 2.09 ml.

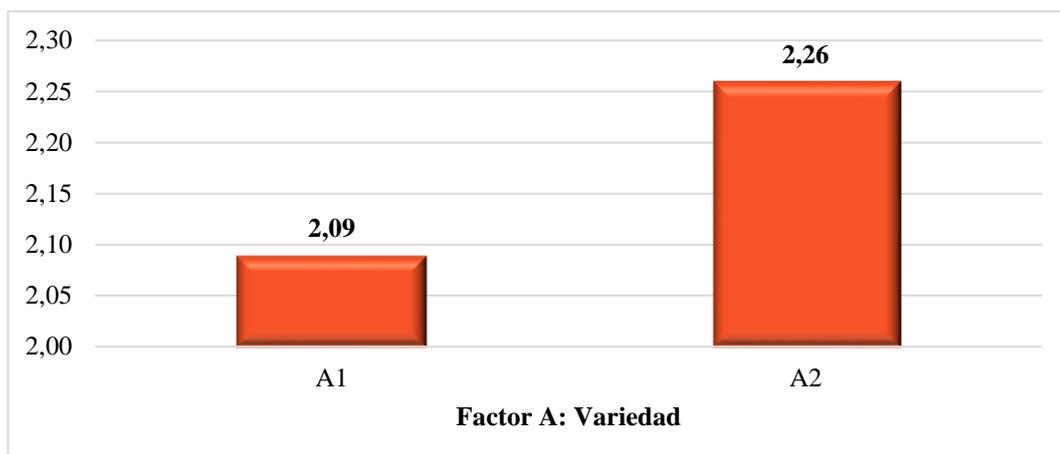


Figura 4: *Volumen de raíz por variedad (NS)*

Fuente: Datos del estudio
Elaborado por: Autor

Por lo tanto, se evidencia el hecho que las variedades fueron factores dependientes en el volumen de la raíz de los explantes objeto de estudio, y, aunque exista una mínima diferencia en los promedios alcanzados en ambas variedades, se evidencia que la variedad A2 tuvo un mayor volumen de raíz comparada a la variedad A1.

Respecto a la variable altura de planta, como se observa en la figura 5, la variedad A2 logró una altura promedio de 22.23 cm, es decir, 4.01 cm más alto que el promedio de las plantas de la variedad A1 (18.22 cm).

Así mismo, es importante mencionar que el promedio general de la variable altura basado en los resultados de la investigación de campo para ambas variedades fue de 20.57 cm, y, se obtuvo un coeficiente de variación del 12.48%.

Según la prueba de Tukey al 5% aplicado para esta variable, se evidencia la existencia de una diferencia altamente significativa entre estas variedades. Por tanto, se concluye que la altura de la planta depende del factor variedad de cacao a sus características genéticas y su interacción genotipo ambiente.

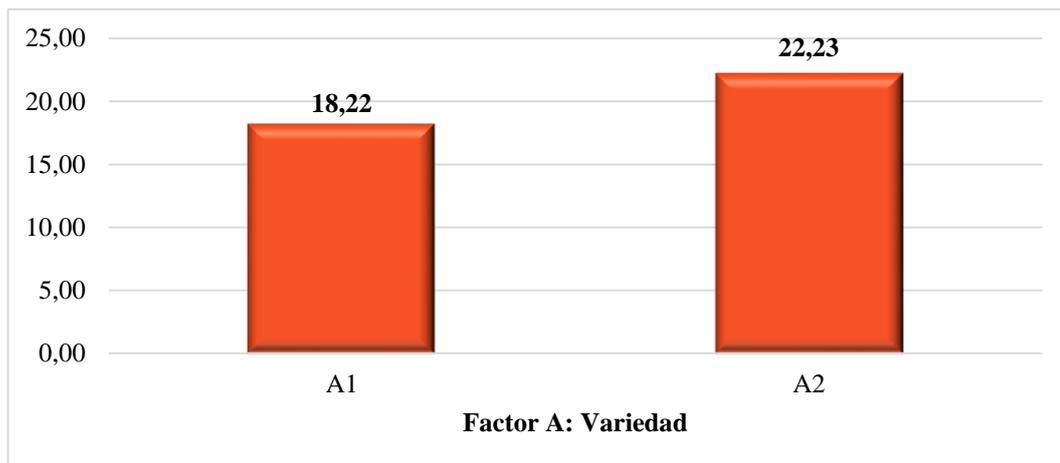


Figura 5: *Altura de la planta por variedad (**)*

Fuente: Datos del estudio
Elaborado por: Autor

Sobre la variable número de hojas, la figura 6 muestra que las plantas cultivadas en la variedad A1 en promedio tiene 4.79 hojas, mientras que las plantas cultivadas en la variedad A2 posee en promedio de 5.98 hojas. Esto implica que la variedad A2 posee mayor cantidad de hojas comparada a la variedad A1.

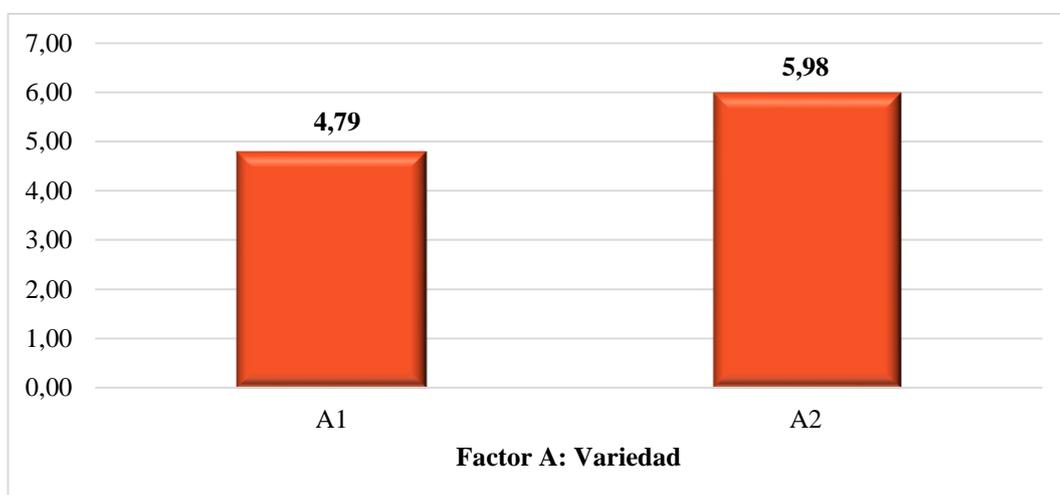


Figura 6: *Número de hojas por variedad (**)*

Fuente: Datos del estudio
Elaborado por: Autor

Una vez realizada la prueba de Tukey al 5%, se demuestra la existencia de diferencias altamente significativas entre ambas variedades y, por tanto, se

concluye que las variedades fueron factores dependientes con relación a la variable número de hojas de las plantas objeto de estudio.

Como lo muestra la figura 7, los resultados obtenidos para la variable longitud de hoja, el promedio obtenido para la variedad A1 la longitud de hojas fue de 7.19 cm, es decir, un 44% menor al promedio obtenido para las hojas de la variedad A2 de 10.34 cm. Esto significa que, la variedad CCN51 tiene hojas más largas en comparación a la variedad nacional.

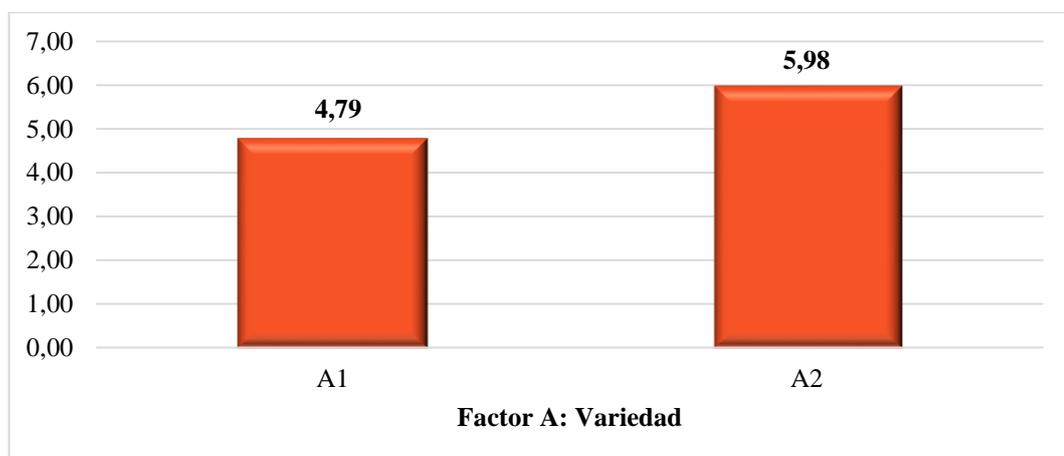


Figura 7: Longitud de hoja por variedad (**)

Fuente: Datos del estudio

Elaborado por: Autor

Una vez realizada la prueba de Tukey al 5%, se evidenció la existencia de diferencias significativas entre las variedades estudiadas. Se concluye que la variable longitud de hojas dependió de la capacidad genética de cada variedad.

Respecto a la variable ancho de hoja (ver figura 8), se muestra que la variedad cacao nacional (A1) alcanzó en promedio un ancho de 4.22 cm, a diferencia de la variedad clonal (A2) que alcanzó los 6.76 cm en promedio.

Lo anteriormente presentado significa que, la variedad de cacao clonal CCN51 tiene hojas en un 60% más ancha en comparación al cacao nacional. Lo cual ratifica la

diferencia significativa en los promedios obtenidos para esta variable mediante la prueba de Tukey al 5%, concluyéndose que la variable ancho de la hoja depende del factor variedad.

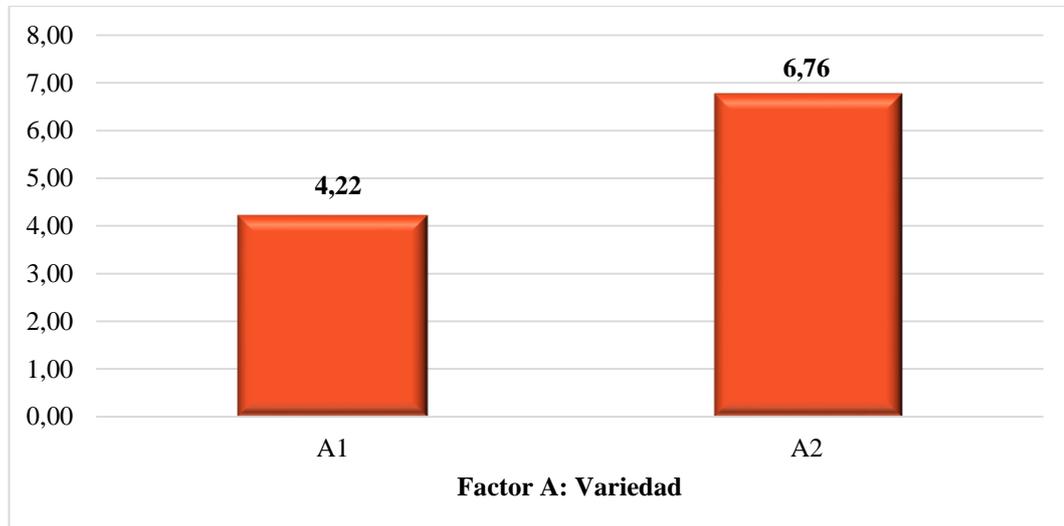


Figura 8: Ancho de hoja por variedad (**)

Fuente: Datos del estudio

Elaborado por: Autor

Sobre la variable diámetro de tallo, como se observa en la figura 9, entre las variedades A1 y A2 cuentan con una diferencia mínimamente significativa.

Es decir, en promedio la variedad A1 alcanzó 4 cm de diámetro del tallo; mientras que la variedad A2 que en promedio tiene un diámetro de 4.09 cm. Es importante mencionar que, el promedio general de la muestra tomada fue de 4.05 cm con un coeficiente de variación de 2.81%.

Al aplicarse la prueba de Tukey al 5% se concluye la existencia de diferencias significativas, aunque en menor grado entre los promedios obtenidos en ambas variedades y por tanto la variable el diámetro de tallo depende del factor variedad y de la interacción genotipo ambiente.

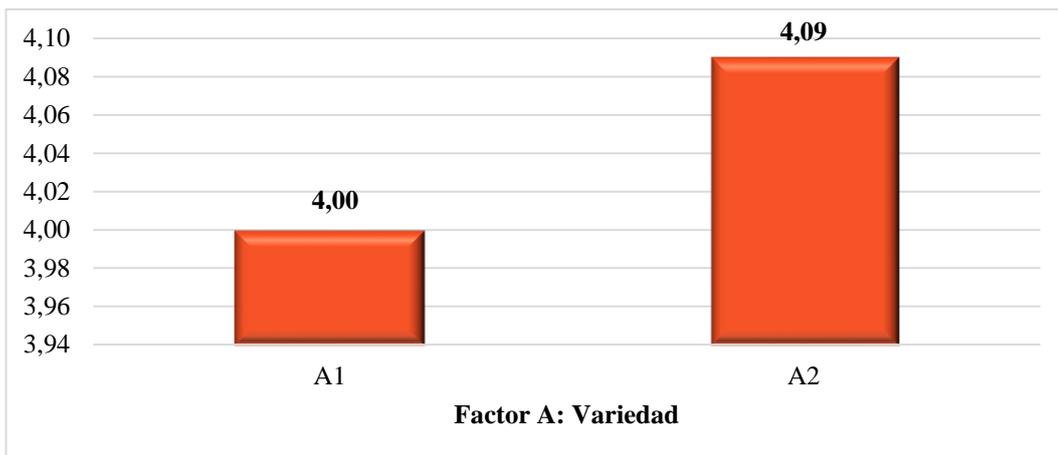


Figura 9: *Diámetro de tallo por variedad (**)*

Fuente: Datos del estudio
Elaborado por: Autor

A continuación, la figura 10 muestra los resultados obtenidos para la variable diámetro de peciolo. En la variedad A1 en promedio el peciolo alcanzó 1.07 cm, mientras que en la variedad A2 el peciolo alcanzó en promedio 1.22 cm. Esto implica que, la variedad A2 posee un 14% más en diámetro de peciolo comparada con la variedad A1.

