

Micro injertación de cacao (*Theobroma cacao*) autóctono de El Salvador

Henry Omar Calderón Acuña¹ - Jacqueline Griselda Zetino Martínez²

Recepción: 16/05/2019 Aceptación: 20/07/2019

Resumen

El cultivo del cacao (*Theobroma cacao* L.), actualmente, es una alternativa sustentable en El Salvador que pretende competir en los mercados internacionales, gracias a su calidad genética y chocolatera; fino y de aroma. Sin embargo, para lograr ese objetivo, es necesario seguir investigando el comportamiento del cultivo.

Para obtener una producción chocolatera deseada es necesario partir de la variedad o accesión de cacao que se está cultivando. Tradicionalmente, la reproducción de este cultivo se realiza de forma sexual (por semilla); no obstante, esto genera un comportamiento genético no definido que produce una alteración en la calidad chocolatera. Las técnicas de reproducción asexual como la microinjertación, son una solución para garantizar calidad genética y establecimiento de viveros en poco tiempo.

Para realizar la microinjertación se probaron dos métodos, *in vitro* y en campo; en la microinjertación *in vitro*, se introdujeron yemas apicales y axilares de cacao en un medio de cultivo Murashige y Skoog, 1962 (MS) con macrosales a la mitad, 30 g/L de sacarosa, 0.3mg/L de kinetina. En la microinjertación en campo se germinaron semillas de cacao amazónico forastero, para obtener plantas patrón o portainjerto, y se recolectaron brotes o chupones ortotrópicos de diferentes accesiones de cacao de alto rendimiento, para injertarlos en las plántulas germinadas. El método más efectivo para realizar la microinjertación fue en campo, debido a que el método *in vitro* fracasó en la fase de desinfección e introducción de los explantes en el medio de cultivo.

Palabras clave: Microinjertación, injertación, planta patrón, porta injerto, brotes ortotrópicos.

Abstract

The cocoa farming (*Theobroma cacao* L.) is currently a sustainable alternative in El Salvador that seeks to compete in the international markets, thanks to its genetic quality and chocolate industry, fine and aroma. However, in order to achieve this objective, it is necessary to continue investigating the behavior of the crop.

In order to obtain a desired chocolate production, it is necessary to start from the variety or accession of cocoa that is being farmed. Traditionally, the reproduction of this crop is done sexually (by seed); however, this generates an undefined genetic behavior that produces an alteration in the chocolate quality. Asexual reproduction techniques, such as micro grafting, are a solution to guarantee genetic quality and the establishment of nurseries in a short period.

Two methods were tested for micro grafting, *in vitro* and in the field; *in vitro* micro grafting, apical and axillary cocoa buds were introduced in a Murashige and Skoog culture medium, 1992 (MS) with macro-salts in half, 30 g/L sucrose, 0.3mg/L kinetin. In the micro grafting in the field, seeds of stranger Amazonian cacao were germinated in order to obtain master plants and rootstocks, and orthotropic shoots of different accessions of high yield cocoa were collected, to graft them in the germinated seedlings. The most effective method to perform micro grafting was in the field, because the *in vitro* method failed in the phase of disinfection and introduction of explants into the culture medium.

Key words: Guava flour, raw and cooked sausage, organoleptic analysis, proximal analysis.

1. Maestría en Gestión y Gerencia Ambiental, Investigador, Facultad de Ingeniería y Arquitectura, Universidad Católica de El Salvador – El Salvador; email: henry.calderon1@catolica.edu.sv

2. Ingeniería Agronómica, Investigadora, Facultad de Ingeniería y Arquitectura, Universidad Católica de El Salvador – El Salvador; email: jackelynzetino@hotmail.com



1. Introducción

Las plantaciones de cacao se extendían a lo largo del territorio salvadoreño hasta la llegada de los españoles. Con la conquista, las plantaciones de este cultivo se focalizaron en las zonas de los municipios de Sonsonate e Izalco, departamento de Sonsonate en el occidente del país. Sin embargo, a finales del siglo XVII, la producción comenzó a disminuir por conflictos políticos y epidemias que redujeron la población indígena.

