

**UNIVERSIDAD NACIONAL
TORIBIO RODRIGUEZ DE MENDOZA DE AMAZONAS**



ESCUELA DE POSGRADO

**TESIS PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRO EN GERENCIA EN AGRONEGOCIOS.**

**PRODUCCIÓN DE EMBRIONES DE CACAO FINO DE
AROMA (*Theobroma cacao* L.) MEDIANTE
EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN EL SISTEMA DE
INMERSIÓN TEMPORAL AUTOMATIZADA (RITA®)**

Autor: Bach. Eisen Carlos Usquiza Cruz

Asesor: M.Sc. Walter Daniel Sánchez Aguilar

Registro: (...)

CHACHAPOYAS - PERÚ

2024

AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN DE LA TESIS EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL DE LA UNTRM



ANEXO 6

AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN DE LA TESIS EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL DE LA UNTRM

1. Datos de autor 1

Apellidos y nombres (tener en cuenta las tildes):

Vsquiza Cruz Eisen Carlos

DNI N°: 76620839

Correo electrónico: eisen.vsquiza.epg@untram.edu.pe

Nombre de la Maestría (X)/Doctorado (): _____

Gerencia en agrobiociencias

Datos de autor 2

Apellidos y nombres (tener en cuenta las tildes): _____

DNI N°: _____

Correo electrónico: _____

Nombre de la Maestría ()/Doctorado (): _____

2. Título de la tesis para obtener el grado académico de Maestro (X) / Doctor ()

Producción de embriones de cacao fino de aroma (Theobroma cacao L.) mediante embriogénesis somática en el sistema de inmersión temporal automatizada (RITA®)

3. Datos de Asesor

Apellidos y nombres: Sanchez Apillon Walter Damián

DNI, Pasaporte, C.E N°: 86663778

ORCID: 0000-0003-3185-6779

Datos de Co-Asesor

Apellidos y nombres: _____

DNI, Pasaporte, C.E N°: _____

ORCID: _____

4. Campo del conocimiento según Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos-OCDE, por favor ingresar al siguiente link

https://catalogos.concytec.gob.pe/vocabulario/ocde_ford.html

Ciencias agrícolas, biotecnología agrícola, biotecnología agrícola, biotecnología alimentaria

5. Originalidad del Trabajo

Con la presentación de esta ficha, el autor o autores señalan expresamente que la obra es original, ya que sus contenidos son producto de su directa contribución intelectual. Se reconoce también que todos los datos y las referencias a materiales ya publicados están debidamente identificados con su respectivo crédito e incluidos en las notas bibliográficas y en las citas que se destacan como tal.





UNTRM

REGLAMENTO GENERAL
PARA EL OTORGAMIENTO DEL GRADO ACADÉMICO DE
BACHILLER, MAESTRO O DOCTOR Y DEL TÍTULO PROFESIONAL

6. Autorización de publicación

Los titulares de los derechos de autor otorgan a la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas (UNTRM), la autorización para la publicación del documento indicado en el punto 2, bajo la *Licencia creative commons* de tipo BY-NC: Licencia que permite distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir de su obra de forma no comercial por lo que la Universidad deberá publicar la obra poniéndola en acceso libre en el repositorio institucional de la UNTRM y a su vez en el Registro Nacional de Trabajos de Investigación-RENATI, dejando constancia que el archivo digital que se está entregando, contiene la versión final del documento sustentado y aprobado por el Jurado Evaluador.

En caso de que el trabajo haya terminado en la obtención de patente, los titulares autorizan la publicación solamente del resumen o abstract de la patente, por un periodo de _____, al término de dicho periodo, se autoriza la publicación total del trabajo.