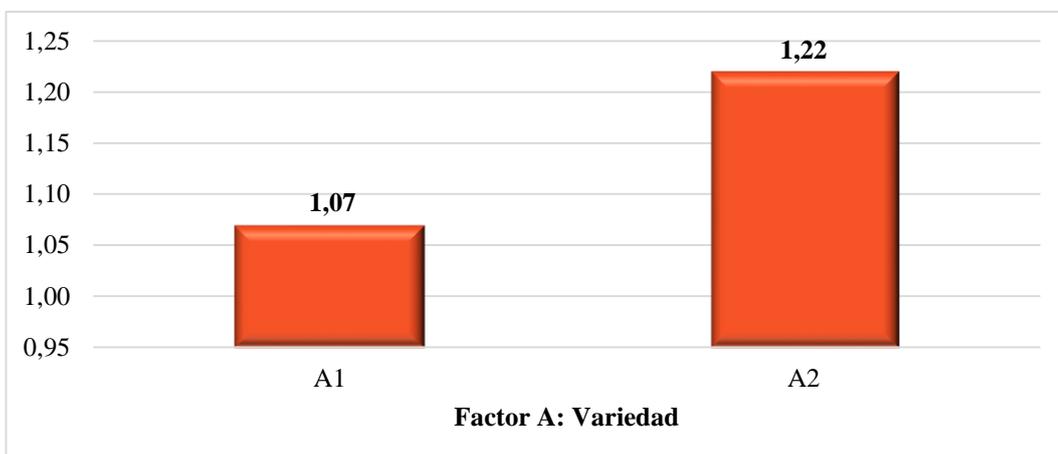


Figura 10: *Diámetro de peciolo por variedad (**)*

Fuente: Datos del estudio
Elaborado por: Autor

Una vez aplicada la prueba de Tukey al 5%, se demuestra la existencia de diferencias significativas en el promedio de los diámetros de peciolos entre ambas

variedades; concluyendo de esta manera que la variable diámetro de peciolo depende del factor variedad de la planta de cacao.

Finalmente, respecto a la variable longitud de entrenudos, la figura 11 expone que la variedad A1 obtuvo un promedio menor a la variedad A2, esto es, de 6 cm y 7.38 cm respectivamente. Esto implica que los entrenudos de la variedad clonal (A2) tienen un 23% más de longitud respecto a la variedad nacional (A1).

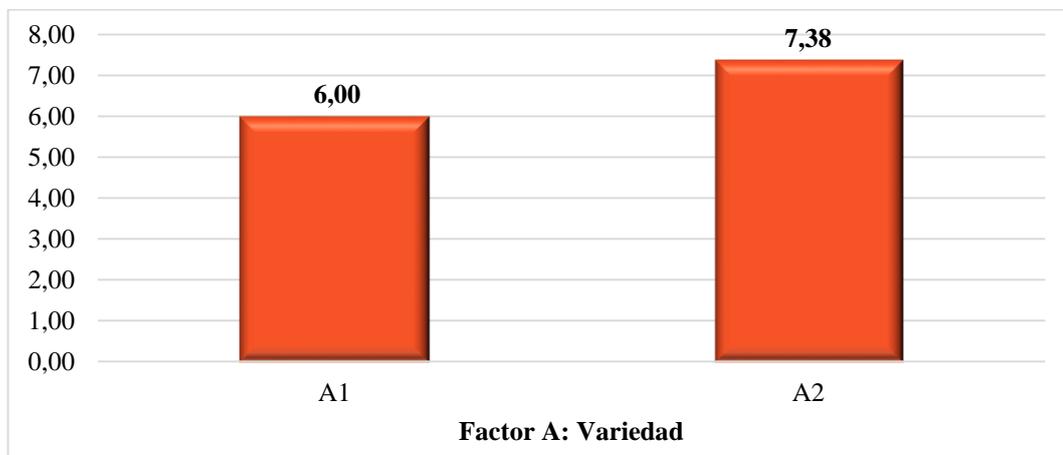


Figura 11: Longitud de entrenudos por variedad (**)

Fuente: Datos del estudio

Elaborado por: Autor

Al aplicarse la prueba de Tukey al 5%, se demuestra la existencia de diferencias significativas entre estas variedades concluyendo de esta manera que la longitud de entrenudos en las plantas de cacao depende de la capacidad genética de cada variedad.

5.2. Variables agronómicas para el factor B: Dosis de ácido giberélico

Tabla 8: Resultados de la prueba de Tukey al 5% en el factor B: Dosis de ácido giberélico: B1:2 mg, B2:4 mg, B3:6 mg

PROMEDIOS					
Factor B: Dosis de ácido giberélico					
Variabes	B1: 2 mg	B2: 4 mg	B3: 6 mg	Media general	CV%
Fase de laboratorio					
DB (**)	B1	B2	B3	17.28 \cong 17 días	3.87
	17.67 A	17.50 A	16.67 B		
PSB	B1	B2	B3	100.00%	0.00
	100	100	100		
NFC	B1	B2	B3	0 frascos	0.00
	0	0	0		
LE45 (NS)	B1	B2	B3	9.84 cm	19.56
	9.13 A	9.34 A	11.05 A		
LE60 (NS)	B1	B2	B3	11.92 cm	17.45
	10.98 A	11.33 A	13.45 A		
DTMM	B1	B2	B3	45 días	0.00
	45	45	45		
Fase de campo					
DME	B1	B2	B3	120 días	0.00
	120	120	120		
DMR	B1	B2	B3	155 días	0.00
	155	155	155		
VR (NS)	B1	B2	B3	2.17 ml	12.98
	2.23 A	2.03 A	2.27 A		
DTMCE	B1	B2	B3	180 días	0.00
	180	180	180		
PMPTCE	B1	B2	B3	0.00%	0.00
	0	0	0		
AP (**)	B1	B2	B3	20.57 cm	12.48
	19.25 B	20.13 B	22.11 A		
NH (**)	B1	B2	B3	5.49	17.49
	5.14 B	5.38 AB	5.88 A		
LH (**)	B1	B2	B3	9.03 cm	28.62
	7.10 C	9.06 B	10.64 A		
AH (**)	B1	B2	B3	5.71 cm	27.78
	4.97 B	5.57 AB	6.46 A		
DT (**)	B1	B2	B3	4.05 cm	2.81
	4.00 B	4.00 B	4.15 A		
DP (**)	B1	B2	B3	1.16 mm	8.20
	1.13 B	1.14 B	1.21 A		

PROMEDIOS					
Factor B: Dosis de ácido giberélico					
VARIABLES	B1: 2 mg	B2: 4 mg	B3: 6 mg	Media general	CV%
NEN	B1	B2	B3	3.00	0.00
	3.00	3.00	3.00		
LEN (**)	B1	B2	B3	6.80 cm	13.16
	6.40 B	6.62 B	7.32 A		

Fuente: Investigación en el laboratorio y en el campo 2018.

Elaborado por: Autor

Como se puede notar en la tabla 7, en la cual se presentan los resultados de la prueba Tukey considerando el factor B, tuvieron diferencias altamente significativas en las variables: días a la brotación (DB), altura de planta (AP), número de hojas (NH), longitud de la hoja (LH), ancho de la hoja (AH), diámetro del tallo (DT), diámetro del pecíolo (DP), y, longitud de entrenudos (LEN).

En tanto que en las siguientes variables se obtuvieron diferencias no significativas: longitud del explante a los 45 días (LE45), longitud del explante a los 60 días (LE60) y volumen de raíz (VR).

Se debe recalcar que las siguientes variables no se lograron realizar la prueba estadística de Tukey por tener exactamente el mismo promedio en los tres tipos de dosis de ácido giberélico aplicados para el presente proyecto: porcentaje de semillas brotadas (PSB), número de frascos contaminados (NFC), días a transferir a un medio de multiplicación (DTMM), días al medio de enraizamiento (DME), días a la emisión de raíces (DER), días a la transferencia a condiciones medioambientales externas (DTCME), porcentaje de mortalidad de las plantas al trasplante a condiciones externas (PMPTCE), y, número de entrenudos (NEN). Por tanto, al existir esta clase de resultados, se interpreta que el factor B (dosis de ácido giberélico) es independiente respecto a las variables anteriormente mencionadas.

5.2.1. Variables registradas en la fase de laboratorio

A continuación, se muestran los resultados de la aplicación de las diversas dosis de ácido giberélico presentados en apartados anteriores durante la fase de laboratorio. Es preciso recordar que, solamente se tratarán las variables en donde se obtuvo diferencias significativas entre cada tipo de dosis en esta fase de experimentación.

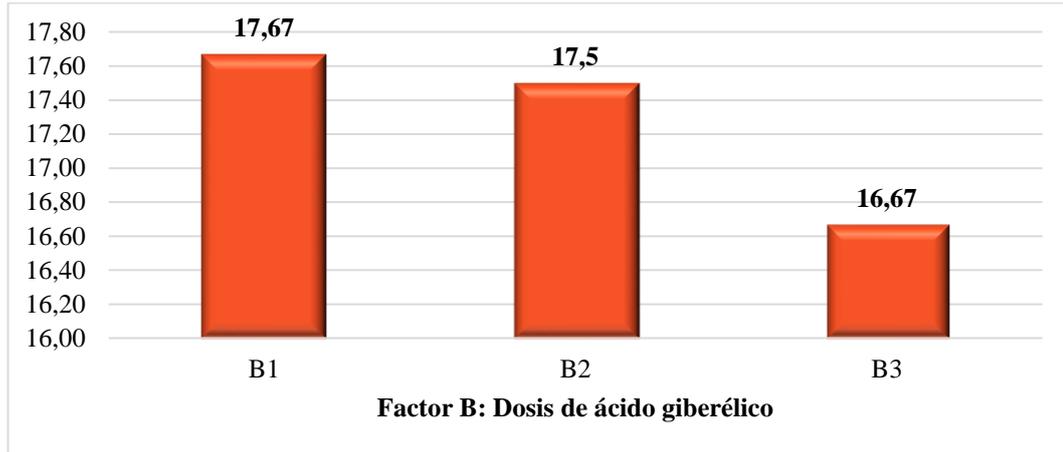


Figura 12: Días a la brotación por dosis de ácido giberélico (**)

Fuente: Datos del estudio

Elaborado por: Autor

Con respecto a los días de brotación, como lo muestra la figura 12, al aplicarse la dosis B1 en las semillas de cacao tuvieron un tiempo promedio de brotación de 17.67 días. Mientras que el resultado de la aplicación de la dosis B2, fue de un tiempo promedio de 17.50 días. Al final el promedio obtenido para la dosis B3 fue de 16.67 días.

Por lo tanto, se observa que al aplicarse la dosis B3, es decir, 6 gramos de ácido giberélico se obtuvo menor tiempo de brotación de la semilla comparado con otras dosis experimentadas.

Al aplicarse la prueba de Tukey al 5%, se confirma la existencia de diferencias significativas en los tiempos promedios de brotación según la dosis aplicada. Por lo tanto, se concluye que los días de brotación dependen de la dosis de ácido giberélico aplicado a las semillas de cacao y a su interacción genotipo ambiente.

La figura 13 muestra los resultados para la variable longitud del explante los 45 días, en la cual se evidencian diferencias altamente significativas entre los tipos de dosis aplicados las plantas de cacao. Luego de aplicarse la dosis B1 a los 45 días los explantes presentaron una longitud de 9.13 cm, mientras que, con la aplicación de la dosis B2 tuvieron una longitud de 9.34 cm; y, finalmente al aplicarse la dosis B3 los explantes alcanzaron una longitud de 11.05 cm.

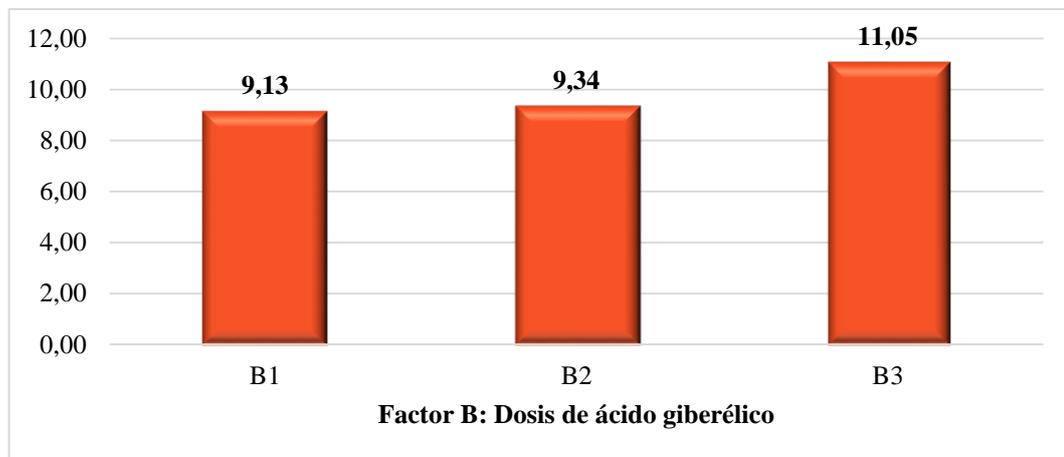


Figura 13: Longitud explante 45 días por dosis de ácido giberélico (NS)

Fuente: Datos del estudio

Elaborado por: Autor

Mediante la aplicación de la prueba de Tukey al 5% se demuestra la existencia de diferencias no significativas entre las dosis aplicadas. En consecuencia, se concluye que la variable longitud del explante a los 45 días es dependiente al factor dosis de ácido giberélico y a las características genéticas de cada variedad.

En cambio, si se analiza la longitud del explante a los 60 días (figura 14), se muestra que al aplicarse la dosis B1 el explante tuvo una longitud de 10.98 cm en promedio. A continuación, el resultado de aplicarse la dosis B2 fue que los explantes en promedio alcanzaron una longitud de 11.33 cm. Finalmente, con la aplicación de dosis B3, los explantes alcanzaron una longitud promedio de 13.46 cm.

