

## EFECTO DE DIFERENTES MÉTODOS DE DESINFECCIÓN EN EL ESTABLECIMIENTO IN VITRO DE CACAO (*Theobroma cacao* L.) EN LA ESTACIÓN EXPERIMENTAL SAPECHO - BOLIVIA

### Effect of different disinfection methods on the in vitro establishment of cocoa (*Theobroma cacao* L.) at the Sapecho Experimental Station - Bolivia

Marco Antonio Echenique Quezada<sup>1</sup>; Delcy Calle Alanoca<sup>2</sup>

#### RESUMEN

El cacao (*Theobroma cacao* L.) es un árbol perenne cultivado en zonas tropicales húmedas, de gran importancia económica para África, Asia y América Latina, su producción se ha visto limitada por el impacto de enfermedades y el bajo potencial productivo de las plantaciones. Existen clones con alto potencial productivo y tolerancia a las principales enfermedades, pero no se cuenta con un método eficiente de propagación de plantas, por lo que la embriogénesis somática se visualiza como una herramienta para la producción masiva de estos clones. El trabajo fue realizado en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Estación Experimental Sapecho, situada en el municipio de Palos Blancos del departamento de La Paz, con el objetivo de establecer in vitro, mediante explantes procedentes de los botones florales del cacao, utilizando tres métodos de desinfección. A los 14 días de haber iniciado la implantación in vitro, se evaluó la contaminación total (hongos, bacterias), 21 días más tarde, se observaron los explantes sobrevivientes y la formación de callos. Como resultado se puede mencionar que el porcentaje de contaminación por hongos y bacterias más alto fue 98.5% que se presentó utilizando el método III independiente al tipo de explante utilizado, el método de desinfección que tuvo mayor porcentaje de sobrevivencia fue el método I con 64% en estaminodios y el método II con 25% en pétalos de cacao, el mayor porcentaje de formación de callogenesis se dio con el método I y método II mediante los estaminodios con 35% y 10% respectivamente. El tipo de explante utilizado tiene gran influencia en la contaminación, sobrevivencia y formación de callos por lo que se puede indicar que el tipo de explante que presenta mejor establecimiento in vitro de cacao son los estaminodios, para la obtención de plántulas libres de enfermedades.

**Palabras clave:** *Theobroma cacao*, desinfección, estaminodios, establecimiento, in vitro.

#### ABSTRACT

Cocoa (*Theobroma cacao* L.) is a perennial tree grown in humid tropical areas, of great economic importance for Africa, Asia and Latin America, its production has been limited by the impact of diseases and the low productive potential of plantations. There are clones with high productive potential and tolerance to the main diseases, but there is no efficient method of plant propagation, so somatic embryogenesis is seen as a tool for the mass production of these clones. The work was carried out in the Plant Biotechnology Laboratory of the Sapecho Experimental Station, located in the municipality of Palos Blancos in the department of La Paz, with the aim of establishing in vitro, using explants from the flower buds of cocoa, using three methods disinfection. Fourteen days after starting the in vitro implantation, total contamination (fungi, bacteria) was evaluated. 21 days later, the surviving explants and callus formation were observed. As a result, it can be mentioned that the highest percentage of fungal and bacterial contamination was 98.5%, which was presented using method III independent of the type of explant used, the disinfection method with the highest survival rate was method I with 64% in staminodia and method II with 25% in cocoa petals, the highest percentage of callogenesis formation occurred with method I and method II using staminoids with 35% and 10% respectively. The type of explant used has a great influence on contamination, survival and callus formation, so it can be indicated that the type of explant that presents the best in vitro establishment of cocoa is staminodies, in order to obtain disease-free seedlings.

**Keywords:** *Theobroma cacao*, disinfection, staminodia, establishment, in vitro.

<sup>1</sup> Docente Investigador, Facultad de Agronomía, Universidad Mayor de San Andrés, Bolivia. manmaeq@gmail.com

<sup>2</sup> Facultad de Agronomía, Universidad Mayor de San Andrés, Bolivia. decalanoca@gmail.com

## INTRODUCCIÓN

El cacao (*Theobroma cacao* L.) es un árbol originario de América, su fruto es la base para la elaboración de chocolate y sus derivados (Borrone et al. 2007). Esta especie se cultiva en los trópicos húmedos y es fuente importante de ingresos en los países en desarrollo (Lanaud et al., 2009).