Gradualmente, el cacao fue reemplazado por el café, el algodón y la caña de azúcar y con ello, el conocimiento de producción y la capacidad técnica en el cultivo de cacao. Para el año 2014, la producción y comercialización del cacao en El Salvador no había alcanzado el auge productivo que se tenía en el periodo precolombino, ya que, básicamente, la producción se había reducido a una forma doméstica, estrictamente limitada y sin plantaciones comerciales registradas (Alianza cacao El Salvador, 2014).

El cultivo del cacao goza de mucha variabilidad genética existiendo variedades de distinto rendimiento; algunas rinden mejor debido a la compatibilidad genética que poseen con otra variedad de cacao de diferente genotipo, las cuales se reproducen por polinización o injerto (Instituto Colombiano Agropecuario, 2012). El cacao de El Salvador está considerado como fino y de aroma; lo cual constituye, junto con los países Cen-

troamericanos, una producción de cacao de 6,000 toneladas métricas de grano, de los cuales El Salvador solo produce 200 toneladas (Chinchilla y Amaya, 2012).

Tradicionalmente, el cacao se ha multiplicado a través de semilla sexual, originada por polinización natural. Algunos productores de cacao toman las semillas provenientes de mazorcas de las mejores plantas de cacao de sus parcelas, sin conocer el origen del polen, ya que la mayoría de las plantas son auto-incompatibles, por lo que necesitan del polen de otra planta de cacao diferente para ser fecundadas. Este hecho hace que se produzca mucha variación genética, entre los materiales existentes en una región determinada (Proyecto control de la moliasis del cacao, 2005). Esta variabilidad se expresa en la producción, el tamaño de los frutos, la calidad de los granos y, en su comportamiento frente a las plagas y enfermedades. Es por ello que en una plantación natural o de híbridos es difícil conseguir una producción uniforme en todos los árboles (Chanatásig, 2004).

El injerto se realiza colocando una yema de una planta muy productiva, de mejor adaptación y con mayor resistencia a las enfermedades que tantos problemas causan al cultivo del cacao. Por esa razón, el éxito de esta labor radica en la selección de la planta que dará origen a todas las copas de la parcela seleccionada (Rodríguez, 2006).

El injerto es el método más generalizado de reproducción vegetativa del cacao; se recurre a esta práctica cuando se desea reproducir fielmente las características de los árboles que se han seleccionado, evitando así la variación sobre todo en el comportamiento productivo, que normalmente ocurre con la propagación por semillas (Sandoval, Mendoza y Nabarro, 2007).

La planta producida por este método conserva las cualidades del árbol de donde se obtuvieron las yemas, en comparación con otros métodos de propagación vegetativa; este proceso permite un mayor aprovechamiento del material que se desea propagar. Cada yema extraída de un árbol seleccionado va a originar un árbol idéntico, con las mismas características, además la planta producida por injerto fructifica a más temprana edad que la planta de semilla (Proyecto control de la moliasis del cacao, 2005).

Dada la importancia del cultivo de cacao en El Salvador, la Universidad Católica de El Salvador, junto con la Universidad de El Salvador, con el apoyo de la Agencia de Los Estados Unidos para el Desarrollo Internacional (USAID por sus siglas en inglés), lanzaron el proyecto: “Desarrollo de un modelo tecnológico para el rescate, caracterización y desarrollo del potencial agroindustrial del cacao autóctono de El Salvador”; el cual aplicó la biotecnología en toda la cadena productiva

del cacao. Gracias a esta iniciativa se generó una técnica efectiva de microinjertación de cacao que ayuda a conservar y mantener la calidad genética de las variedades de cacao fino y de aroma, que se establecieron durante épocas precolombinas en el país.

2. Materiales y Métodos

Con el propósito de establecer un método efectivo de microinjertación se evaluaron dos alternativas: microinjertación *in vitro* y microinjertación en campo.