La prueba de Tukey al 5% reveló la existencia de diferencias no significativas entre los tres tipos de dosis aplicados a las semillas de cacao. En resumen, estos resultados muestran que la variable longitud del explante a los 60 días depende del factor dosis de ácido giberélico aplicado.

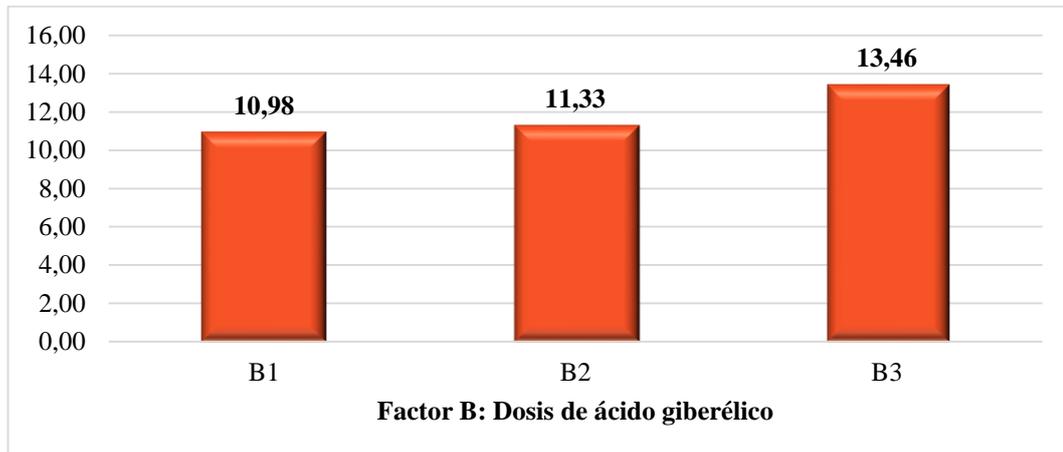


Figura 14: Longitud explante 60 días por dosis de ácido giberélico (NS)

Fuente: Datos del estudio

Elaborado por: Autor

5.2.2. Variables registradas en la fase de campo

La siguiente sección de este trabajo se mostrará los resultados en la fase de campo acerca de las diversas reacciones que tuvieron en las plantas de cacao al aplicarse los tres tipos de dosis señalados anteriormente, es decir, la afectación sobre las variables que tuvieron diferencias relevantes para la investigación.

En la figura 15, acerca de la variable volumen de raíz es interesante notar que las plantas que fueron tratadas con la dosis B1, la media de volumen de raíz fue de 2.23 ml. En cambio, al aplicarse la dosis B2 las plantas obtuvieron en promedio un volumen de raíz 2.03 ml. Finalmente, al aplicarse dosis B3 las plantas obtuvieron un volumen de raíz de 2.27.

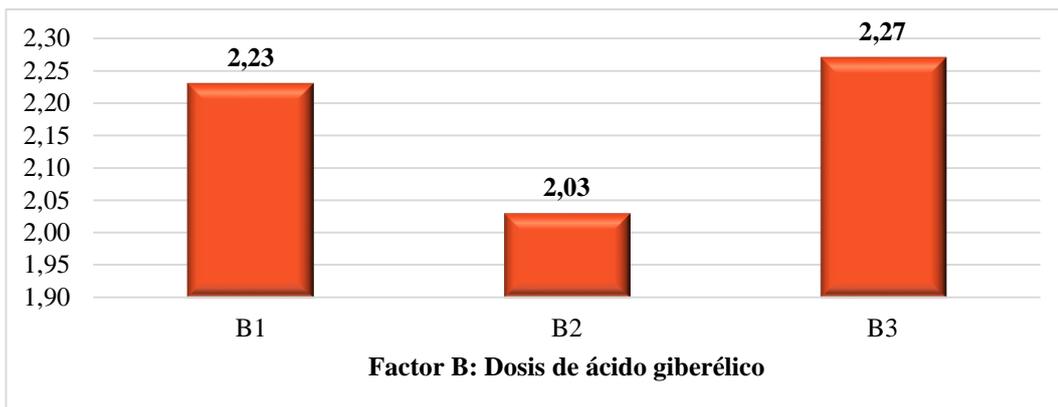


Figura 15: Volumen de raíz por dosis de ácido giberélico (NS)

Fuente: Datos del estudio

Elaborado por: Autor

Al aplicarse la prueba de Tukey al 5%, se demuestra la existencia de diferencias no significativas entre los promedios de los volúmenes de raíz por dosis aplicada. Se concluye entonces que, la variable volumen de raíz depende del factor dosis de ácido giberélico.

Con respecto a la variable altura de planta, como muestra la figura 16, se evidencia que las plantas que recibieron la dosis B1 alcanzaron una altura promedio de 19.25 cm. Mientras que, las plantas que recibieron la dosis B2 alcanzaron una altura promedio de 20.13 cm. Finalmente, las plantas que recibieron la dosis B3 alcanzaron una altura de 22.11 cm.

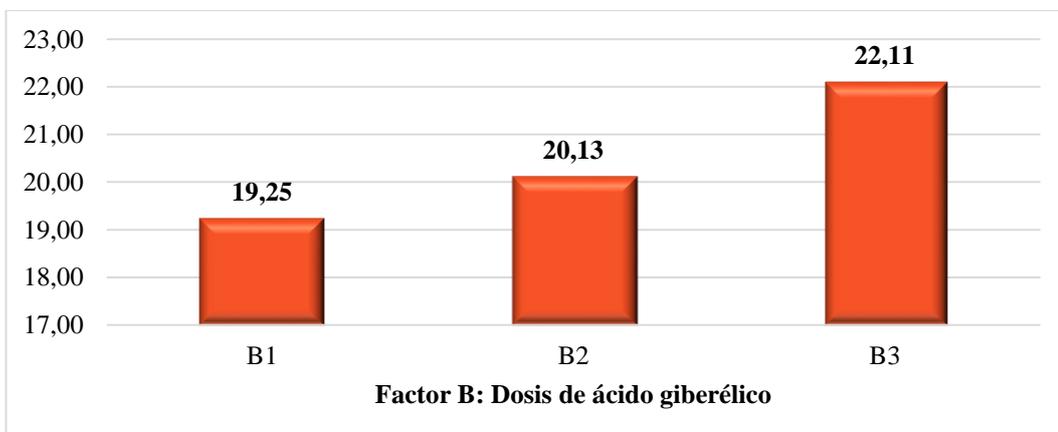


Figura 16: Altura de planta por dosis de ácido giberélico (**)

Fuente: Datos del estudio

Elaborado por: Autor

Al aplicarse la prueba de Tukey al 5%, se ratifica la existencia de diferencias significativas en la aplicación de las dosis con respecto a la altura de la planta. Con la evidencia estadística presentada anteriormente, se concluye que la variable altura de la planta es dependiente de factor dosis de ácido giberélico debido a que una variedad tiene mejor características genéticas que la otra.

Respecto al número de hojas, se observan diferencias entre las dosis aplicados en las plantas de cacao. En la siguiente figura, se detalla que las plantas sometidas a la dosis B1 en promedio tuvieron 5.14 hojas. A continuación, las plantas que recibieron la dosis B2 obtuvieron un promedio de 5.38 hojas. Finalmente, el resultado promedio de las plantas que recibieron la dosis B3 fue de 5.88 hojas.

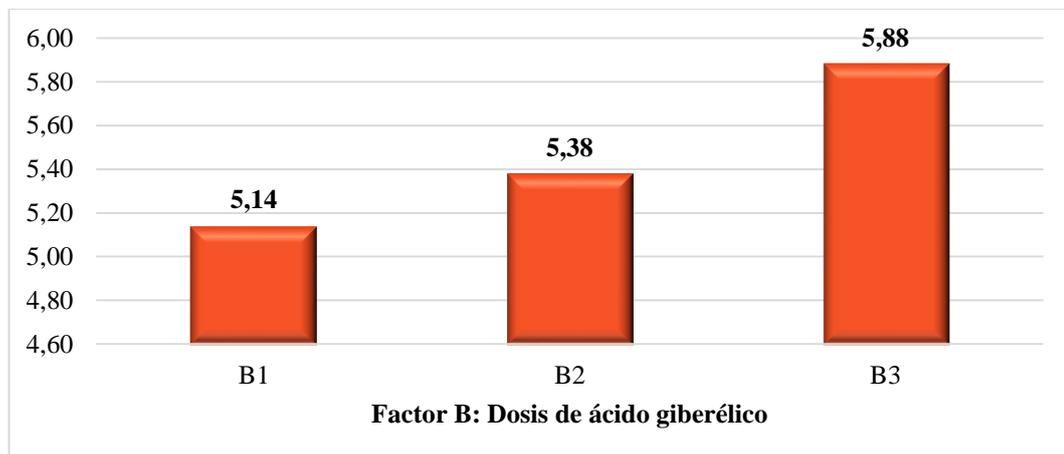


Figura 17: *Número de hojas por dosis de ácido giberélico (**)*

Fuente: Datos del estudio
Elaborado por: Autor

La prueba de Tukey al 5% evidencia la existencia de diferencias significativas en cada dosis aplicado en las plantas de cacao. En resumen, se concluyó que el número de hojas es una variable dependiente al factor dosis de ácido giberélico aplicado y a la capacidad genética de la variedad.

Acerca de los resultados obtenidos para la variable longitud de hojas, la figura 18 permite observar la existencia de importantes diferencias en las plantas al aplicarse diferentes dosis de ácido giberélico. Es así como, las plantas que recibieron la dosis

B1 en promedio sus hojas midieron 7.10 cm. Mientras que, las plantas que han recibido dosis B2 sus hojas midieron en promedio 9.06 cm. En tanto que, las plantas que recibieron la dosis B3 alcanzaron una longitud de hoja promedio de 10.64 cm.

Una vez aplicado la prueba de Tukey al 5%, se demuestran las diferencias altamente significativas en cada dosis aplicada en las plantas de cacao. Sintetizando, se concluyó que la longitud de las hojas es una variable dependiente al factor dosis aplicado.

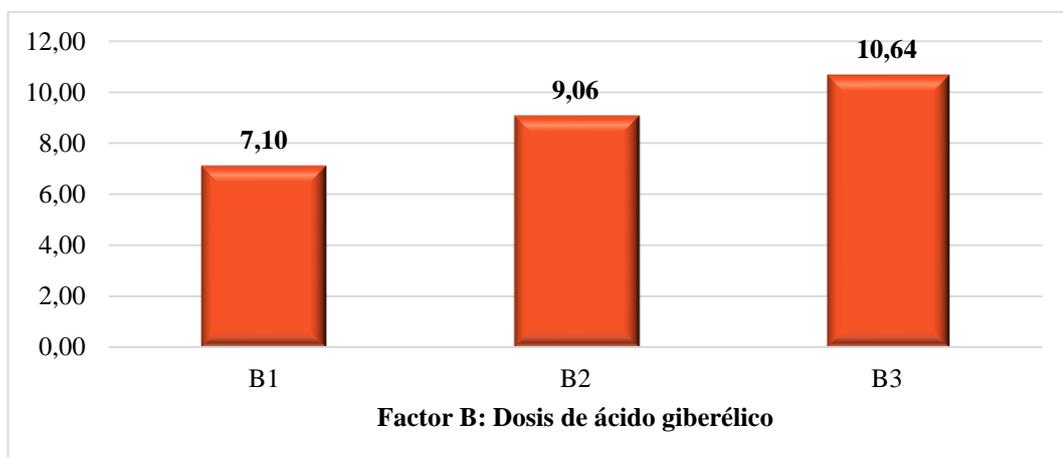


Figura 19: Longitud de hojas por dosis de ácido giberélico (**)

Fuente: Datos del estudio

Elaborado por: Autor

Con relación a la variable ancho de hoja como lo muestra la figura 19, las plantas que recibieron la dosis B1 tuvieron hojas con 4.97 cm de ancho en promedio. En cambio, las plantas a las que se aplicó la dosis B2 en promedio tuvieron hojas con 5.57 cm de ancho. Mientras que las plantas sometidas a la dosis B3 en promedio sus hojas midieron 6.46 cm de ancho.

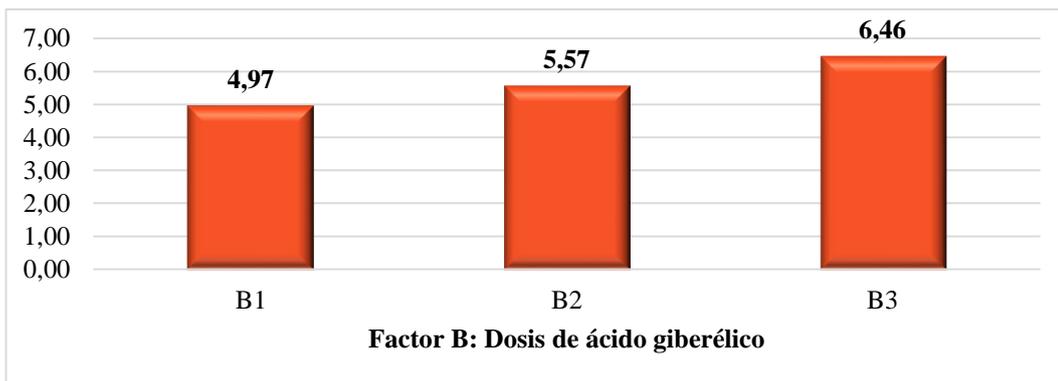


Figura 19: Ancho de hojas por dosis de ácido giberélico (**)

Fuente: Datos del estudio

Elaborado por: Autor

Los resultados de la prueba de Tukey al 5% exponen la existencia de diferencias altamente significativas entre las dosis recibidas que afectan al ancho de hoja. En consecuencia, se concluye que la variable ancho de hoja es dependiente de factor B (dosis de ácido giberélico).