La producción mundial de cacao en la gestión 2013/2014 superó las 4104000 toneladas de granos, el 72% de esta producción se concentra en cinco países, Costa de Marfil, Ghana, Indonesia, Nigeria y Camerún. (Quispe et al. 2016). Bolivia es un actor menor en el mercado mundial de cacao, presenta una producción de 1488 TM, siendo los municipios del Norte del departamento de La Paz, donde se concentra el 81% de la producción nacional (Espinoza et al., 2014).

La región de Alto Beni, que comprende los municipios de Palos Blancos y Alto Beni del departamento de La Paz, se caracteriza por ser una zona productora de cacao orgánico, se produce aproximadamente el 60% de cacao a nivel nacional (CEIBO, 2016).

El cacao es un cultivo importante, se puede propagar por la vía sexual y asexual, para la propagación sexual la planta resultante recibe las características tanto del padre como de la madre, pero se tiene incertidumbre de las plantas resultantes. Por la vía asexual se obtienen plantas genéticamente iguales a la planta madre. Los dos métodos tienen una alta tasa de propagación (Gómez, 2010).

Actualmente en la región, la propagación sexual se da mediante la polinización natural, sus costos son bajos, pero no todas las plantas tienen características deseables, la polinización dirigida, tiene costos altos por la mano de obra que se utiliza. Por estas razones es importante buscar tecnologías que ayuden a aumentar la cantidad de plantas clonales libres de microorganismos, con características agronómicas y productivas deseables.

El cultivo de tejidos in vitro, es un conjunto de técnicas que permiten el establecimiento, mantenimiento y manipulación de cualquier parte de una planta, desde una célula hasta un organismo completo, bajo condiciones artificiales, asépticas y controladas para obtener plantas libres de patógenos, principalmente eliminando microorganismos (virus, bacterias, y hongos) presentes en los tejidos de las plantas,

utilizando diferentes productos y métodos de desinfección (Soliz et al., 2012).

La embriogénesis somática es una técnica que permite obtener clones con una arquitectura dimórfica normal y un sistema radical de gran anclaje, además de los otros potenciales que esta técnica presenta para el mejoramiento genético, intercambio y conservación de material a fin de lograr regenerar clones que mantengan características genéticas (Hidalgo, 2014).

Teniendo en cuenta los aspectos anteriormente descritos, el objetivo de este trabajo de investigación fue realizar el establecimiento in vitro del cultivo de cacao mediante explantes florales de cacao, utilizando tres métodos de desinfección en dos tipos de explantes procedentes de los botones florales del cacao.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Ubicación de la zona de estudio

La investigación fue desarrollada en el laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Estación Experimental Sapecho, dependiente de la Facultad de Agronomía de la Universidad Mayor de San Andrés, ubicado a 2 km de la localidad de Sapecho a 276 km de la ciudad de La Paz, Provincia Sud Yungas, municipio de Palos Blancos, altitud de 430 m s.n.m., latitud Sur 15° 33' 27.59", longitud Oeste 67° 20' 05.10", con temperatura media anual de 28°C y una precipitación anual promedio de 1800 mm (PDM Palos Blancos, 2012).

### Metodología

El presente trabajo de investigación fue descriptivo, se evaluó tres métodos de desinfección y el tipo de explante floral a introducir a condiciones in vitro. El medio de cultivo que se utilizó fue el planteado por Murashige y Skoog (1962) + 2 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D (Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético) + 100 mg L<sup>-1</sup> Mioinositol + 2 mg L<sup>-1</sup> Glicina + 40 g L<sup>-1</sup> de sacarosa y 6 g L<sup>-1</sup> de agar. El pH del medio se ajustó a 5.7, estos medios de cultivo se dispensaron en placas Petri (100 x 15 mm) en una cantidad de 15 ml de medio de cultivo, antes de esterilizarlo en autoclave a 121°C y 1.1 kg cm<sup>-2</sup> durante 20 min.

Los explantes utilizados para la investigación, fueron botones florales de plantas élite de cacao (Figura 1) de la Estación Experimental Sapecho, se colectaron en las primeras horas de la mañana, entre las 6:00 y 7:00 a.m.

con el fin de evitar la apertura de los mismos, éstos se colocaron en tubos de ensayo con agua fría (4 °C),

para trasladarlos de manera inmediata al laboratorio, hasta la desinfección superficial.