La selección del material vegetativo se realizó en finca La Sierra, municipio de San Julián departamento de Sonsonate. La finca presenta un fuerte potencial de variedades autóctonas propias del país en cuanto a producción y calidad chocolatera finas y de aroma. Como material vegetativo se seleccionaron semillas provenientes de un árbol de cacao con características amazónicas forastero, con cualidades de ser un buen patrón debido a su adaptabilidad y enraizamiento. Además, el productor seleccionó tres árboles de cacao de buena calidad y alto rendimiento para extraer brotes jóvenes ortotrópicos y varetas o yemas axilares.

Para la microinjertación *in vitro*, se preparó un medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962) con macrosales al 50%; 30 g/L de sacarosa y 0.3mg/L de kinetina. Los explantes (yemas axilares y apicales) fueron llevados

al laboratorio en donde se aplicó una desinfección con hipoclorito de sodio al 10% durante diez minutos, y alcohol al 70% por tres minutos. Luego se colocó el material al flujo laminar para introducirlos en el medio de cultivo correspondiente (ver figura 1). Se recolectaron semillas de cacao a las cuales se les aplicó una desinfección con hipoclorito de sodio al 10% durante veinte minutos, y alcohol al 70% por tres minutos. Se introdujeron en el flujo laminar para colocarlas en un medio MS simple, sin hormonas, dejándolas reposar hasta su germinación.

En la fase de microinjertación en campo, se recolectaron semillas de cacao amazónico forastero, las cuales se llevaron al labora-

torio en donde se les aplicó un tratamiento de desinfección con fungicida comercial (Azoxystrobin), tanto al sustrato (BM2) y a las semillas, después se sembraron en tubos con sustrato permaneciendo ahí hasta su germinación (ver figura 2). Luego se recolectaron varetas y brotes jóvenes o chupones ortotrópicos de diferentes accesiones de cacao de alto rendimiento; con el propósito de injertarlos en los patrones o portainjertos ya germinados (ver figura 3).

3. Resultados y Discusión

Para la prueba de microinjertación in vitro, se colocaron noventa yemas apicales y axilares de las distintas accesiones de cacao seleccio-