Chachapoyas, 15 de abril de 2024

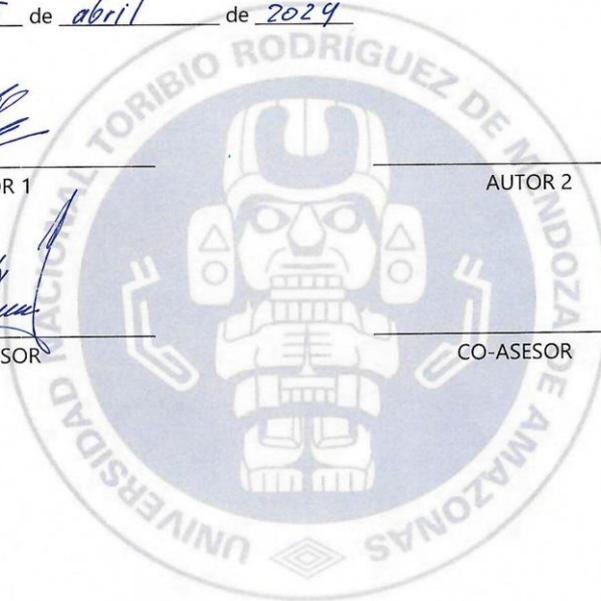


AUTOR 1

AUTOR 2

ASESOR

CO-ASESOR



DEDICATORIA

Este trabajo está dedicado a toda la comunidad científica que está en la carrera del desarrollo de conocimiento que servirá para resolver los problemas de seguridad alimentaria y biodiversidad, contribuyendo así a mejorar la calidad de vida de las personas.

También a la población de la región Amazonas que se dedica a la producción de cacao fino de aroma que sirve de sustento a muchas familias en la Amazonía.

A las comunidades indígenas que tienen por actividad principal la producción de cacao, concediendo la oportunidad de difundir la riqueza de los materiales genéticos de genotipos de cacao nativo.

A la cooperativa APROCAM que apoya y gestiona la investigación científica con fines del desarrollo para sus socios cacaoteros.

AGRADECIMIENTO

A DIOS, por darme la vida, la sabiduría a lo largo del estudio, así como la fortaleza para seguir mis retos.

A mis padres, mis hermanos por ser de apoyo moral, entusiasmo que me brindaron para seguir adelante en mis retos.

Al "Proyecto de Mejoramiento y Ampliación de los Servicios del Sistema Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación Tecnológica" 8682-PE, al "Banco Mundial", y al "FONDECYT/CONCYTEC", a través del cual se ejecutó el subproyecto "Innovación biotecnológica para la producción masiva de embriones somáticos de cacao (*Theobroma cacao* L.) fino de aroma en la región Amazonas", también conocido como "Proyecto Embriones" y que hizo posible el financiamiento de la tesis, así como el incentivo recibido durante 10 meses.

Al Instituto de Investigación, innovación y desarrollo para el sector agrario y agroindustrial (IIDAA) por el apoyo de todos los que lo conforman, incluyendo a su director el Ing. Guillermo Idrogo Vásquez, así como por la infraestructura que hizo posible la ejecución de este trabajo.

Al Instituto de Investigación para el Desarrollo Sustentable de Ceja de Selva (INDES-CES) por el apoyo de todos los que lo conforman, incluyendo a su director, el Dr. Segundo Oliva, así como por la infraestructura que hizo posible la ejecución de este trabajo.

A mi asesor de tesis M. Sc. Walter Daniel Sánchez Aguilar, por el apoyo en el desarrollo del proyecto de tesis y ejecución de esta, con sus sugerencias, experiencia y la motivación.

Al equipo técnico del proyecto "Innovación biotecnológica para la producción masiva de embriones somáticos de cacao (*Theobroma cacao* L.) fino de aroma en la región Amazonas por la confianza y el apoyo logístico.

A la Cooperativa de servicios Múltiples APROCAM por la confianza y el apoyo brindado para el acceso a sus plantaciones de cacao nativo fino de aroma, con la participación activa de su gerente general y el técnico de campo.

Gracias.