Figura 1. Arbol elite de cacao (Izq.), botones florales de cacao (Der).

Para la desinfección de los explantes, se emplearon los métodos propuestos por Vásquez (2017), Hidalgo (2014) y Rivera (2003), denominados como método I, II, y III respectivamente.

Los botones florales de cacao seleccionados se sometieron a dos desinfecciones. En la primera desinfección los explantes fueron lavados con agua corriente y detergente comercial por cinco minutos y luego fueron enjuagados con agua destilada (Tabla 1).

Tabla 1. Descripción de los métodos de desinfección.

Métodos de desinfección	Autor	Descripción
Método I	Vásquez (2017)	Hipoclorito de sodio al 1% de concentración durante 5 minutos.
Método II	Hidalgo (2013)	Hipoclorito de sodio de 5% de concentración durante 30 minutos.
Método III	Rivera (2003)	Hipoclorito de sodio de 5% de concentración durante 50 minutos.

En la cámara de flujo laminar se realizó una segunda desinfección, utilizando alcohol al 70% durante 30 segundos, para luego someter a los explantes a los diferentes metodos de desinfección, en todos los métodos se aplicó tres enjuagues con agua estéril antes de la siembra de los explantes en el medio de cultivo.

Como explantes para el cultivo in vitro de cacao, se utilizaron pétalos y estaminodios, que fueron aislados de los botones florales. Los botones florales cerrados

fueron seccionados con pinzas y bisturí estériles, se tomaron los botones florales desinfectados y se realizó un corte transversal a 1/3 de la base para extraer los cinco estaminodios y los cinco pétalos con mayor facilidad, los cuales se colocaron en placas Petri (100 x 15 mm), con 15 ml del medio de cultivo. En cada placa Petri se colocó cinco estaminodios y en otra placa Petri cinco pétalos, pertenecientes a un mismo botón floral, distribuidos uniformemente en toda la superficie del medio, asegurando un buen contacto de los explantes con el medio de cultivo (Figura. 2).



Figura 2. Siembra de explantes; estaminodios (Izq.) y pétalos (Der.).

Realizada la siembra, se procedió al sellado y marcado de las muestras, tomando en cuenta la fecha y el tipo de explante sembrado (estaminodio y pétalos). Fueron trasladados a la sala de incubación donde se les sometió a las siguientes condiciones: temperatura 25°C y humedad relativa de 60%, se los dejaron por 35 días en oscuridad, durante este tiempo se evaluó, el porcentaje de contaminación, porcentaje de sobrevivencia y formación de callos.

El diseño experimental utilizado fue el completamente al azar con arreglo bifactorial (Vicente, s.f.) de 3x2 (3 métodos de desinfección x 2 tipos de explante); seis tratamientos (Tabla 2) con cinco repeticiones; cada unidad experimental conformada por 10 explantes (pétalos y estaminodios). Las variables en estudio fueron; porcentaje de contaminación, porcentaje de sobrevivencia, y formación de callos.

Tabla 2. Descripción de los tratamientos.

Tratamientos	Factor A	Factor B
	Métodos de desinfección	Tipos de explante
T1	I	Estaminodios
T2	I	Pétalos
T3	II	Estaminodios
T4	II	Pétalos
T5	III	Estaminodios
T6	III	Pétalos

Para comparar las medias de los tratamientos, se aplicó el método de la Diferencia Mínima Significativa (DMS), utilizando un nivel de significancia de 0.05 y 0.01. Los hongos se detectaron por medio de la presencia de micelio y las bacterias a través de los exudados presentes en la base del explante viable es aquel que no presentó ninguna presencia de estos y presentaron formación de callos.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A los 14 días de haber iniciado la implantación in vitro, se observó una duplicación del volumen de los explantes, indicio de respuesta callogénica; sin embargo, no se evidenció formación de callos, ni cambio de color de los explantes. 21 días más tarde, se observaron formación de callogenesis de color cristalino y apariencia higroscópica.

### Porcentaje de contaminación total

Los resultados del análisis de varianza para el porcentaje de contaminación total mostró diferencias altamente significativas ( $p < 0.01$ ), entre los métodos de desinfección, tipo de explante y la interacción de ambos factores de estudio, en el establecimiento in vitro de cacao. La contaminación total presente en el establecimiento de cacao en condiciones in vitro,

depende de los métodos de desinfección y del tipo de explante que se utilice en el trabajo.