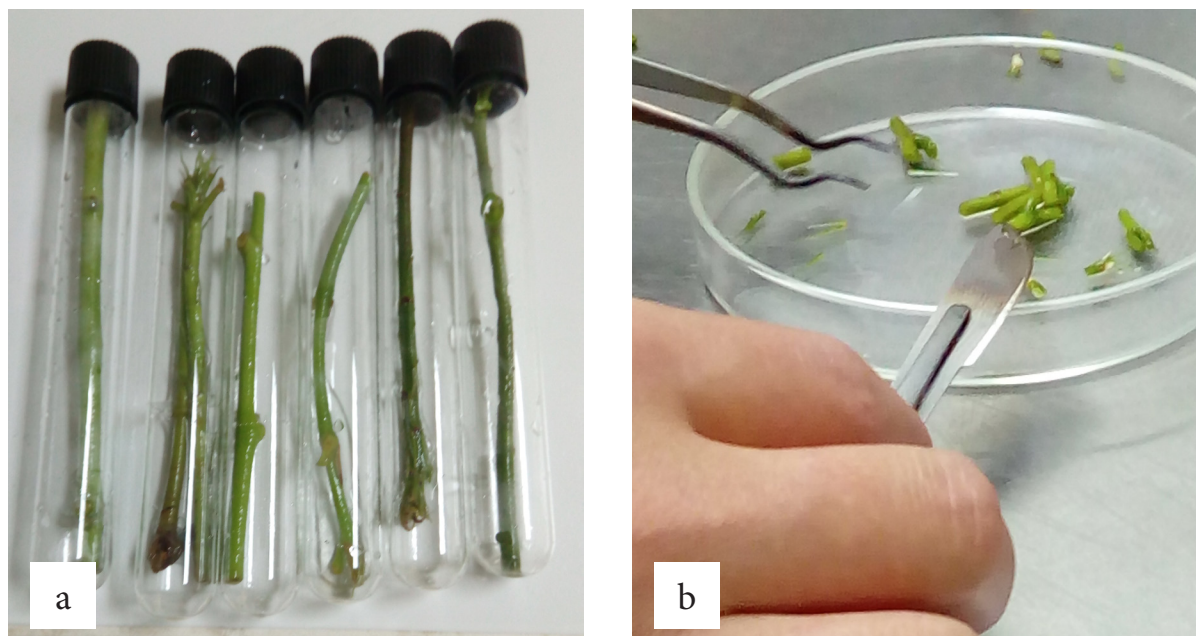


Figura 1. Proceso de recolección e introducción de yemas apicales y axilares: a) Recolección de yemas apicales y axilares de cacao; b) Introducción y disección de yemas apicales y axilares en medio de cultivo bajo flujo laminar.



Figura 2. Preparación de semillas de cacao para la siembra: a) Semilla de cacao amazónico forastero desinfectada; b) Siembra de semilla de cacao en tubos.

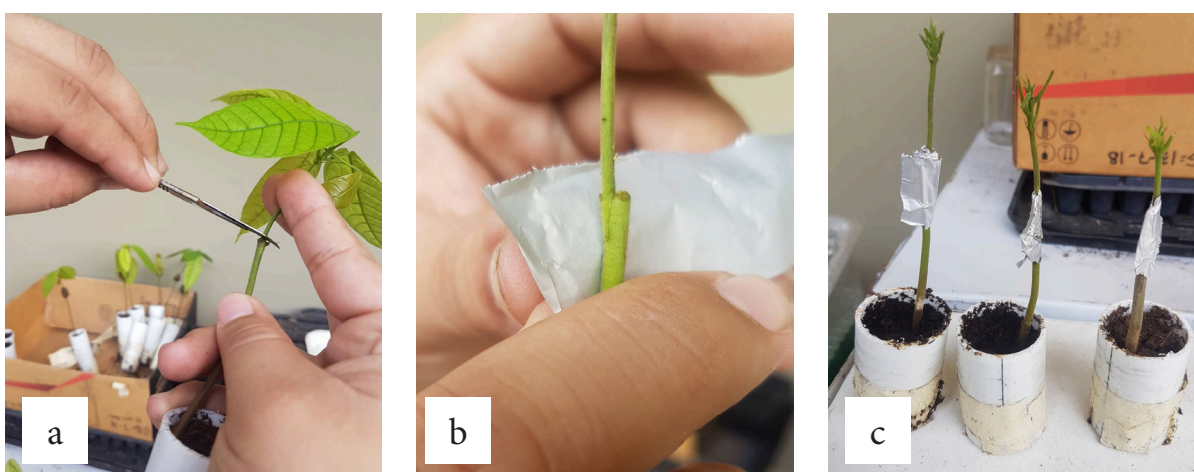


Figura 3. Proceso de Microinjertación en púa de cacao: a) Decapitación de patrón o portainjerto; b) Microinjertación de brote ortotrópico en patrón; c) Plántulas microinjertadas.

nadas por el productor, en treinta frascos con medio de cultivo, teniendo un total de diez frascos por cada accesión. Sin embargo, a los diez días de ser establecidos los tratamientos, se empezó a notar contaminación provocada por hongos y bacterias en todos los explantes. Las plantas patrón fueron germinadas en condiciones in vitro, colocando la semilla en medio de cultivo, logrando buenos resultados a los catorce días, y obteniendo plántulas formadas a los treinta días. Dados los resultados

negativos para el establecimiento de yemas apicales y axilares bajo condiciones in vitro, se optó por realizar el experimento en campo.

La prueba de microinjertación en campo se realizó sembrando 600 semillas de cacao amazónico forastero en bandeja con sustrato, en ausencia de luz durante siete días. El 80% de semillas germinó y un 20% de semillas no, dejando como resultado un total de 480 plántulas germinadas (ver figura 4).