**AUTORIDADES DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL TORIBIO RODRÍGUEZ
DE MENDOZA DE AMAZONAS**

Ph.D. JORGE LUIS MAICELO QUINTANA
Rector

Dr. OSCAR ANDRÉS GAMARRA TORRES
Vicerrector Académico

Dra. MARÍA NELLY LUJÁN ESPINOZA
Vicerrectora de Investigación

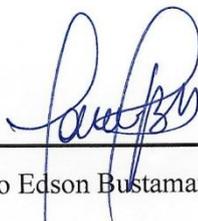
Dr. EFRAIN MANUELITO CASTRO ALAYO
Director de la Escuela de Posgrado

JURADO EVALUADOR DE LA TESIS



Dr. Carlos Eduardo Millones Chanamé

Presidente



Ph.D. Danilo Edson Bustamante Mostajo

Secretario



Dr. Segundo Manuel Oliva Cruz

Vocal

CONSTANCIA DE ORIGINALIDAD DE LA TESIS



ANEXO 3

CONSTANCIA DE ORIGINALIDAD

Los suscritos, miembros del Jurado Evaluador del Proyecto de Tesis ()/Tesis (X)/Tesis en formato de artículo científico () titulado:

Producción de embriones de cacao fino de aroma (Theobroma cacao L.) mediante embiogénesis somática en el sistema de inmersión temporal automatizada (CRITA®).

presentado por el Aspirante Eisen Carlos Viqueza Cruz para obtener el Grado Académico de Maestro (X)/Doctor () en Gerencia en agonegocios.

de la Escuela de Posgrado de la UNTRM, hacemos constar que después de revisar la originalidad del Proyecto de Tesis ()/Tesis (X)/Tesis en formato de artículo científico () con el software de prevención de plagio **Turnitin**, verificamos:



- a) De acuerdo con el informe de originalidad, el Proyecto de Tesis ()/Tesis (X)/Tesis en formato de artículo científico () tiene 18 % de similitud, que es menor al 25% permitido en la UNTRM.
- b) La persona responsable de someter el trabajo al software de prevención de plagio **Turnitin** fue: Dr. Carlos Eduardo Millones Chancame, y pertenece al área () / oficina () / dependencia (X) de Facultad de Educación y Ciencias de la Comunicación.

SE ADJUNTA:

- Resultado del informe del software **Turnitin**.

Chachapoyas, 22 de febrero del 2024

PRESIDENTE

Nombres y apellidos: Dr. Carlos Eduardo Millones Chancame

DNI: 16702744

VOCAL

Nombres y apellidos: Dr. Segundo Manuel Oliva Cruz

DNI: 05374749

SECRETARIO Ph.D.

Nombres y apellidos: Danielo Edson Bustamante Mostajo

DNI: 43496105

OBSERVACIONES:

.....
.....

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE LA TESIS



UNTRM

REGLAMENTO GENERAL
PARA EL OTORGAMIENTO DEL GRADO ACADÉMICO DE
BACHILLER, MAESTRO O DOCTOR Y DEL TÍTULO PROFESIONAL

ANEXO 5

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

En el Auditorio de la Escuela de Posgrado de la UNTRM - Chachapoyas, el día 29 de febrero del año 2024, siendo las 16:00 horas, el Aspirante Eisen Carlos Usquiza Cruz, cuyo asesor es MSC. Walter Daniel Sánchez Aguilar, defiende en sesión pública presencial la Tesis titulada: Producción de embriones de cacao fino de aroma (Theobroma cacao L.) mediante embriogénesis somática en el sistema de inmersión temporal automatizada (RITA®) para obtener el Grado Académico de Maestro () / Doctor () en Gerencia en Agronegocios, a ser otorgado por la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas; ante el Jurado Evaluador, conformado por:

Presidente: Dr. Carlos Eduardo Millones Chaname
Secretario: PhD. Danilo Edson Bustamante Mostajo
Vocal: Dr. Segundo Manuel Oliva Cruz



Luego de la sustentación y absueltas las preguntas del Jurado Evaluador se procedió a la calificación individual y secreta, teniendo el resultado de:

Aprobada () / Desaprobada () por Unanimidad () / Mayoría () .