Los resultados del porcentaje de contaminación total y tipo de explante (Figura 3) mostraron que se tuvo un alto porcentaje de contaminación para el método de desinfección para el tipo de explante pétalo, hallándose menor contaminación para el tipo de explante estaminodios.

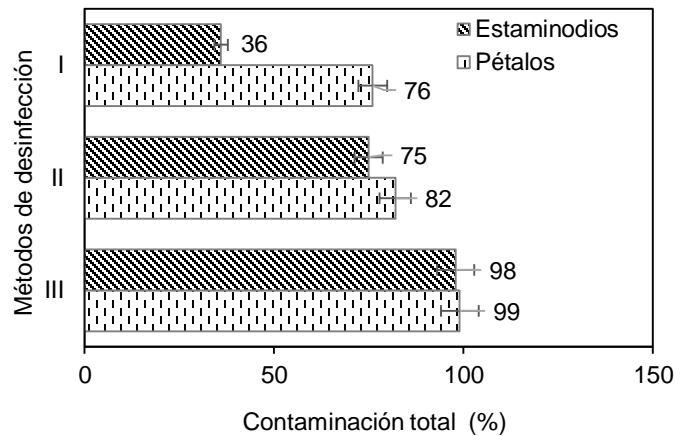


Figura 3. Porcentaje de contaminación total en los tipos de explante de cacao bajo la aplicación de tres métodos de desinfección.

Para los métodos de desinfección, por medio de la prueba (DMS), se identificaron tres grupos, el primero compuesto por los tratamientos T5 y T6 que obtuvo alta contaminación por hongos y bacterias con el 98.5%, seguido del segundo grupo correspondiente a los tratamientos T3, T2 y T4 con 77.67% de contaminación y el tercer grupo T1 con 36% de contaminación, mostrando que con la aplicación del método III en los explantes estaminodios se tiene menor contaminación.

El tratamiento con hipoclorito de sodio al 10% a un tiempo de 15 minutos, es el más apropiado para eliminar la contaminación, la concentración alta de hipoclorito de sodio puede causar la quema de los explantes y provocar oxidación. (Hidalgo, 2014). Además Rivera (2003) y Chanatásig (2004), obtuvieron 10 y 0 % de contaminación, respectivamente, usando hipoclorito de sodio al 25 % por 10 minutos.



Figura 4. Contaminación (de Izq. a Der.): estaminodios con hongo, estaminodios con bacteria; pétalos con hongos, pétalos con bacteria.

### Porcentaje de sobrevivencia

El resultado del análisis de varianza para el porcentaje de sobrevivencia, señala que se tuvo diferencias altamente significativas ( $p < 0.01$ ) entre los métodos de desinfección, tipo de explante y la interacción de ambos factores de estudio, en el establecimiento in vitro de cacao. El porcentaje de sobrevivencia en el establecimiento de cacao a condiciones in vitro, depende de los métodos de desinfección y del tipo de explantes que se utilicen en el trabajo. Los resultados del porcentaje de sobrevivencia por los métodos de desinfección y tipo de explante (Figura 5), por medio de la prueba (DMS), identificó tres grupos, el primero compuesto por el tratamiento T1 que obtuvo alta sobrevivencia con el 64%, seguido del segundo grupo correspondiente a los tratamientos T3, T2 y T4 con 22.33% de sobrevivencia y el tercer grupo T6 y T5 con el 1.5% de sobrevivencia, mostrando que se tuvo alto porcentaje de sobrevivencia para el método de desinfección I y tipo de explante Estaminodio.

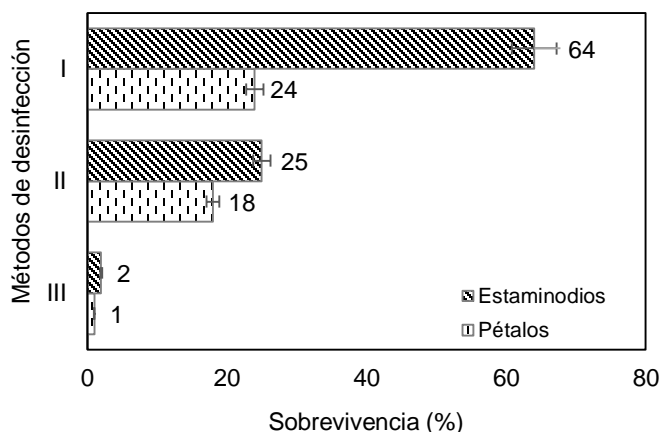


Figura 5. Porcentaje de sobrevivencia en los tipos de explante de cacao bajo la aplicación de tres métodos de desinfección.