En la variable diámetro de tallo, se puede observar que en promedio las plantas sometidas a las dosis B1 y B2 tuvieron un diámetro de 4 cm. A diferencia de la semilla sometidas al dosis B3 que estuvieron en promedio un diámetro de tallo de 4.15 cm. Una vez realizada la prueba de Tukey al 5%, se evidenció la existencia de diferencias entre las dosis de ácido giberélico. Por lo tanto, se concluye que el diámetro de tallo depende de la dosis que reciba la semilla.

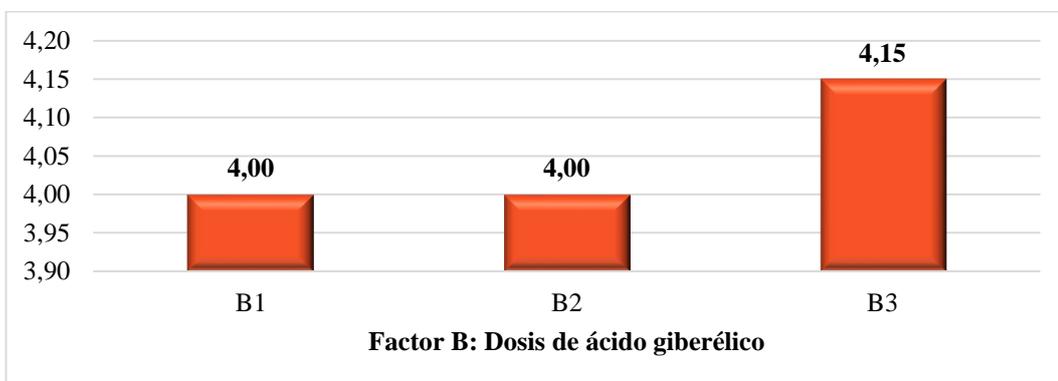


Figura 20: Diámetro de tallo por dosis de ácido giberélico (**)

Fuente: Datos del estudio

Elaborado por: Autor

En la variable diámetro de peciolo, se observa en la figura 21 que las plantas sometidas a la dosis B1 tuvieron un diámetro de 1.13 mm en promedio. En tanto las plantas sometidas a la dosis B2 tuvieron un diámetro promedio de 1.14 mm. Finalmente, las plantas sometidas a la dosis B3 obtuvieron un diámetro de peciolo promedio de 1.21 mm.

La prueba de Tukey al 5%, evidencia la existencia de diferencias significativas entre los diversos tipos de dosis aplicadas a las semillas. En consecuencia, la variable diámetro del peciolo depende del factor B (dosis de ácido giberélico).}

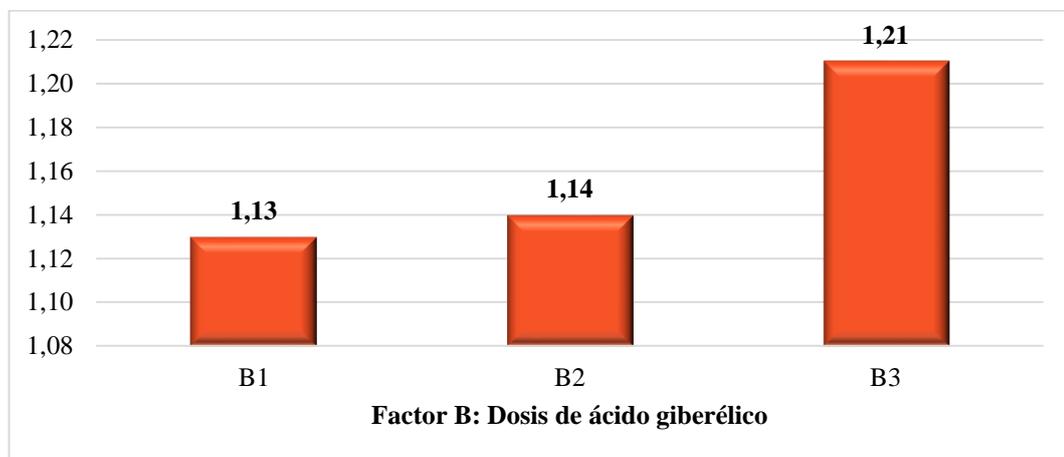


Figura 21: Diámetro de peciolo por dosis de ácido giberélico (**)

Fuente: Datos del estudio

Elaborado por: Autor

Finalmente, se presentan los resultados obtenidos en las diversas dosis de ácido giberélico para la variable longitud de entrenudos.

Como se observa en la figura 22, las plantas sometidas a la dosis B1 obtuvieron una longitud promedio de entrenudos de 6.40 cm. Mientras que, las plantas que recibieron la dosis B2 tuvieron en promedio una longitud de entrenudos de 6.62 cm. Al final, las plantas que recibieron la dosis B3 obtuvieron una longitud de entrenudos promedio de 7.32 cm.

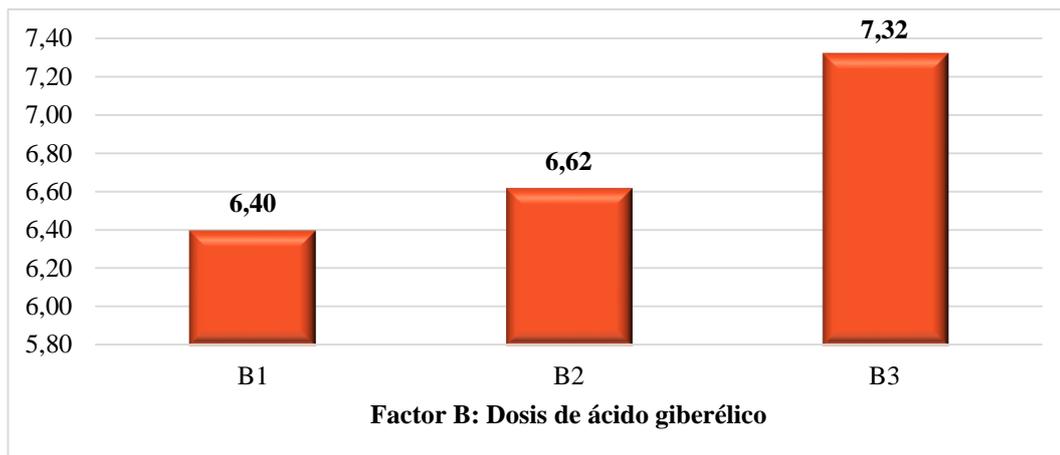


Figura 22: Longitud de entrenudos por dosis de ácido giberélico (**)

Fuente: Datos del estudio
Elaborado por: Autor

Al someter los resultados de la prueba de Tukey al 5%, se demostró que existen diferencias altamente significativas entre sí por lo que se concluye que la variable longitud de entrenudos depende del factor B, es decir, de la dosis de ácido giberélico aplicado a las plantas.

5.3. Variables agronómicas: Interacción de factores A × B

Tabla 9: Resultados para comparar los promedios de tratamientos A x B: Variedades de cacao x Dosis de ácido giberélico

Variables	INTERACCIÓN A × B						Media general	CV%
Fase de laboratorio								
DB (**)	T1	T2	T3	T4	T5	T6	17.28 ≅ 17 días	3.87
	18 A	18 A	17 BC	17.33 AB	17 BC	16.33 C		
PSB	T1	T2	T3	T4	T5	T6	100.00%	0
	100	100	100	100	100	100		
NFC	T1	T2	T3	T4	T5	T6	0 frascos	0
	0	0	0	0	0	0		
LE45 (**)	T1	T2	T3	T4	T5	T6	9.84 cm	19.56
	8.32 B	8.37 B	9.22 B	9.95 AB	10.31 AB	12.88 A		
LE60 (**)	T1	T2	T3	T4	T5	T6	11.92 cm	17.45
	10.20 B	10.90 AB	11.97 AB	11.75 AB	11.77 AB	14.95 A		
DTMM	T1	T2	T3	T4	T5	T6	45 días	0.00
	45	45	45	45	45	45		
Fase de campo								
DME	T1	T2	T3	T4	T5	T6	120 días	0.00
	120	120	120	120	120	120		
DMR	T1	T2	T3	T4	T5	T6	155 días	0.00
	155	155	155	155	155	155		
VR (NS)	T1	T2	T3	T4	T5	T6	2.17 ml	12.98
	2.18 A	2.00 A	2.08 A	2.27 A	2.05 A	2.45 A		
DTMCE	T1	T2	T3	T4	T5	T6	180 días	0.00
	180	180	180	180	180	180		
PMPTCE	T1	T2	T3	T4	T5	T6	0.00%	0.00
	0	0	0	0	0	0		
AP (**)	T1	T2	T3	T4	T5	T6	20.57 cm	12.48
	17.48 E	18.07 DE	18.91 D	20.34 C	21.59 B	24.62 A		
NH (**)	T1	T2	T3	T4	T5	T6	5.49	17.49
	4.75 C	4.70 C	4.91 C	5.38 BC	5.86 B	6.64 A		
LH (**)	T1	T2	T3	T4	T5	T6	9.03 cm	28.62
	6.50 C	7.06 C	7.80 C	7.47 C	10.48 B	12.87 A		
AH (**)	T1	T2	T3	T4	T5	T6	5.71 cm	27.78
	3.52 E	4.04 DE	4.88 D	5.86 C	6.66 B	7.70 A		

Variables	INTERACCIÓN A × B						Media general	CV%
	T1	T2	T3	T4	T5	T6		
DT (**)	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00	4.26	4.05 cm	2.81
	B	B	B	B	B	A		
DP (**)	1.05	1.07	1.09	1.18	1.19	1.30	1.16 mm	8.20
	C	C	C	B	B	A		
NEN	T1	T2	T3	T4	T5	T6	3.00	0.00
	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00		
LEN (**)	T1	T2	T3	T4	T5	T6	6.77 cm	12.93
	5.85	5.86	6.23	6.73	7.17	8.18		
	C	C	C	B	B	A		

Fuente: Investigación en el laboratorio y en el campo 2018.

Elaborado por: Autor

En la tabla 8, se presentan los resultados de la prueba Tukey considerando la interacción entre los tratamientos del factor A (variedades de cacao) y B (dosis de ácido giberélico), tuvieron diferencias altamente significativas en las variables: días a la brotación (DB), longitud del explante a los 45 días (LE45), longitud del explante a los 60 días (LE60), altura de planta (AP), número de hojas (NH), longitud de la hoja (LH), ancho de la hoja (AH), diámetro del tallo (DT), diámetro del pecíolo (DP), y, longitud de entrenudos (LEN).

Solamente en la variable volumen de raíz (VR), se obtuvieron diferencias no significativas de acuerdo a la prueba de Tukey.

Cabe destacar que las siguientes variables no se lograron realizar la prueba estadística de Tukey por tener exactamente el mismo promedio en los tres tipos de dosis de ácido giberélico aplicados para el presente proyecto: porcentaje de semillas brotadas (PSB), número de frascos contaminados (NFC), días a transferir a un medio de multiplicación (DTMM), días al medio de enraizamiento (DME), días a la emisión de raíces (DER), días a la transferencia a condiciones medioambientales externas (DTCME), porcentaje de mortalidad de las plantas al trasplante a condiciones externas (PMPTCE), y, número de entrenudos (NEN). Por tanto, estos resultados reflejan que la interacción de los factores A y B no tienen afectación alguna sobre los resultados de las variables anteriormente mencionadas.

5.3.1. Variables registradas en la fase de laboratorio

En esta sección se mostrará los resultados de las variables registradas durante la fase de laboratorio por efecto de la interacción entre los factores A (variedad de cacao) y B (dosis de ácido giberélico). Para ello, solamente se presentarán los resultados en las variables que se obtuvieron diferencias de acuerdo a la prueba de Tukey.

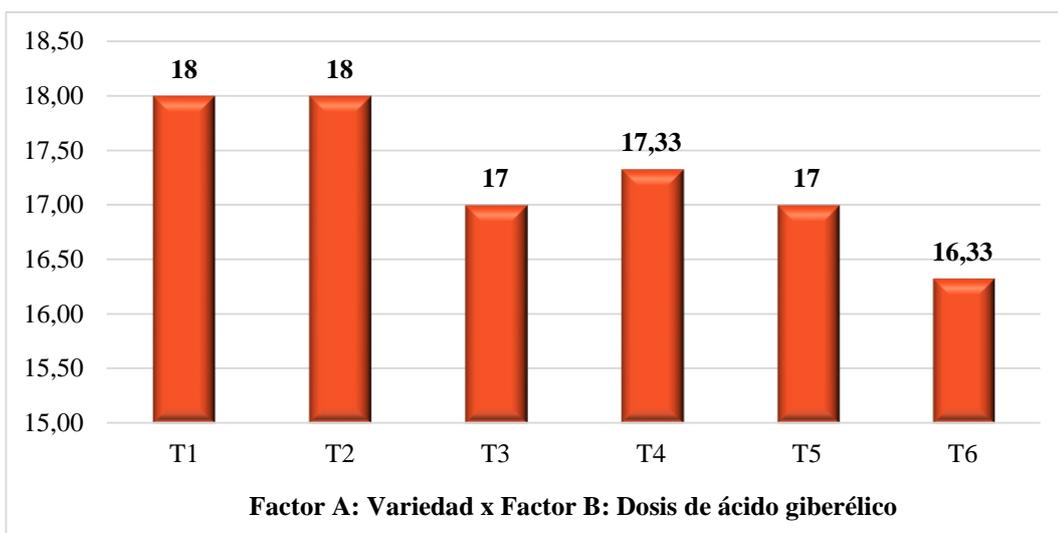


Figura 23: Promedio de días de brotación por interacción factores A x B

Fuente: Datos del estudio

Elaborado por: Autor

Respecto a la variable días de brotación, la figura 23 muestra que existe menor tiempo de brotación de la semilla al aplicarse el tratamiento T6, esto es 6 miligramos de ácido giberélico al embrión de la variedad A2. En cambio, los tratamientos T3 y T5 obtuvieron un tiempo de brotación de 17 días.

Mientras que el tratamiento T4 obtuvo un tiempo de 17.33 días. Finalmente, los tratamientos T1 y T2 tuvieron un tiempo de brotación de 18 días.