Otorgada la calificación, el Secretario del Jurado Evaluador lee la presente Acta en esta misma sesión pública. A continuación, se levanta la sesión.

Siendo las 17:55 horas del mismo día y fecha, el Jurado Evaluador concluye el acto de sustentación de la Tesis.

PRESIDENTE Dr. Carlos Eduardo Millones Chaname
Nombres y apellidos: Carlos Eduardo Millones Chaname
DNI: 16702744

VOCAL Dr. Segundo Manuel Oliva Cruz
Nombres y apellidos: Segundo Manuel Oliva Cruz
DNI: 08374749

SECRETARIO Ph.D. Danilo Edson Bustamante Mostajo
Nombres y apellidos: Daniilo Edson Bustamante Mostajo
DNI: 43496105

ÍNDICE GENERAL

AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN DE LA TESIS EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL DE LA UNTRM.....	ii
DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTO.....	v
AUTORIDADES DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL TORIBIO RODRÍGUEZ DE MENDOZA DE AMAZONAS	vi
JURADO EVALUADOR DE LA TESIS	vii
CONSTANCIA DE ORIGINALIDAD DE LA TESIS.....	viii
ACTA DE SUSTENTACIÓN DE LA TESIS.....	ix
ÍNDICE GENERAL.....	x
ÍNDICE DE TABLAS.....	xii
ÍNDICE DE FIGURAS	xiv
RESUMEN	xv
ABSTRACT.....	xvi
I. INTRODUCCION.....	17
II. MATERIAL Y MÉTODOS	19
2.1. Evaluación de tiempos de inmersión, medios de cultivo en RITA® de embriones somáticos de cacao fino de aroma.	19
2.1.1. Obtención de material vegetativo	19
2.1.2. Disección de botones florales	21
2.1.4. Obtención de embriones por embriogénesis secundaria.....	23
2.1.5. Determinación de mejor medio de cultivo y frecuencia de inmersión, utilizando el sistema de inmersión temporal RITA en el desarrollo embrionario y regeneración a planta.	23
2.3. Análisis de la viabilidad económica	26
2.4. Análisis de datos	30
III. RESULTADOS	34
3.1. Evaluación tiempos de inmersión, medios de cultivo en RITA® y porcentajes de sombra en climatización de embriones somáticos de cacao fino de aroma.....	34
3.1.5. Ensayo regeneración a planta -variables; Transformación a planta, frecuencia de inmersión y medios de cultivo.	43

3.1.6. Ensayo regeneración a planta -variables; sobrevivencia, frecuencia de inmersión y medios de cultivo	45
3.2. Análisis de la viabilidad económica de la producción masiva de embriones somáticos de cacao fino de aroma empleando el sistema de inmersión temporal automatizada RITA®.....	47
3.2.1. Producto	47
3.2.2. Plantines de cacao <i>in vitro</i> de 2 meses.....	47
3.2.3. Productos sustitutos o similares	47
3.2.4. Productos complementarios	47
3.2.5. Análisis de la demanda	47
3.2.6. Estrategia de promoción	49
3.2.7. Diagnóstico de la situación actual del proceso productivo.....	49
3.2.9. Inversión	49
3.2.10. Costos y gastos.....	53
3.2.11. Estado de ganancias y perdidas	58
3.2.13. Flujo de caja económico	60
3.2.14. Indicadores de rentabilidad.....	60
IV. DISCUSIÓN.....	62
V CONCLUSIONES.....	65
VI. RECOMENDACIONES	66
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	67
Anexos	74
Anexo 1: Tablas de estadísticos de los ensayos.....	74
Anexo 2: Validación de encuestas para estudio de Mercado.....	81
Anexo 3: Protocolo de producción de plantas por embriogénesis somática secundaria en RITA.	87