Chanatásig, 2004, menciona que al utilizar hipoclorito de sodio (NaOCl) al 25% (v/v) durante 10 minutos se obtuvo 99% de sobrevivencia de estaminodios y 97% de sobrevivencia en pétalos, es posible que estos resultados se deban a que los explantes fueron tomados del interior del botón floral, por lo tanto es de esperar que los explantes estuvieran protegidos por el cáliz de la contaminación exterior, así como del daño que el desinfectante hubiera podido causar, Mroginski y Roca (1991), señalan que es difícil lograr cultivos completamente estériles para cualquier especie. Asimismo, Leifert et al. (1991), afirman que en diferentes estudios los explantes que han sido tomados de plantas cultivadas en el campo en climas tropicales son más difíciles y a veces imposibles de esterilizar.

### Porcentaje de formación de callos

Mediante el análisis de varianza se encontró que para el método de desinfección y la interacción de ambos factores de estudio se tuvo diferencias altamente significativas ( $p < 0.01$ ), mientras que para el tipo de explante hubo diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). El establecimiento de cacao a condiciones in vitro, depende de los métodos de desinfección y del tipo de explantes que se utilicen en el trabajo.

Los resultados del porcentaje de formación de callos por los métodos de desinfección y tipo de explante identificó tres grupos, el primero compuesto por el tratamiento T1 que obtuvo alta formación de callos con el 35%, seguido del segundo grupo correspondiente a el tratamiento T3 con 10% de formación de callos y el tercer grupo con los tratamientos T2, T4, T5 y T6 con 0% de formación de callos, mostrando que el método de desinfección I y tipo de explante estaminodios tuvieron los más altos porcentajes de formación de callos.

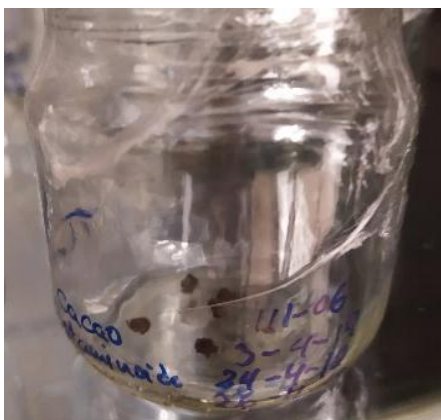


Figura 6. Inducción a formación de callos en el tipo de explante estaminodios.

La inducción a la formación de callos depende del tipo de medio de cultivo que se utilice. Hidalgo (2014), a los 40 días obtuvo el 36% de los explantes en proceso de formación de callos, el porcentaje de inducción de callos de los estaminodios a los 40 días fue de 18 % (medio MS), 60 días los porcentajes fueron de 43% (medio MS), mientras Quimbita (2011), utilizando sales MS al 50% de su concentración en el mismo lapso de tiempo consiguió un 32% de desarrollo.

## CONCLUSIONES

Se determinó que el método de desinfección del tratamiento uno (1% de concentración durante 5 minutos) mediante estaminodios es el más adecuado para la introducción de establecimiento de cacao a condiciones in vitro. El porcentaje de contaminación por hongos y bacterias más altos se presentaron en los tratamientos cinco y seis (hipoclorito de sodio al 5% de concentración durante 50 minutos) con el 98.5%, independiente al tipo de explante utilizado.

El método de desinfección que tuvo mayor porcentaje de sobrevivencia fue el método I (hipoclorito de sodio al 1% de concentración durante 5 minutos) alcanzando el 64% de establecimiento de estaminodios y el método II (hipoclorito de sodio de 5% de concentración durante 30 minutos) con 25% en pétalos de cacao. El mayor porcentaje de formación de callos se dio con el método I y método II mediante los estaminodios con 35% y 10% respectivamente.

De esta forma se establece que el mejor método de desinfección se fue con el método I (Vásquez, 2017) y el tipo de explante que presenta mejor establecimiento son los estaminodios, para la obtención de plántulas de cacao libres de enfermedades.