Mediante la prueba de Tukey al 5%, se demuestra la existencia de diferencias altamente significativas en los resultados obtenidos por la interacción de ambos factores estudiados.

En consecuencia, se concluye que la variable días de brotación depende tanto de la variedad de la planta, sus características genéticas y el tratamiento sometido a la semilla.

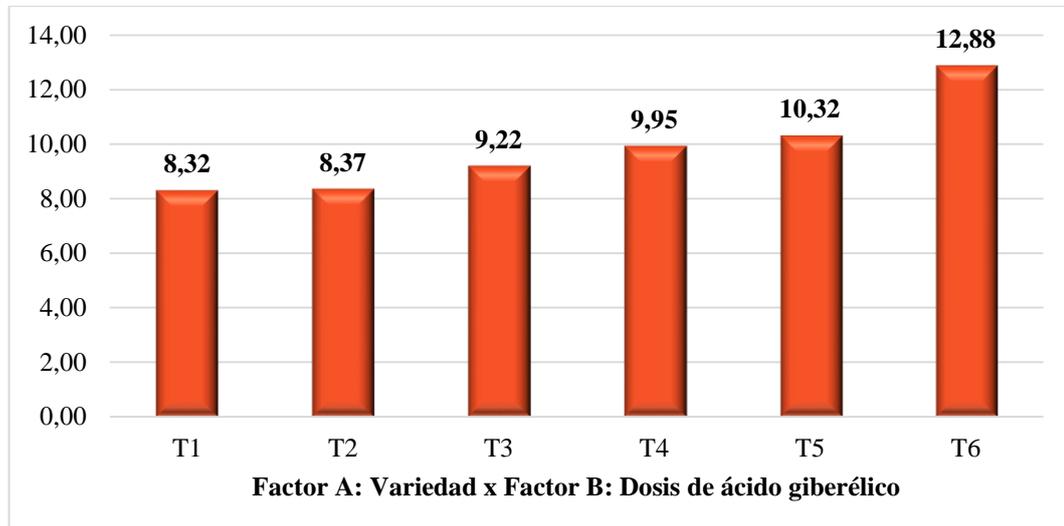


Figura 24: Promedio longitud explante 45 días por interacción factores A x B

Fuente: Datos del estudio

Elaborado por: Autor

Respecto a la variable longitud de explante a 45 días, la figura 24 expone que la mayor longitud promedio se obtiene mediante la aplicación del tratamiento T6, con un resultado de 12.88 cm.

Por otro lado, la menor longitud promedio corresponde al tratamiento T1 con 8.32 cm.

Mediante la prueba de Tukey al 5% se muestra la existencia de diferencias altamente significativas, al considerar la interacción de ambos factores.

Por lo tanto, se concluye que la longitud de explante a 45 días depende de la variedad, de su interacción genotipo ambiente y de la dosis de ácido giberélico que recibió el explante.

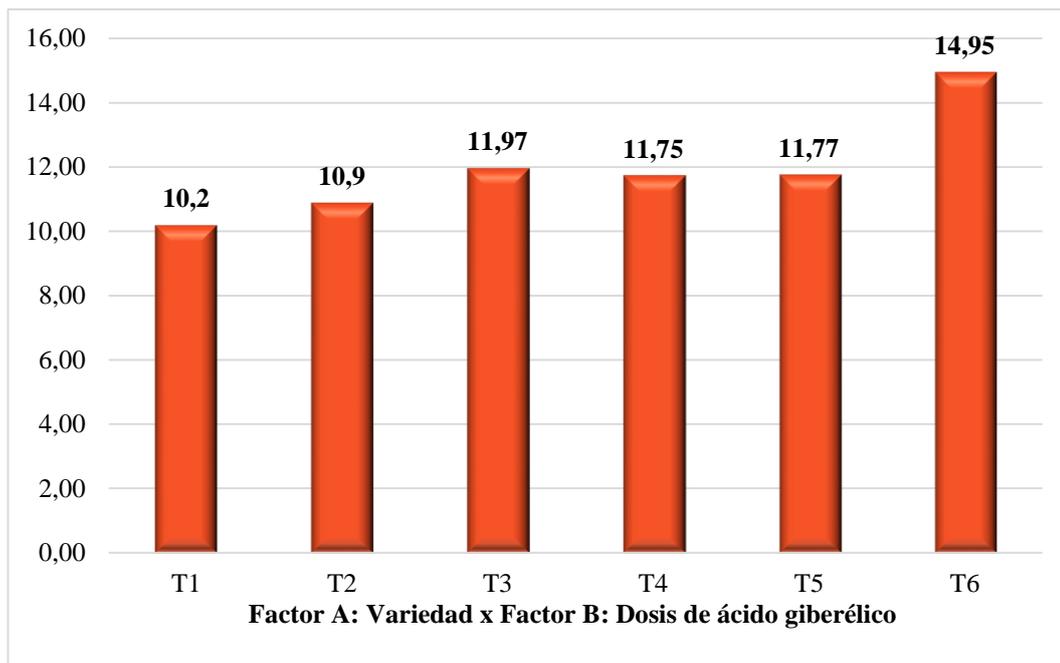


Figura 25: Promedio longitud explante 60 días por interacción factores A x B

Fuente: Datos del estudio

Elaborado por: Autor

Respecto a la variable longitud de explante a los 60 días, en la figura 25 se observa que las longitudes más altas se obtuvieron mediante la aplicación del tratamiento T6, es decir, que alcanzaron un promedio de 14.95 cm de longitud.

A diferencia de la aplicación del tratamiento T1, con el cual se obtuvo un resultado promedio de 10.20 cm.

Una vez realizada la prueba de Tukey al 5% se evidencia la existencia de diferencias altamente significativas entre los diversos tipos de tratamientos realizados. En resumen, se concluye que la longitud de los explantes a los 60 días depende tanto del factor variedad como del factor dosis de ácido giberélico aplicado.

5.3.2. Variables registradas en la fase de campo

En esta sección, se muestran los resultados obtenidos por los diversos tratamientos durante la fase de campo del presente estudio.

Es importante recordar que solamente se expondrán los resultados en las variables que se obtuvieron diferencias de acuerdo a la prueba de Tukey.

Acerca de la variable volumen de raíz, el siguiente gráfico muestra la existencia de una diferencia entre en los promedios de volumen de raíz considerando la interacción de los factores variedad y dosis de ácido giberélico.

Es así que, el mayor promedio se encuentra en las plantas que recibieron el tratamiento T6, obteniendo un resultado de 2.45 ml. En tanto que, el menor resultado promedio corresponde al tratamiento T2 con un promedio de 2.00 ml.

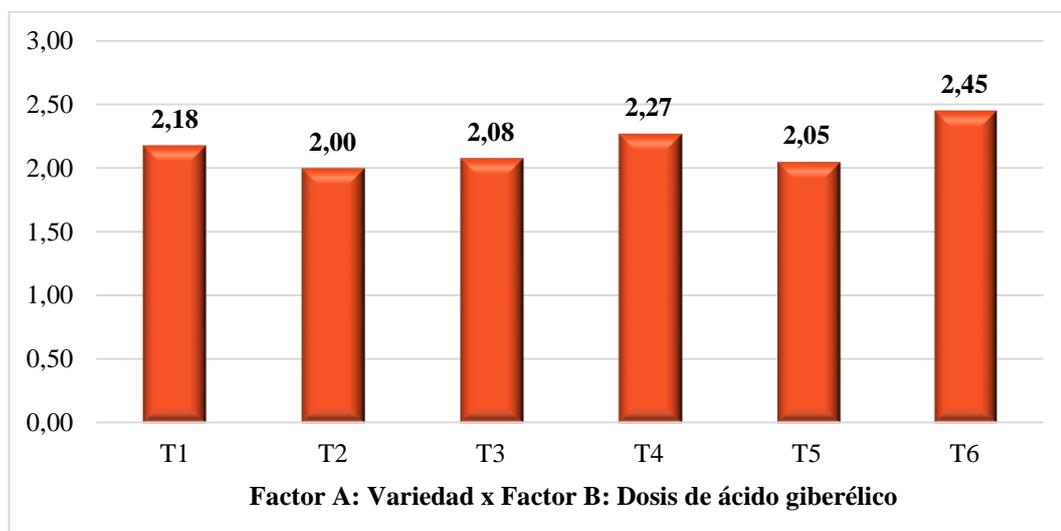


Figura 26: Promedio volumen de raíz por interacción factores A x B

Fuente: Datos del estudio

Elaborado por: Autor

De acuerdo a la prueba de Tukey, se demuestra la existencia de diferencias no significativas en los promedios de volumen de raíz analizados en el presente experimento. En resumen, se concluye que la variable volumen de raíz depende de

la interacción de la capacidad genética de cada variedad y la dosis de ácido giberélico recibido por la planta.

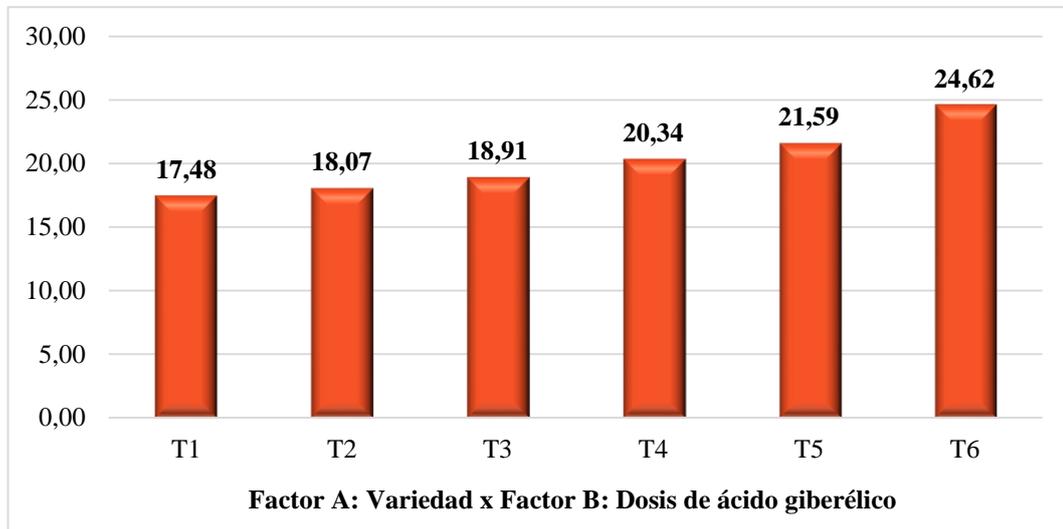


Figura 27: Promedio altura de planta por interacción factores A x B

Fuente: Datos del estudio
Elaborado por: Autor

Con respecto a la variable altura cómo lo muestra la figura 27, se encuentra la existencia de diferencias notables en los promedios de esta variable considerando la interacción entre los factores A y B. Como principales resultados, se destacan que el menor promedio de altura de planta corresponde a las plantas sometidos al tratamiento T1, que alcanzaron en promedio una altura de 17.48 cm.

Por el contrario, el promedio más alto se obtuvo al someterse al tratamiento T6, es decir, las plantas que recibieron el tratamiento de 6 mg de ácido giberélico que alcanzaron una altura promedio de 24.62 cm.

Utilizando la prueba de Tukey al 5%, se demuestra la existencia de diferencias altamente significativas en los promedios de altura para el grupo experimental. Se concluye entonces que la altura de la planta depende de la capacidad genética de las variedades y de la interacción dosis de ácido giberélico recibidos.

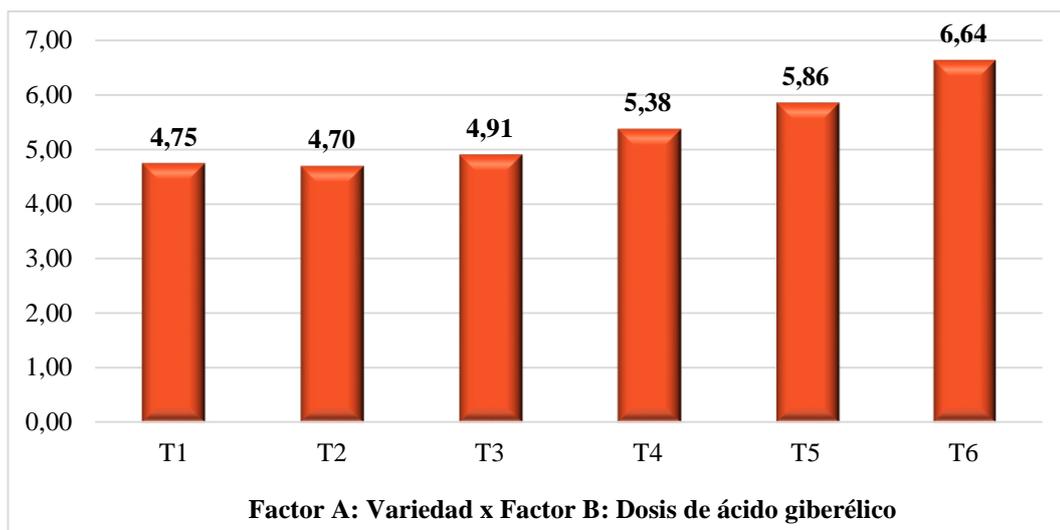


Figura 28: Promedio número de hojas por interacción factores A x B

Fuente: Datos del estudio

Elaborado por: Autor

La figura 28 muestra los valores promedio entre los diversos grupos experimentales correspondientes a la interacción entre los factores variedad y dosis de ácido giberélico. Las plantas con menor número de hojas son aquellas que se sometieron al tratamiento T1, que en promedio tuvieron 4.70 hojas.

Mientras que, las plantas con mayor número de hojas promedio pertenecieron al grupo experimental de plantas que recibieron el tratamiento T6, obteniendo un resultado de 6.64 hojas.

Mediante la prueba de Tukey al 5% se determinó la existencia de diferencias altamente significativas entre las diversas plantas por interacción de los factores A y B. Entonces, se concluye que el número de hojas depende de la interacción de los factores variedad de cacao y el tratamiento de ácido giberélico aplicado a las plantas.