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	<i>Procedencia y localización de los genotipos de cacao nativo fino de aroma empleados en el estudio.</i>	20
Tabla 2.	<i>Medios de cultivo desarrollo embrionario (ED).</i>	25
Tabla 3.	<i>Medios para regeneración a planta para 1 litro.</i>	25
Tabla 4.	<i>Método de Tukey para la variable frecuencia de inmersión temporal en 24 horas</i>	41
Tabla 5.	<i>Método de Tukey para la variable medio de cultivo en la regeneración.</i>	41
Tabla 6.	<i>Método de Tukey para los datos de la variable frecuencia de inmersión en el medio de cultivo en 24 horas.</i>	43
Tabla 7.	<i>Método de Tukey para los datos de la variable medio de cultivo en transformación de planta.</i>	43
Tabla 8.	<i>Método de Tukey para las variables frecuencia de inmersión *medio de cultivo en la transformación a planta.</i>	44
Tabla 9.	<i>Método de Tukey y una confianza de 95% para la variable medio de cultivo en la regeneración a planta.</i>	46
Tabla 10.	<i>Consulta de intención de compra de plantines de cacao ex vitro.</i>	48
Tabla 11.	<i>Estadísticos descriptivos de la cantidad de la cantidad de plantines que compraría</i>	48
Tabla 12.	<i>Demanda potencial -Demanda efectiva-Brecha demanda oferta de plantines de cacao.</i>	48
Tabla 13.	<i>Total, Terrenos y Obras Civiles necesarios para la producción de plantines in vitro de cacao.</i>	50
Tabla 14.	<i>Equipos, Muebles, materiales necesarios para la producción de plantines de cacao.</i>	50
Tabla 15.	<i>Inversión fija intangible para la producción de plantines de cacao.</i>	51
Tabla 16.	<i>Remuneraciones del personal que producirá y comercializará los plantines de cacao.</i>	51
Tabla 17.	<i>Consolidado de materias primas e insumos para la producción de plantines de cacao.</i>	52
Tabla 18.	<i>Capital de trabajo proyectado a 5 años para producir plantines de cacao.</i>	52
Tabla 19.	<i>Estructura de la Inversión para la producción de plantines de cacao.</i>	53

Tabla 20.	<i>Costeo de servicios básicos para la comercialización de plantines de cacao.....</i>	53
	Los útiles de oficina y limpieza se considero para el primer año de operaciones con un total de S/1000 como se muestra en la Tabla 22.....	54
Tabla 21.	<i>Útiles de oficina y limpieza para las oficinas encargadas de la administración y comercialización de los plantines de cacao.</i>	54
Tabla 22.	<i>Costos de materia prima para la producción de plantines de cacao.</i>	54
Tabla 23.	<i>Gastos de venta de los plantines de cacao.</i>	55
Tabla 24.	<i>Otros costos indirectos.</i>	56
Tabla 25.	<i>Gastos de operación de la comercialización de los plantines de cacao. .</i>	56
Tabla 26.	<i>Costos de producción proyectados en 5 años de producción de plantines de cacao. 57</i>	57
Tabla 27.	<i>Depreciación del activo fijo tangible y amortización intangibles de la producción de plantines de cacao.</i>	57
Tabla 28.	<i>Costos totales de producción y comercialización de plantines de cacao. 58</i>	58
Tabla 29.	<i>Cronograma de producción de plantines de cacao</i>	59
Tabla 30.	<i>Ingresos por la venta de plantines de cacao.....</i>	59
Tabla 31.	<i>Estado de resultados de la producción y venta de plantines de cacao.....</i>	59
Tabla 32.	<i>Flujo de caja económico de la producción de plantines de cacao.</i>	60
Tabla 33.	<i>Indicadores de rentabilidad de la producción de plantines de cacao.....</i>	61