## BIBLIOGRAFÍA

Borrone J; Brown, S; Kuhn, N; Motamayor, J; Schnell, R. 2007. Microsatellite markers developed from *Theobroma cacao* L. expressed sequence tags (en línea). *Molecular Ecology* 7(2): 236-239. Consultado 5 may. 2020. Disponible en <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1471-8286.2006.01561.x>

CEIBO. 2016. Selecciones locales de cacao de la cooperativa el Ceibo Ltda. La Paz (en línea). Consultado 18 ago. 2019. Disponible en [https://www.eldiario.net/noticias/2016/2016\\_09/nt160922/agraria.php?n=119&-selecciones-locales-de-cacao-de-la-central-de-cooperativas-el-ceibo-l](https://www.eldiario.net/noticias/2016/2016_09/nt160922/agraria.php?n=119&-selecciones-locales-de-cacao-de-la-central-de-cooperativas-el-ceibo-l)

Chanatasig, C. 2004. Inducción de la embriogénesis somática en clones superiores de cacao (*Theobroma cacao* L.), con resistencia a enfermedades fungosas. Tesis M.Sc. Turrialba, Costa Rica. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. 86 p.

Espinoza, S; Olivera, M; Ledezma, J. 2014. Producción del cacao y del chocolate en Bolivia Datos 2010-2013 en base a encuestas a productores y empresarios chocolateros. La Paz, Bolivia. Conservación Internacional Bolivia y Conservation Strategy Fund. 58 p.

Gómez, S. 2010. Evaluación de la propagación in vitro en cinco clones promisorios de cacao (*Theobroma cacao* L.). Tesis Lic. Guatemala. Universidad de San Carlos de Guatemala. 88 p.

Hidalgo, C. 2014. Estudio preliminar para la obtención de explantes de cacao (*Theobroma cacao* L.) a través de embriogénesis somática. Tesis Lic. Daule, Ecuador. Universidad de Guayaquil. 90 p.

Lanaud, C; Fouet, O; Clément, D; Boccara, M; Risterucci, A; Surujdeo-Maharaj, M. 2009. A meta QTL analysis of disease resistance traits of *Theobroma cacao* L. (en línea). *Molecular Breeding* 24: 361-374. Consultado 5 may. 2020. Disponible en <https://doi.org/10.1007/s11032-009-9297-4>

Leifert, C; Ritchie, J; Waites, W. 1991. Contaminants of Plant Tissue and Cell Culture (en línea). *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 7: 452-469. Consultado 5 may. 2020. Disponible en <https://doi.org/10.1007/BF00303371>

Mroginski, L; Roca, W. 1991. Establecimiento de un laboratorio para el cultivo de tejidos vegetales. En: p. 1-17. W. M. Roca y L. A. Mroginski (Eds). Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Cali, Colombia. Publicación N° 151.

PDM (Plan de Desarrollo Municipal) Palos Blancos. 2012. Gobierno Autónomo Municipal de Palos Blancos. Consultora Iniciativa. La Paz, Bolivia. 429 p.

Quimbita, B. 2011. Efecto de la concentración de 2,4-D y el tipo de explante en la formación de callos embriogénicos en el cultivo in vitro de cacao (*Theobroma cacao* L.). Tesis Lic. Bayamo, Cuba. Universidad de Granma. pp. 33-43.

Quispe, J; Pérez, E; Condori, S; Arana, M. 2016. Manual de manejo de cacao. INIAF. La Paz, Bolivia.

Rivera, S. 2003. Respuesta de clones de cacao (*Theobroma cacao* L.) a la embriogénesis somática de explantes florales. Tesis Lic. Cartago, Costa Rica. Instituto Tecnológico de Costa Rica. 64 p.

Soliz, R; Olivera, J; Rafael, S; La Rosa, L. 2012. Propagación in vitro de *Carica papaya* var. PTM-331 a partir de meristemos apicales. Revista Peruana de Biología 18(3): 343-347.

Vásquez, M. 2017. Implementación de un protocolo para la obtención de callos de cacao (*Theobroma cacao* L.) con interés comercial. Tesis Lic. Quito, Ecuador. Universidad de Las Américas. 58 p.

Vicente, J. s.f. Guía Metodológica de diseños experimentales. Universidad Mayor de San Andrés, Facultad de Agronomía. La Paz, Bolivia. 221 p.

Artículo recibido en: 4 de marzo 2020

Aceptado en: 9 de junio 2020