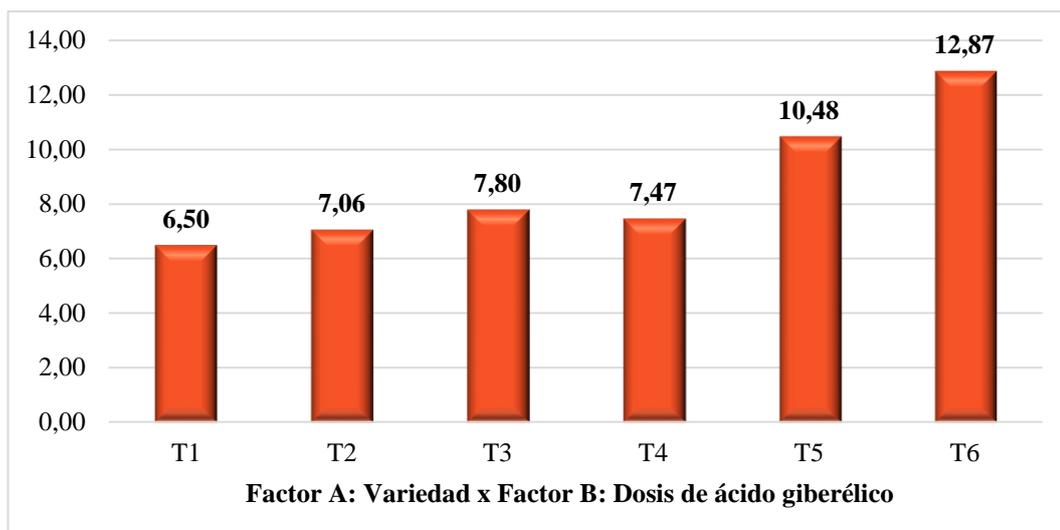


Figura 29: Promedio longitud de hojas por interacción factores A x B

Fuente: Datos del estudio

Elaborado por: Autor

Con respecto a la variable longitud de hojas, la figura 29 muestra los resultados promedios obtenidos en los diferentes grupos experimentales considerando la interacción entre las variedades de la planta y las dosis de ácido giberélico recibidos.

Cabe destacar que el valor máximo promedio obtenido para esta variable fue en el grupo de plantas sometidas al tratamiento T6, es decir con plantas de variedad clonal bajo una dosis de 6 mg de ácido giberélico, que alcanzaron una longitud de hoja promedio fue de 12.87 cm.

Mientras que, el valor mínimo para esta variable correspondió al grupo de plantas sometidas al tratamiento T1, es decir, de variedad nacional que recibieron una dosis de 2 miligramos de ácido giberélico, cuyas hojas se alcanzaron una longitud promedio de 6.50 cm.

En la prueba de Tukey al 5% realizado sobre los resultados antes mencionados, se evidencia la existencia de diferencias altamente significativas en los promedios de longitud de hoja. Por lo tanto, se concluye que la longitud de hojas es dependiente a la interacción de los factores variedad de plantas y dosis de ácido giberélico recibidos.

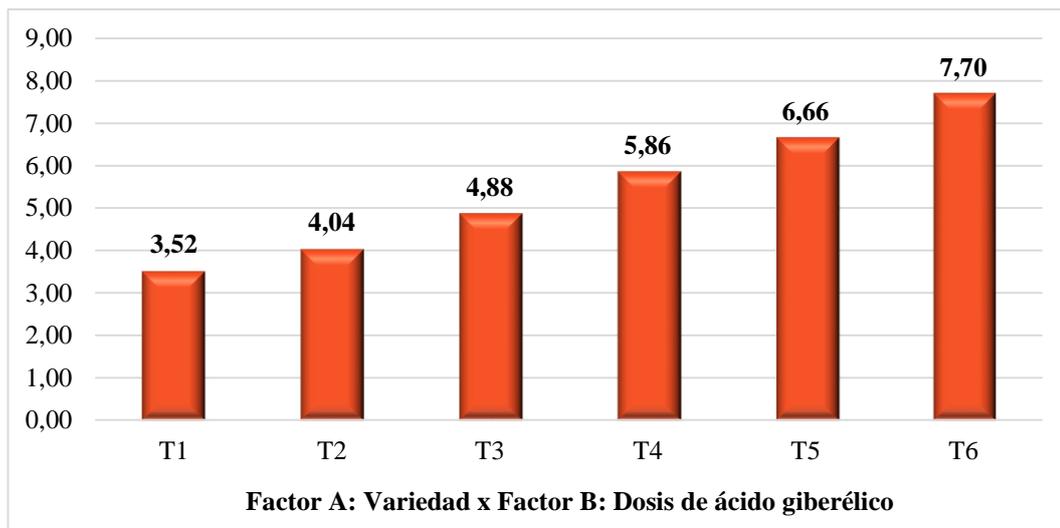


Figura 30: Promedio ancho de hojas por interacción factores A x B

Fuente: Datos del estudio

Elaborado por: Autor

Acerca de la variable ancho de hoja, la figura 30 muestra que los diversos grupos experimentales tuvieron resultados significativamente diferentes. Se evidencia entonces, que las hojas correspondientes a las plantas sometidas al tratamiento T6 obtuvieron un ancho promedio de 7.70 cm, siendo el máximo promedio para este grupo.

En contraste, se observa que el valor mínimo de este grupo experimental correspondió al grupo de plantas sometidas al tratamiento T1, con un promedio de 3.52 cm de ancho.

Mediante la prueba de Tukey, se demostró la existencia de diferencias altamente significativas entre los promedios de los diversos grupos experimentales. Entonces se puede concluir que el ancho de hoja es dependiente a la interacción genotipo ambiente entre los factores variedad de plantas y dosis de ácido giberélico recibidos.

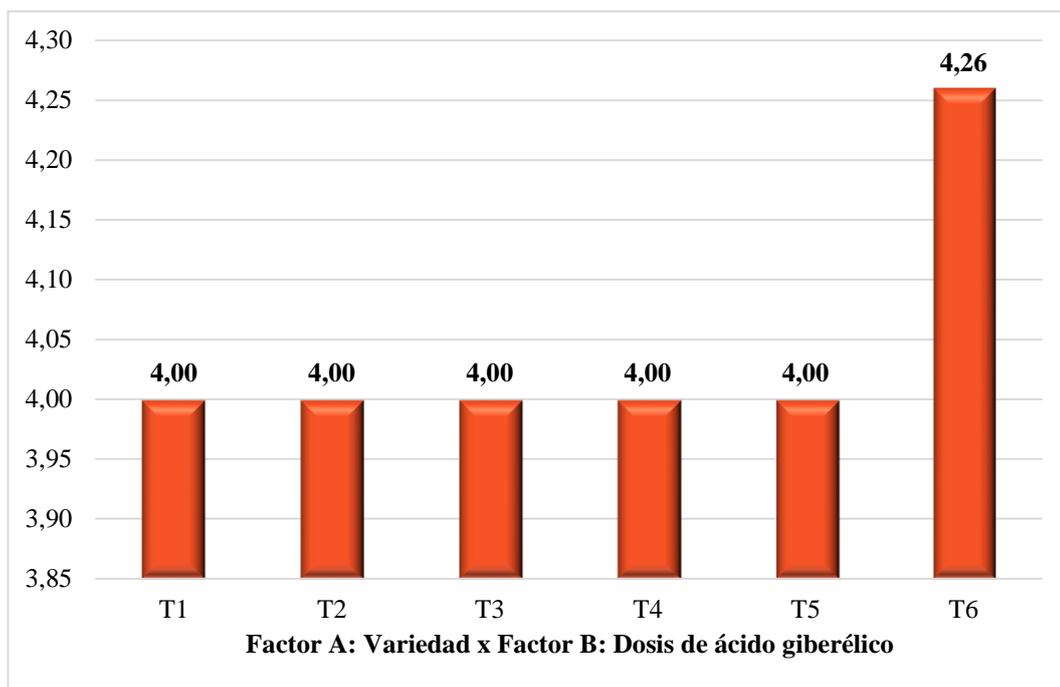


Figura 31: Promedio diámetro de tallo por interacción factores A x B

Fuente: Datos del estudio

Elaborado por: Autor

Con respecto a los resultados obtenidos para la variable diámetro de tallo en los diferentes grupos experimentales, la figura 31 destaca que el único resultado diferente corresponde al grupo de plantas sometidas al tratamiento T6 (variedad CCN51 con dosis de 6 mg de ácido giberélico) cuyo diámetro de tallo en promedio fue de 4.26 cm.

Al realizarse la prueba de Tukey al 5%, se demuestra la existencia de diferencias altamente significativas en los diversos grupos experimentales. Por lo tanto, se concluye que el diámetro de tallo depende de la variedad de la planta y de la dosis recibida.

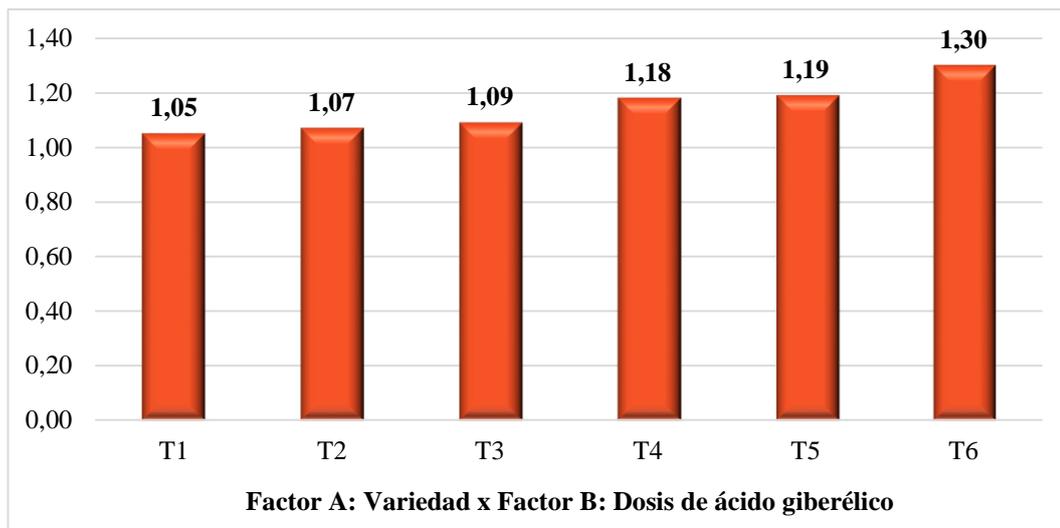


Figura 32: Promedio diámetro de peciolo por interacción factores A x B

Fuente: Datos del estudio

Elaborado por: Autor

Sobre la variable diámetro de peciolo, la figura 32 se observa los resultados obtenidos en los diversos grupos experimentales de acuerdo a la interacción de los actores variedad y dosis de ácido giberélico recibidas. Es así que el promedio máximo corresponde a las plantas sometidas al tratamiento T6 que en promedio obtuvieron un diámetro de 1.30 centímetros. En tanto que, el promedio mínimo analizado en este grupo experimental corresponde a las plantas sometidas al tratamiento T1, con un promedio de 1.05 cm.

Mediante la prueba de Tukey al 5% se demostró la existencia de diferencias altamente significativas en los diversos grupos experimentales. Se concluye, por tanto, que el diámetro de peciolo depende tanto de la variedad de la planta como de la dosis de ácido giberélico recibido.

Finalmente se analizó los resultados de la variable longitud de entrenudos tal como se observa en la figura 33. El promedio mínimo obtenido en este grupo experimental corresponde al grupo de plantas sometidas al tratamiento T1 con una longitud de entrenudos promedio de 5.85 cm. Mientras que el máximo promedio para el grupo

experimental corresponde a las plantas sometidas al tratamiento T6 cuya longitud de entrenudos fue de 8.18 cm.

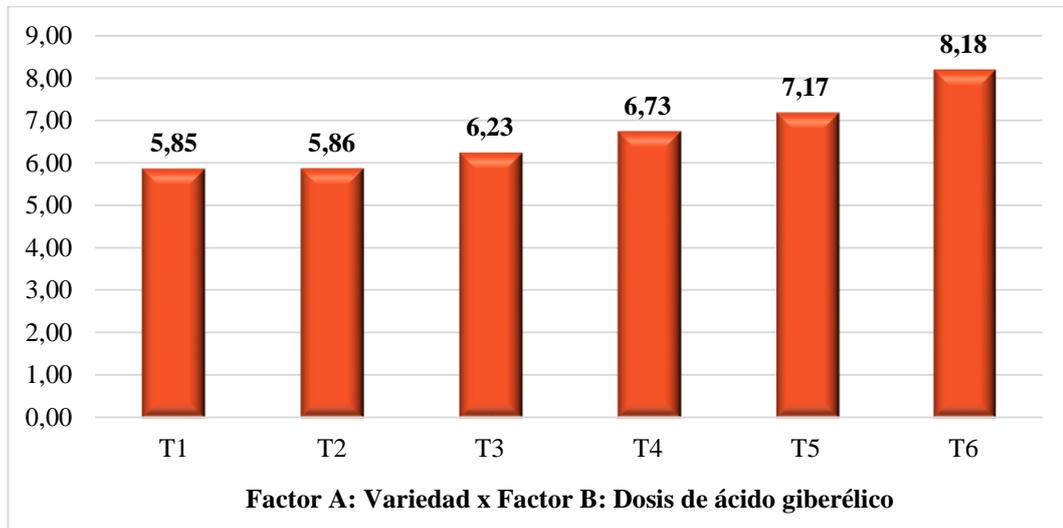


Figura 33: Promedio número de entrenudos por interacción factores A x B

Fuente: Datos del estudio

Elaborado por: Autor

La prueba de Tukey demuestra que existen diferencias altamente significativas entre los diversos grupos experimentales. En resumen, se concluye que la longitud de entrenudos es dependiente de los factores variedad y dosis de ácido giberélico recibidos.

VI. COMPROBACIÓN DE LA HIPÓTESIS

De acuerdo a los datos obtenidos en esta investigación rechazo la hipótesis nula y acepto la hipótesis alterna ya que la mayoría de variables agronómicas evaluadas fueron estadísticamente diferente.