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1.</i>	Obtención de material vegetativo.	20
<i>Figura 2.</i>	Proceso de desinfección y disección de los botones florales de cacao.....	21
<i>Figura 3.</i>	Establecimiento de estaminodios de botones florales de cacao.....	22
<i>Figura 4.</i>	Embriones producidos por embriogénesis indirecta secundaria con 30 días en medio ED4+PEG sub cultivados cada 15 días.....	23
<i>Figura 5.</i>	Embriones instalados en los RITAS.	24
<i>Figura 6.</i>	Embriones somáticos de cacao en sistema de inmersión automatizado (RITA) bajo dos frecuencias de inmersión.	25
<i>Figura 7.</i>	Embriones de genotipo ABL03 en sistema RITA, mantenidos a 25 °C de temperatura y fotoperiodo 10/14 horas Luz/oscuridad.	34
<i>Figura 8.</i>	Gráfico de medias de la variable biomasa y frecuencia de inmersión.....	35
<i>Figura 9.</i>	Gráfica de cajas de la biomasa en diferentes medios de cultivo.....	36
<i>Figura 10.</i>	Embriones del genotipo ABL03 desarrollados en Sistema RITA por 1 mes en 3 medios diferentes	36
<i>Figura 11.</i>	Figura de cajas del diámetro y la frecuencia de inmersión en el ensayo de desarrollo embrionario.....	37
<i>Figura 12.</i>	Figura de cajas del diámetro de los embriones en relación con el medio de cultivo.	38
<i>Figura 13.</i>	Figura de cajas de las medias de las plantas transformadas en relación con la frecuencia de inmersión.	39
<i>Figura 14.</i>	Embriones transformados a plantas en tres medios de cultivo para desarrollo embrionario.....	40
<i>Figura 15.</i>	Plantas en sistema RITA en 6 meses a 25° C en condición de 10 horas de luz y 14 horas de oscuridad.....	42
<i>Figura 16.</i>	Gráfico de intervalos de biomasa en relación con la frecuencia de inmersión y tres medios de cultivo	42
<i>Figura 17.</i>	Embriones del genotipo ALB03 en medio de cultivo M2 en las frecuencias F2 y F1 por el periodo de 6 meses.....	44
<i>Figura 19.</i>	Grafica de cajas de la sobrevivencia de embriones en relación con la frecuencia y tres medios de cultivo.....	46

RESUMEN

El cacao (*Theobroma cacao* sp.) es uno de los productos bandera que exporta el Perú, sin embargo, presenta problemas en la obtención y propagación de semilla de plantas elites en grandes cantidades. En la multiplicación masiva de cacao criollo nativo fino de aroma a través de la embriogénesis somática secundaria en sistema de inmersión temporal en recipientes (RITA®) tuvo como objetivo determinar: mejor medio de cultivo, tiempo de inmersión adecuado y viabilidad económica; el estudio se condujo bajo un diseño completamente al azar para los ensayos de desarrollo embrionario, regeneración a planta, donde se estimaron parámetros de biomasa, diámetro longitudinal, frecuencia de inmersión y medios de cultivo. También se realizó el análisis de viabilidad económica de la producción de embriones. Los datos se analizaron mediante pruebas paramétricas y no paramétricas (al 95 % de confianza). Encontrándose significancia para diámetro y biomasa en tiempo de inmersión de 10 veces por 1 minuto al día con medio M3 y M2 en la transformación a planta. Se concluye que los mejores parámetros fueron la frecuencia 1, medio M2. La producción de embriones es rentable: costo beneficio (0.95) VAN (S/ 38,544.49) índice de rentabilidad (5.17) y TIR (29%) todo esto con el precio de venta de S/ 2.5 por planta.

Palabras clave: Embriogénesis, micropropagación, RITA, cacao, rentabilidad

ABSTRACT

Cocoa (*Theobroma cacao* sp.) is one of the flagship products that Peru exports, however, it presents problems in obtaining and propagating seeds from elite plants in large quantities. In the massive multiplication of native fine aroma Criollo cocoa through secondary somatic embryogenesis in a temporary immersion system in containers (RITA®) the objective was to determine best culture medium, adequate immersion time and economic viability; The study was conducted under a completely randomized design for embryonic development and plant regeneration trials, where parameters of biomass, longitudinal diameter, immersion frequency and culture media were estimated. The economic viability analysis of embryo production was also carried out. Data were analyzed using parametric and non-parametric tests (at 95% confidence level). Significance was found for diameter and biomass in immersion time of 10 times for 1 minute per day with M3 and M2 medium in the transformation to plant. It is concluded that the best parameters were frequency 1, medium M2. The production of embryos is profitable: cost benefit (0.95) NPV (S/ 38,544.49) profitability index (5.17) and IRR (29%) all this with the sale price of S/ 2.5 per plant.