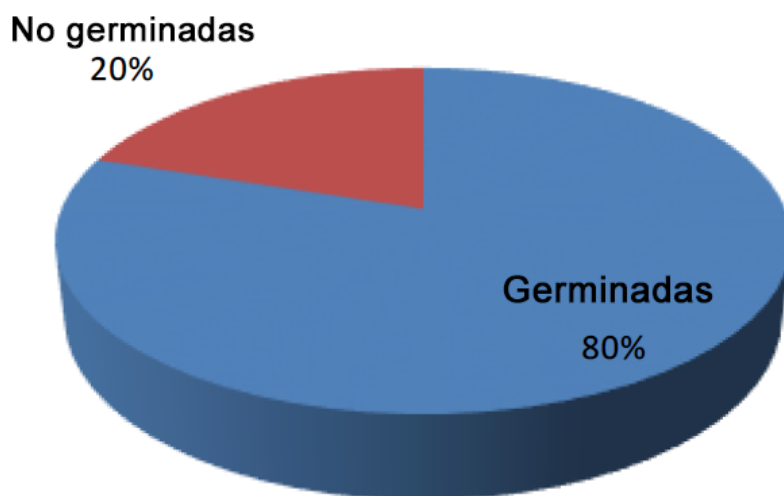


Figura 4. Germinación de semillas para plantas patrón.

A los 45 días de siembra de las plántulas patrón, se midió el diámetro de cada planta con el propósito de realizar la microinjertación; siendo la medida más apta para realizar este proceso 0.5 cm, debido a una mejor manipulación de los explantes a la hora de realizar la microinjertación. En la figura 5 se muestran cuatro tipos de medidas (0.2, 0.3, 0.4 y 0.5 cm), en donde la cantidad de plantas más representativa es para el diámetro de 0.5 cm, con un número de 202 plantas; las cuales fueron microinjertadas mediante la técnica de injertación de púa o cuña con brotes ortotrópicos de árboles de cacao de buena calidad, seleccionados por el productor de cacao.

Después de realizada la microinjertación, a los 60 días de cultivo, se hizo un conteo del número de plantas microinjertadas que lograron adaptarse. En la figura 6 se muestra

que de un número de 202 plantas microinjertadas, el 94% sobrevivió exitosamente el proceso de microinjertación.

4. Conclusiones

Los resultados que se obtuvieron en la prueba de microinjertación in vitro no fueron favorables al introducir yemas axilares y apicales en medio de cultivo, debido a que no se realizó una fumigación preventiva contra hongos y bacterias en la plantación o árbol específico antes de recolectar el material vegetativo. Esto provocó que el material que se introdujo en el medio de cultivo se contaminara a los pocos días con patógenos del lugar de recolección.

Resultados similares fueron descritos por Gómez (2010); el cual introdujo en un medio de inducción de brotes yemas de cacao, las cuales se contaminaron con microorganismos.