VII. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

7.1. Conclusiones

En este trabajo se ha analizado el papel de los factores variedad y dosis de ácido giberélico en la respuesta agronómica de las plantas de cacao. Del desarrollo del presente proyecto de investigación, es posible extraer las siguientes conclusiones:

- Los resultados de las mejores dosis de ácido giberélico obtenidos en este proyecto correspondieron a la aplicación de 6 mg de ácido giberélico. Es decir, obtuvieron una mayor altura de planta (22.11 cm) y un mayor volumen de raíz (2.27 ml).
- Respecto a la respuesta agronómica de las variedades de cacao, se revisó que la variedad que mejor responde a la multiplicación in vitro de embriones maduros es la variedad clonal CCN51. Como evidencia, la altura promedio de la planta obtenida es de 22.11 cm y el volumen de raíz promedio es de 2.27 ml.
- El resultado de la interacción entre los factores A × B (variedad de cacao × dosis de ácido giberélico) para el desarrollo de las plántulas en la etapa de proliferación, se demostró que la combinación entre la variedad CCN51 y una dosis de 6 mg de ácido giberélico, obtuvo mejores resultados en materia de características agronómicas de las plantas sujetos de estudio. A manera de evidencia, se expone que la altura promedio de la planta es de 24.62 cm y el volumen de raíz promedio de 2.45 ml.

7.2. Recomendaciones

A partir de las conclusiones presentadas en el presente proyecto de investigación se recomienda:

- Respecto a las dosis de ácido giberélico, se recomienda la dosis de 6 mg, con la que se obtuvo mayor crecimiento en el laboratorio.

- Considerando sus características agronómicas estudiadas anteriormente, se recomienda la variedad clonal CCN51 para cultivos in vitro para la reproducción en laboratorio por el número de explantes por embriones.

- Considerar posteriores estudios de investigación mediante la multiplicación in vitro para la producción de plantas de calidad especialmente de la variedad clonal CCN51.

- Aumentar la difusión de la tecnología in vitro para los cultivos de cacao, dado que representa una oportunidad de crecimiento y diversificación a nivel del sector cacaotero de nuestro país, considerando que la actividad cacaotera es una de las fuentes de captación de divisas para Ecuador.

BIBLIOGRAFÍA

- AFP. (12 de Noviembre de 2016). *El cacao CCN-51 pasó de patito feo a cisne de la producción ecuatoriana*. Recuperado el 18 de marzo de 2017, de Diario El Comercio: <http://www.elcomercio.com/actualidad/negocios/cacao-ccn-51-paso-de.html>
- Alcantara, J., Acero, J., Alcántara, J., & Sánchez, R. (2019). Principales reguladores hormonales y sus interacciones en el crecimiento vegetal. *NOVA*, 109-129.
- Andaluz, M. J. (28 de enero de 2016). *Zonas de vida de Holdridge en el Ecuador*. Recuperado el 22 de marzo de 2017, de <https://prezi.com/2emhzybunlr9/zonas-de-vida-de-holdridge-en-el-ecuador/>
- ANECACAO. (10 de enero de 2015). *Cacao Nacional*. Obtenido de <http://www.anecacao.com/es/quienes-somos/cacao-nacional.html>
- Angel, H. (3 de Abril de 2015). *Cacao Nativa, tipos de cacao*. Obtenido de <https://www.facebook.com/cacaonativa/photos/hay-3-tipos-de-plantas-de-cacaocriolloplanta-de-cacao-que-produce-un-grano-de-c%C3%A11/1023234314370796/>
- Arvelo, M., González, D., Maroto, S., Delgado, T., & Montoya, P. (2017). *Manual técnico del cultivo de cacao: prácticas latinoamericanas*. San José: Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. Recuperado el 16 de marzo de 2017
- Azcón-Bieto, J., & Talón, M. (2000). *Fundamentos de fisiología vegetal*. Madrid: Mc. Graw-Hill Interamericana.
- Batista. (2009). *Guía Técnica el Cultivo de Cacao en la República Dominicana*. Santo Domingo: CEDAF.
- Benítez, A. (2005). *Avances recientes en biotecnología vegetal e ingeniería genética de plantas*. Barcelona: Editorial Reverté.
- Calva, G., & Pérez, J. (2005). Cultivo de células tejidos vegetales, fuentes de alimento para el futuro. *Revista Digital Universitaria*, 1-16.
- Castillo, A. (2004). *Propagación de plantas por cultivo in vitro: una biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo*. Obtenido de

<http://www.inia.uy/Publicaciones/Documentos%20compartidos/111219220807102417.pdf>

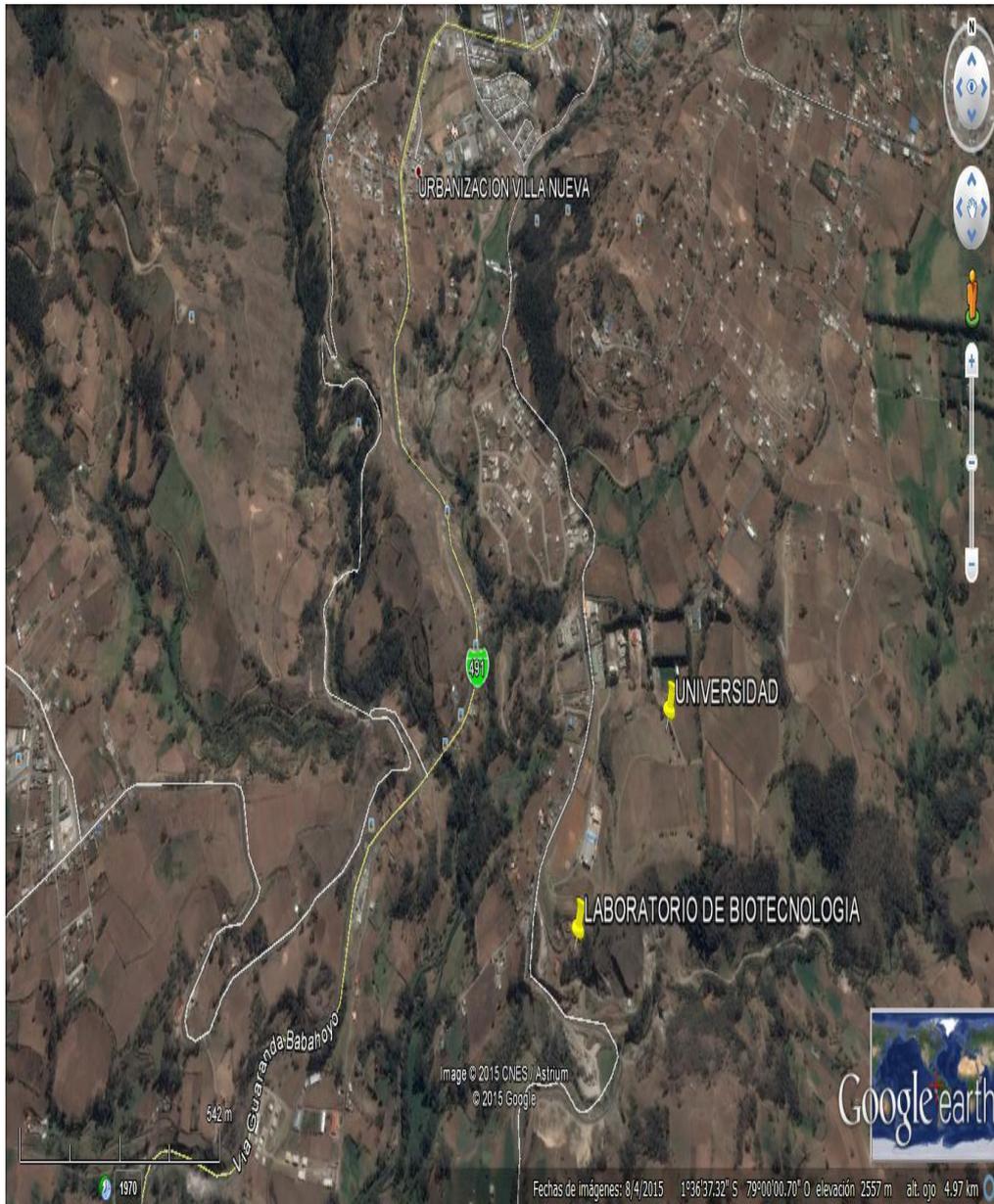
- Centro de Comercio Internacional. (13 de octubre de 2001). *Cacao. Guía de prácticas comerciales*. Recuperado el 10 de agosto de 2018, de <http://www.intracen.org/uploadedFiles/intracenorg/Content/Publications/Cocoa%20-%20A%20Guide%20to%20Trade%20Practices%20Spanish.pdf>
- Cerezo, J. (15 de agosto de 2016). *Manual Fisiología vegetal*. Obtenido de <https://georgiusm.files.wordpress.com/2017/11/tema-10-giberelinas.pdf>
- Cortez, V. (12 de octubre de 2017). Medios de cultivo de Murashige y Skoog. Guaranda, Ecuador.
- Cruz, F. (2012). *Cultivo de tejidos vegetales (Manual de prácticas)*. México: Universidad Nacional Autónoma de México.
- Domenech, A. (2001). *Medios de Cultivo*. Recuperado el 18 de marzo de 2017, de Seminario de Microbiología: <http://www.uib.cat/depart/dba/microbiologia/seminarios/1%20Medios%20de%20cultivo.pdf>
- Ecured. (14 de diciembre de 2005). *Medios de cultivo para la propagación in vitro*. Recuperado el 24 de marzo de 2017, de www.ecured.cu/Medios_de_cultivo_para_la_propagacion_in_vitro
- Encina, L. (2015). *Enraizamiento y aclimatación de plantas obtenidas in vitro*. Recuperado el 20 de marzo de 2017, de <http://www.encuentros.uma.es/encuentros31/enraizamiento.html>
- Enríquez, G. (2010). Cacao orgánico, guía para productores ecuatorianos. *Manual Nro. 54 Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP) Quito*, 67, 104-109.
- Estrada, W., Romero, X., & Moreno, J. (2011). *Guía técnica del cultivo de cacao manejado con técnicas agroecológicas*. San Salvador: CATIE/CONFRAS. Obtenido de http://infocafes.com/portal/wp-content/uploads/2016/01/Estrada_et_al_Guia_Tecnica_Cacao.pdf
- Fernández, L. (4 de junio de 2018). *Técnicas de cultivo in vitro. Genética forestal*. Obtenido de https://issuu.com/fredyloper/docs/in_vitro

- García, A. (2015). *Documento técnico manejo de cacao*. Recuperado el 18 de marzo de 2017, de Issuu: https://issuu.com/angelgarcia50/docs/documento_tecnico.docx
- INEC. (15 de abril de 2016). *Estadísticas Sectoriales Cacao Provincias Bolívar*. Recuperado el 19 de marzo de 2017, de <http://www.ecuadorencifras.gob.ec/estadisticas-sectoriales/>
- INIAP; COFENAC; PROMSA. (11 de octubre de 2015). *Proyecto de investigación igcv019 n° 2104 “selección y difusión de variedades de café arábico (coffea arabica) adaptadas a los principales agroecosistemas cafetaleros del Ecuador”*. Recuperado el 24 de agosto de 2018, de Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP) Quevedo, Ecuador p. 24-4.: <https://docplayer.es/58707370-Instituto-nacional-autonomo-de-investigaciones-agropecuarias-iniap-consejo-cafetalero-nacional-cofenac.html>
- Loreto. (4 de mayo de 2018). *Ácido abscísico y otras hormonas*. Obtenido de https://aulavirtual.agro.unlp.edu.ar/pluginfile.php/49762/mod_resource/content/2/Hormonas%20%20ABA%20y%20otras%202020.pdf
- Luján, S., Ríssola, M., Chindamo, M., & Manfreda, V. (4 de Noviembre de 2016). *Efectos de la hormona vegetal etileno en diversas especies vegetales*. Obtenido de Debates, enseñanza investigación y extensión de las ciencias de la naturaleza: <https://www.unicen.edu.ar/content/efectos-de-la-hormona-vegetal-etileno-en-diversas-especies-vegetales>
- MAGAP. (11 de mayo de 2016). *MAGAP impulsa proyecto de reactivación del cacao fino y de aroma*. Recuperado el 18 de 04 de 2017, de <https://www.agricultura.gob.ec/magap-impulsa-proyecto-de-reactivacion-del-cacao-fino-y-de-aroma/>
- MAGAP. (15 de julio de 2017). *Bolívar: productores reciben 72.058 plantas de cacao nacional fino de aroma*. Recuperado el 21 de noviembre de 2019, de <https://www.agricultura.gob.ec/bolivar-productores-reciben-72-058-plantas-de-cacao-nacional-fino-de-aroma/>
- Melgarejo, L. (2010). *Experimentos en fisiología vegetal*. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia.