Keywords : Embryogenesis, micropropagation, RITA, cacao, profitability

I. INTRODUCCIÓN

El cacao (*Theobroma cacao*) es un cultivo agrícola económicamente muy importante para millones de personas en todo el mundo, siendo el sustento de 40 millones de personas (Beg et al., 2017) y cultivado por seis millones de pequeños productores (Díaz-Valderrama et al., 2020). De los tres grupos genéticos de cacao, el criollo es apreciado por su sabor superior, con el cual se produce los chocolates de fino sabor; estos representan del 5% al 10% de la producción mundial de chocolate (Rusconi & Conti, 2010).

El Perú es uno de los principales productores y exportadores de cacao fino de aroma, en el año 2019 alcanzó una producción récord de 135.9 mil toneladas, contribuyendo la región Amazonas con el 4%, lo cual representa 5.1 mil toneladas (Ministerio de Agricultura y Riego, 2020). Estos cacaos son empleados en la elaboración de los más exquisitos chocolates del mundo debido principalmente a sus características organolépticas y finura de aromas superiores que le han permitido al cacao peruano ser reconocido internacionalmente (Chía et al., 2017) y cuya demanda por la industria internacional va en aumento (World Cocoa Foundation, 2014; Squicciarini y Swinnen, 2016) esperándose una producción mundial del 18% (World Cocoa Foundation, 2017).

Esta demanda de cacao ha favorecido la ampliación de nuevas parcelas productivas en el Perú, siendo las regiones productoras más importantes San Martín, Junín, Ucayali, Huánuco y Cusco (Saldaña, 2019). Sin embargo, no se dispone de material vegetal élite de elevada pureza genética y libre de enfermedades, suficiente para hacer frente a este reto. Las plantas instaladas en las parcelas son susceptibles a estrés biótico (plagas y enfermedades) como la moniliasis y la escoba de bruja (Almeida et al., 2017) presentan recombinación genética debido a la polinización mixta o cruzada del cacao predominantemente entomófila (Arciniegas y Cerda, 2019) y han sido propagadas por métodos vegetativos para mantener a la población genéticamente estable, de los cuales los injertos son los más utilizados (Miguelé-Sierra et al., 2017). También afectan al cultivo la falta de material mejorado y buenas prácticas agrícolas (Zhang y Motilal, 2016).

La propagación tradicional de plantas de cacao en el Perú es realizada a través de semilla botánica, por estacas y por injertos (Zamora et al., 2022) ha dado como resultado la obtención de semilla heterogéneas o escasa disponibilidad de material vegetativo durante

todo el año (Esan, 1992; Arthur et al., 2017; López et al., 2015). En este sentido, diferentes técnicas como la micropropagación por organogénesis y embriogénesis somática han revelado ser útiles para contrarrestar a la heterogeneidad y escasas de semilla (Shires et al., 2017). Se ha evidenciado también que mediante embriogénesis somática secundaria se genera mayor número de explantes (Lázaro et al., 2015; Ramírez et al., 2018) y que para potenciar su inducción se han complementado los medios de cultivo suplementados con reguladores como la kinetina, ácido 2,4-diclorofenoxiacético, entre otros a diferentes concentraciones (Ajijah et al., 2016) con los cuales se tiene mejores resultados en la embriogénesis somática.