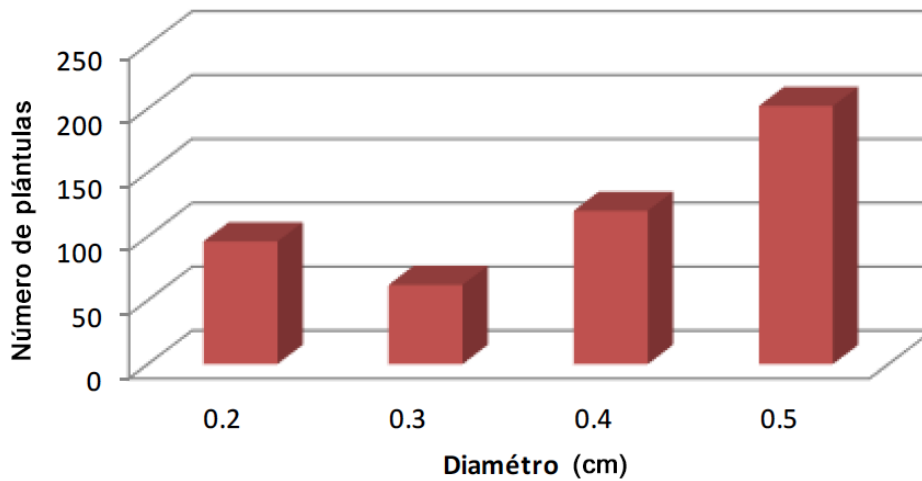


Figura 5. Diámetro de plántulas germinadas.

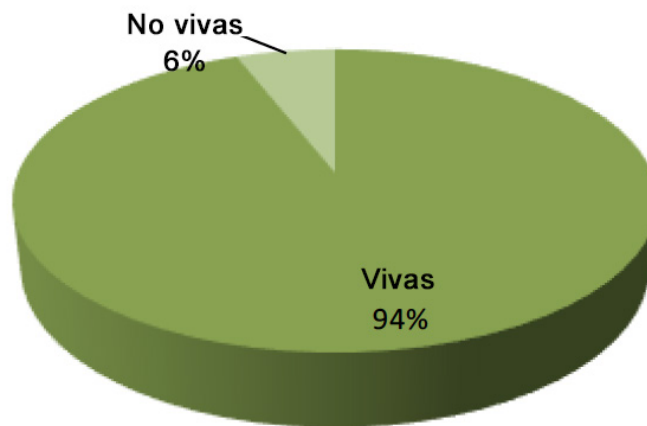


Figura 6. Supervivencia de plántulas microinjertadas.

mos: bacterias, hongos y ácaros provenientes del lugar de recolección de los explantes. Asimismo, indica que la oxidación de los explantes en el medio de cultivo es muy alta, lo que impide la formación de un nuevo tejido. Por lo que es recomendable realizar una desinfección preventiva en el lugar de recolección del material vegetativo, para luego trasladar el material al laboratorio y aplicar un método efectivo y adecuado de desinfección del ma-

terial vegetativo, que se desea introducir en medio de cultivo (Castillo, 2004).

Otra situación a considerar es el uso de carbón activado en la formulación del medio de cultivo, para prevenir la oxidación de los explantes como las yemas apicales y axilares que se desean introducir (Azofeifa, 2009). Por otra parte, la germinación de la semilla de cacao en condiciones in vitro tuvo resulta-



dos satisfactorios, empleando un método de desinfección similar al descrito por Castañeda, Gutarra, y La Rosa (2015), quienes utilizaron etanol al 70% durante treinta segundos e hipoclorito de sodio al 2.5% durante quince minutos y tres enjuagues con agua estéril. Sin embargo, la finalidad del experimento consistía en obtener plantas clónicas y no provenientes de semillas sexuales, es por ello que se optó por realizar la microinjertación en campo debido a la eficiencia, costos favorables en comparación a cultivo *in vitro*.

En la microinjertación se utilizó la metodología descrita por Somarriva *et al.* (2010), en donde se utilizó el método de microinjerto de púa terminal, el cual consiste en decapitar la planta patrón un centímetro por encima de los cotiledones y cortar el tallo por

el centro, realizando una incisión de aproximadamente tres centímetros por debajo de los cotiledones.

La preparación de las varetas se realizó identificando brotes o chupones con una coloración y grosor similar al tallo de la planta patrón, luego se realizó un corte en diagonal a cada lado formando una púa, que compagine con el corte realizado en la planta patrón (Ramos, Rivas, y Villalta, 2015). Del experimento que se realizó en campo se obtuvieron resultados favorables y satisfactorios, debido al tiempo que lleva la técnica de microinjertación en desarrollarse, en comparación al injerto tradicional y otras técnicas derivadas de la biotecnología de propagación clonar de plantas de cacao.