- Moreno, J. (20 de abril de 2011). *Guía técnica del cultivo de cacao manejado con técnicas agroecológicas*. Obtenido de http://infocafes.com/portal/wp-content/uploads/2016/01/Estrada_et_al_Guia_Tecnica_Cacao.pdf
- Mroginski, L., & Roca, W. (2010). Establecimiento de cultivo de tejidos vegetales in vitro. En L. Mroginski, & W. Roca, *Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Fundamentos y aplicaciones* (págs. 19 - 40). Colombia: CIAT.
- Navarro, C. (12 de agosto de 2015). *Cultivo In Vitro de Células y Tejidos Vegetal*. Obtenido de Intagri: <https://www.intagri.com/articulos/nutricion-vegetal/cultivo-in-vitro-de-celulas-y-tejidos-vegetal>
- Orlando, S. (12 de enero de 2019). *commodities cacao*. Obtenido de http://repositorio.minagri.gob.pe/bitstream/MINAGRI/97/1/commodities_cacao_enero2019.pdf
- Promix. (5 de Octubre de 2018). *La funcion del magnesio en las plantas*. Obtenido de <https://www.pthorticulture.com/es/centro-de-formacion/la-funcion-del-magnesio-en-el-cultivo-de-plantas/>
- Puche, F. (19 de febrero de 2012). *Componentes del Medio del Cultivo [Entrada en blog]*. Recuperado el 26 de 03 de 2017, de Biotecnología ITCA: <http://biotecnologia-itca.blogspot.com/2012/02/2-1-4-componentes-del-medio-de-cultivo.html>
- Smart Biblioteca. (12 de febrero de 2020). *El Zinc en las Plantas*. Obtenido de SMART Fertilizer Software: <https://www.smart-fertilizer.com/es/articles/zinc-in-plants/>
- Valerín, A. (2005). *Características de las plantulas in vitro y su aclimatación*. Mexico: Ti Orquideas.
- Vera, G. (3 de Noviembre de 2016). *Tipos de Cacao*. Obtenido de <https://www.cocinayvino.com/mundo-gourmet/tipos-cacao-forastero-criollo-trinitario/>

ANEXOS

ANEXO N° 1: Mapa físico de la localidad donde se realizó la investigación



ANEXO N° 2: Base de datos recolectados en fase de laboratorio

TRA	REP	FA	FB	DB	PSB	NFC	NEE	LE45	LE60	DTMM	DME	DMR	VR	DTMCE	PMPTCE
1	1	1	1	18	100	0	2	9,25	11,95	45	120	155	2,35	180	0
1	2	1	1	18	100	0	2	7,85	9,40	45	120	155	1,70	180	0
1	3	1	1	18	100	0	2	7,85	9,25	45	120	155	2,50	180	0
2	1	1	2	18	100	0	2	8,70	12,50	45	120	155	2,35	180	0
2	2	1	2	18	100	0	2	10,00	11,55	45	120	155	2,20	180	0
2	3	1	2	18	100	0	2	6,40	8,65	45	120	155	1,45	180	0
3	1	1	3	17	100	0	2	10,35	13,75	45	120	155	2,15	180	0
3	2	1	3	17	100	0	2	9,30	13,15	45	120	155	2,10	180	0
3	3	1	3	17	100	0	2	8,00	9,00	45	120	155	2,00	180	0
4	1	2	1	17	100	0	2	10,20	13,20	45	120	155	2,40	180	0
4	2	2	1	18	100	0	2	9,55	11,95	45	120	155	2,15	180	0
4	3	2	1	17	100	0	2	10,10	10,10	45	120	155	2,25	180	0
5	1	2	2	17	100	0	2	11,60	11,60	45	120	155	1,95	180	0
5	2	2	2	17	100	0	2	11,45	12,90	45	120	155	1,95	180	0
5	3	2	2	17	100	0	2	7,90	10,80	45	120	155	2,25	180	0
6	1	2	3	16	100	0	2	12,90	15,65	45	120	155	2,50	180	0
6	2	2	3	17	100	0	2	12,65	14,65	45	120	155	2,45	180	0
6	3	2	3	16	100	0	2	13,10	14,55	45	120	155	2,40	180	0

ANEXO N° 3: Base de datos recolectados en fase de campo

TRA	FA	FB	ALT	NH	LH	AH	DT	DP	NEN	LEN
1	1	1	18,30	5	6,40	4,30	4,00	1,10	3	6,03
1	1	1	18,00	3	6,40	3,80	4,00	1,10	3	5,90
1	1	1	17,90	5	7,88	3,44	4,00	1,10	3	6,23
1	1	1	16,00	5	5,18	2,54	4,00	1,00	3	5,27
1	1	1	17,80	5	5,64	3,26	4,00	1,00	3	5,70
1	1	1	17,30	5	6,48	3,64	4,00	1,00	3	5,53
1	1	1	16,80	5	5,68	3,00	4,00	1,00	3	5,13
1	1	1	17,70	5	8,36	4,18	4,00	1,10	3	7,03
2	1	2	18,70	4	6,25	4,25	4,00	1,10	3	6,13
2	1	2	16,80	4	5,45	2,83	4,00	1,00	3	5,53
2	1	2	18,40	5	7,88	3,44	4,00	1,10	3	6,23
2	1	2	17,20	5	5,18	2,54	4,00	1,00	3	5,27
2	1	2	17,80	5	5,64	3,26	4,00	1,00	3	5,70
2	1	2	18,30	5	6,48	3,64	4,00	1,10	3	5,53
2	1	2	18,30	5	8,24	5,64	4,00	1,10	3	6,03
2	1	2	18,50	5	8,36	4,18	4,00	1,10	3	6,07
2	1	2	18,70	4	8,80	6,43	4,00	1,10	3	6,17
2	1	2	18,00	5	8,36	4,18	4,00	1,10	3	5,93
3	1	3	18,90	5	7,60	4,54	4,00	1,10	3	6,20
3	1	3	17,90	4	6,93	4,23	4,00	1,00	3	5,80
3	1	3	19,00	5	6,76	4,50	4,00	1,10	3	6,30
3	1	3	19,20	5	8,62	5,82	4,00	1,10	3	6,37
3	1	3	19,80	5	8,04	5,40	4,00	1,10	3	6,53
3	1	3	18,50	5	7,34	5,00	4,00	1,10	3	6,07
3	1	3	18,40	5	7,12	4,50	4,00	1,10	3	6,07
3	1	3	19,50	5	7,32	4,36	4,00	1,10	3	6,40
3	1	3	18,80	5	8,10	4,76	4,00	1,10	3	6,20
3	1	3	19,10	5	8,36	4,18	4,00	1,10	3	6,37
3	1	3	18,90	5	9,58	6,44	4,00	1,10	3	6,23
4	2	1	20,20	5	10,28	6,08	4,00	1,20	3	6,67

TRA	FA	FB	ALT	NH	LH	AH	DT	DP	NEN	LEN
4	2	1	19,90	5	9,94	6,60	4,00	1,20	3	6,60
4	2	1	19,00	6	10,08	5,62	4,00	1,10	3	6,30
4	2	1	20,70	6	9,95	6,25	4,00	1,20	3	6,83
4	2	1	20,30	6	5,57	5,07	4,00	1,20	3	6,73
4	2	1	20,20	5	6,68	6,08	4,00	1,20	3	6,70
4	2	1	21,40	6	5,57	5,07	4,00	1,20	3	7,10
4	2	1	21,70	5	6,68	6,08	4,00	1,20	3	7,17
4	2	1	22,00	6	5,57	5,07	4,00	1,20	3	7,27
4	2	1	19,90	5	6,68	6,08	4,00	1,20	3	6,60
4	2	1	20,40	5	6,68	6,08	4,00	1,20	3	6,77
4	2	1	19,70	5	6,68	6,08	4,00	1,10	3	6,53
4	2	1	19,00	5	6,68	6,08	4,00	1,20	3	6,27
5	2	2	20,00	6	9,92	5,95	4,00	1,20	3	6,63
5	2	2	21,20	6	10,77	6,82	4,00	1,20	3	7,03
5	2	2	22,20	6	10,13	6,35	4,00	1,20	3	7,37
5	2	2	22,30	6	10,33	5,80	4,00	1,20	3	7,40
5	2	2	21,80	6	10,97	6,68	4,00	1,20	3	7,20
5	2	2	22,50	7	10,89	6,94	4,00	1,20	3	7,50
5	2	2	21,40	7	11,11	7,21	4,00	1,20	3	7,07
5	2	2	20,50	5	8,18	6,56	4,00	1,20	3	6,83
5	2	2	22,80	5	11,50	7,16	4,00	1,20	3	7,53
5	2	2	21,10	6	11,10	6,92	4,00	1,10	3	7,00
5	2	2	22,30	5	10,70	6,56	4,00	1,20	3	7,47
5	2	2	21,10	5	9,32	6,74	4,00	1,10	3	7,00
5	2	2	20,70	6	10,85	6,67	4,00	1,20	3	6,87
5	2	2	22,40	6	10,93	6,85	4,00	1,20	3	7,47
5	2	3	23,40	6	12,82	7,63	4,20	1,30	3	7,80
6	2	3	24,90	7	13,10	8,03	4,20	1,30	3	8,27
6	2	3	25,20	8	12,64	7,73	4,30	1,30	3	8,40
6	2	3	23,50	7	12,54	6,54	4,30	1,30	3	7,80
6	2	3	24,90	8	12,59	8,03	4,30	1,40	3	8,23
6	2	3	24,10	5	13,54	9,20	4,30	1,30	3	8,10

TRA	FA	FB	ALT	NH	LH	AH	DT	DP	NEN	LEN
6	2	3	25,30	7	12,11	7,49	4,00	1,30	3	8,40
6	2	3	25,60	6	12,27	7,52	4,20	1,30	3	8,47
6	2	3	24,80	7	13,01	8,00	4,30	1,30	3	8,20
6	2	3	25,60	8	12,45	7,38	4,40	1,30	3	8,47
6	2	3	25,80	7	13,63	8,31	4,30	1,30	3	8,57
6	2	3	24,70	6	12,95	7,33	4,30	1,20	3	8,20
6	2	3	23,80	5	13,42	6,72	4,30	1,30	3	7,90
6	2	3	23,10	6	13,05	7,82	4,30	1,30	3	7,67

ANEXO N°: Fotografías de la instalación, seguimiento y evaluación de la investigación



Fotografía 1: Variedades de cacao estudiadas
Tomada por: Bruno Bajaña Puma



Fotografía 2: Preparación del medio de cultivo
Tomada por: Bruno Bajaña Puma



Fotografía 3: Brotación de los embriones
Tomada por: Bruno Bajaña Puma



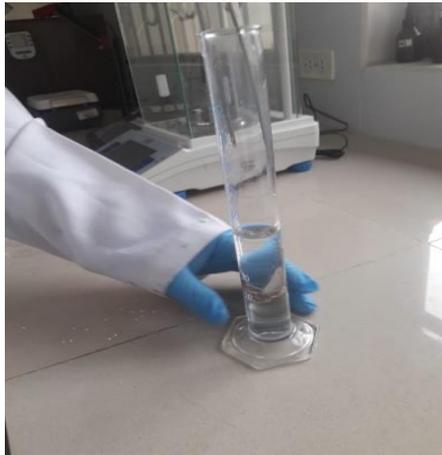
Fotografía 2: Multiplicación de los embriones
Tomada por: Bruno Bajaña Puma



Fotografía 5: Transferencia de medio de cultivo a campo
Tomada por: Bruno Bajaña Puma



Fotografía 6: Toma de variables en fase de campo
Tomada por: Bruno Bajaña Puma



Fotografía 7: Volumen de raíz
Tomada por: Bruno Bajaña Puma



Fotografía 8: Longitud de explante
Tomada por: Bruno Bajaña Puma



Fotografía 9: Altura de planta
Tomada por: Bruno Bajaña Puma



Fotografía 10: Visita del tribunal
Tomada por: Bruno Bajaña Puma

ANEXO N° 5: Glosario de términos técnicos

Ácido absísico (Aba).- Hormona vegetal que provoca el letargo de las yemas, mantiene el letargo de las semillas, está implicada en el gravitropismo de las raíces y provoca el cierre de las estomas, entre otros efectos.

Ácidos nucleicos.- Polímeros formados por cadenas de nucleótidos unidos por uniones fosfodiéster. Existen dos tipos: el ácido desoxirribonucleico (ADN) y el ácido ribonucleico (ARN).

Acuaporina.- Proteína de transporte de agua. Estas proteínas se han identificado en animals y plantas., arabidopsis thaliana posee al menos 35.

Adenina.- Base nitrogenada que forma parte de los nucleótidos del ADN y el ARN. Por su estructura química, la adenina es una purina y en la doble cadena del ADN siempre se enfrenta a una timina.

Biotecnología.- Toda aplicación tecnológica que utilice sistemas biológicos y organismos vivos o sus derivados para la creación o modificación de productos o procesos en usos específicos.

Biótico.- Relativo a la vida. En agronomía, relacionado con factores biológicos que afectan el rendimiento de un cultivo: insectos, hongos, bacterias, virus, nematodos, etc.

Explanto o explante.- Parte de un vegetal que se cultivará in vitro, pueden ser protoplastos –células desprovistas de pared celular- células, tejidos u órganos.

Expresión Génica.- Proceso por el cual la información codificada en un gen se transcribe a un ARN ribosomal, de transferencia o mensajero. La información contenida en los ARN mensajeros luego se traduce a proteínas

Hibridación.- En biología molecular, asociación de dos cadenas de ácidos nucleicos complementarias para formar una cadena doble que contenga dos cadenas de ADN, dos cadenas de ARN o una de ADN y una de ADN. Se emplea para detectar secuencias específicas de ADN o ARN.

En el mejoramiento vegetal, producción de nuevas variedades (híbridos) por cruzamiento.

Híbrido.- Descendencia de dos progenitores que difieren en una o más características heredables.

Hidratos de carbono.- También llamados carbohidratos. Biomoléculas orgánicas formadas por polialcoholes con un grupo aldehído o cetona. Debe su nombre a que su fórmula empírica es $C_n (H_2O)_m$, aunque algunos compuestos pueden tener fórmulas ligeramente diferentes de esta proporción general. También se los llama glúcidos, glicoles o azúcares.

Homocigota.- Estado en que los alelos en el mismo locus en los cromosomas homólogos son iguales.

Hormona.- Sustancia química producida normalmente en pequeñas cantidades en una parte del organismo, desde donde es transportada a otra parte del organismo en la que produce un efecto específico.

Micro propagación.- Propagación de plantas en un ambiente artificial controlado, empleando un medio de cultivo nutritivo adecuado

Nutrientes.- Son las sustancias presentes en los alimentos y que resultan útiles para el metabolismo. Corresponden a los grupos genéricamente denominados proteínas, hidratos de carbono, grasas, vitaminas, sustancias minerales y agua

Proteínas.- Macromoléculas formadas por muchos aminoácidos enlazados por uniones peptídicas.

Reproducción asexual.- Cualquier proceso reproductivo, como la fisión o la gemación, en la que no existe unión de gametos.

Reproducción Sexual.- Fusión de los gametos seguida por la meiosis y la recombinación genética en algún punto del ciclo vital.

Somático.- Término que se refiere a células o tejidos no relacionados con los gametos.