5. Referencias

- Alianza cacao El Salvador (2014). *Alianza cacao El Salvador*. Recuperado de <http://www.alianzacacao.org/es/page/datos-historicos>
- Azofeifa, Á. (2009). Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados *in vitro*. *Revista Agronomía Mesoamericana*, 155-156. Recuperado de http://www.mag.go.cr/rev_meso/v20n01_153.pdf
- Castañeda, S.; Gutarra, B. y La Rosa, R. (2015). Inducción *in vitro* de *Theobroma cacao* L. mediante cultivo de embriones sexuales. *Universidad Nacional Mayor de San Marcos*. Recuperado de https://www.researchgate.net/profile/Rafael_La_Rosa/publication/296668067_Introduccion_in_vitro_de_Theobroma_cacao_L_mediante_cultivo_de_embryones_sexuales/links/56d76af808aeb4638af1e1d/Introduccion-in-vitro-de-Theobroma-cacao-L-mediante-cultivo-de-embryones-sexuales.pdf

- Castillo, A. (2004). Propagación de plantas por cultivo in vitro: una biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo. *Unidad de Biotecnología, INIA Las Brujas, Uruguay*. Recuperado de <http://www.ainfo.inia.uy/digital/bitstream/item/410/1/111219220807102417.pdf>
- Chanatásig, C. (2004). *Introducción de embriogénesis somática en clones superiores de cacao (Theobroma cacao L.), con resistencia a enfermedades fungosas*. (Tesis de maestría). Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza, Turrialba, Costa Rica. Recuperado de <http://www.sidalc.net/repdoc/a0275e/a0275e.pdf>
- Chinchilla, K., y Amaya, F. (2012). Centroamérica potenciará el cacao de origen maya en Francia. *El economista*. Recuperado de <https://www.economista.net/actualidad/Centroamerica-potenciara-el-cacao-de-origen-maya-en-Francia-20151023-0046.html>
- Gómez M., S. R. (2010). *Evaluación de la propagación in vitro en cinco clones promisorios de cacao (Theobroma cacao L.)*. (Tesis de pregrado). Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala. Recuperado de <http://www.repositorio.usac.edu.gt/7139/1/T-02839.pdf>
- Instituto Colombiano Agropecuario (2012). *Manejo fitosanitario del cultivo del cacao (Theobroma cacao L.) Medidas para la temporada invernal*. Bogotá D.C Colombia: Produmedios.
- Murashige, T. y Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*, 473-497.
- Proyecto control de la moliasis del cacao (2005). *Guía práctica: Producción de plantas de cacao por injerto*. Recuperado de http://www.fhia.org.hn/downloads/cacao_pdfs/guia_produccion_de_cacao_por_injerto.pdf
- Ramos, Y. M.; Rivas G., A. T. y Villalta C., L. B. (2015). *Evaluación de diferentes técnicas de injertación en cacao (Theobroma cacao L.) y su insidencia en el prendimiento en fase de vivero*. (Tesis de pregrado). Universidad de El Salvador, El Salvador. Recuperado de <http://ri.ues.edu.sv/id/eprint/7626/1/13101584.pdf>
- Rodríguez, J. E. (2006). El injerto en la producción de cacao orgánico. *Manejo integrado de plagas y agroecología*, 101-105. Recuperado de <http://orton.catie.ac.cr/repdoc/A1849E/A1849E.PDF>



Sandoval, A., I.; Mendoza, A., I. y Nabarro P., M. (2007). Aprendiendo a injertar cacao. *Pro-DeSoC - IPADE*, 1-15. Recuperado de <https://es.slideshare.net/DenisSanchez1/aprendiendo-a-injertar-cacao>

Somarriva C., E.; Astorga D., C.; Vasquez M., N.; Cerda B., R.; Orozco A., L. y Quesada C., F. (2010). Injertación y otras técnicas de propagación del cacao. *Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza*, Turrialba, Costa Rica, 25-28. Recuperado de https://www.researchgate.net/publication/324359993_Injertos_y_otras_tecnicas_de_propagacion_del_cacao