De otro lado, la propagación masiva de cacao mediante el sistema de inmersión temporal automatizada ha demostrado tener efectividad en medio de cultivo líquido que en sólido y semisólido (Peña et al., 2016), con frecuencias de inmersión de 6 veces por día a 1 minuto de inmersión (Niemenak et al., 2008). Así como en la obtención de callo friable (Alemanno et al., 1996) y embriones, obteniendo hasta 150 embriones somáticos por RITA®, con promedio de 15 embriones por explante (Peña et al., 2016). Los sistemas RITA® son utilizados para la propagación masiva de embriones (Kryukov et al., 2022) y la alta frecuencia de formación puede reducir los costos de producción de plántulas de cacao (Ramírez et al., 2018).

Aunque ahora es posible la producción de embriones somáticos de varios cultivares y genotipos, llamados protocolos de producción de cacao (López et al., 2015; Garcia et al., 2018; Ramírez et al., 2018). Sin embargo, todavía existe la dificultad de producción masiva de cacao, en relación a la transformación a plántulas (Henaó & Urrea, 2020). La diversidad de genotipos es la gran limitante para la producción masiva de plántulas debido a que no existe un protocolo universal de producción de plántulas de cacao *in vitro*, siendo de poca ayuda los protocolos existentes, para los laboratorios de biotecnología comercial (Henaó & Urrea, 2020).

En este contexto, el presente trabajo de investigación tiene como objetivos evaluar tiempos de inmersión, medios de cultivo en RITA® y analizar la viabilidad económica de la producción masiva de embriones somáticos de cacao fino de aroma empleando el sistema de inmersión temporal automatizada RITA®. El establecimiento de los protocolos de transformación a planta de los embriones contribuirá a la producción masiva de plantas de cacao.

II. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Evaluación de tiempos de inmersión, medios de cultivo en RITA® de embriones somáticos de cacao fino de aroma.

2.1.1. Obtención de material vegetativo

El material vegetativo se obtuvo de plantas madre de 5 a 6 años de edad, ubicadas en el distrito de Copallín (793213.80 E y 9380197.10 N, zona 17S) y del jardín clonal de APROCAM ubicado en el distrito de la Peca (784076.60 E y 9382235.60 N, zona 17S) provincias de Bagua, región Amazonas. La procedencia y localización de los genotipos en estudio se muestran en la Tabla 1. La selección y propagación de las plantas élites de cacao en los jardines clonales lo realizó la cooperativa de servicios múltiples APROCAM dedicada a la exportación de cacao tomando en cuenta aquellos que presentaban mejores puntajes en parámetros agronómicos (resistencia a enfermedades, pureza genética, rendimiento, entre otros) y en calidad organoléptica (sabor, aroma, etc.). Esto fue realizada por catadores internacionales, ocho de los genotipos seleccionados fueron validados mediante un análisis sobre sus compuestos volátiles por cromatografía gaseosa acoplado a un sensor de masa (GC-MS, Agilent) (Gonza , 2022), utilizándose estos genotipos élites de cacao nativo fino de aroma como material vegetal en el presente estudio. Cuyos botones florales fueron colectados en horarios de 7:00 a 9:00 am, (Li et al., 1998; Luis et al., 2016; Garcia et al., 2018) y colocados en tubos falcón de 50 mL conteniendo agua miliQ estéril y colocados a temperatura 4 -7 °C (Figura 1). Posteriormente fueron llevados al Laboratorio de Fisiología y Biotecnología Vegetal (FISIOBVEG) donde se procedió a su disección.

Tabla 1. *Procedencia y localización de los genotipos de cacao nativo fino de aroma empleados en el estudio.*

Genotipos	Procedencia	Coordenadas Geográficas		Altitud (msnm)
ABL03	Jardín clonal	9373375.3	789669	1086
ABL01	Jardín clonal	9373430	0789708	1086
JBB1	Jardín clonal	9377919	0786438	1058
SCH3	Jardín clonal	9378178	0785274	945
MRC05	Planta madre y Jardín clonal	9371517	0787562	918



Figura 1. Obtención de material vegetativo, A) Planta madre del genotipo MRC05, B) Botones florales del genotipo MRC05, C) Recolección de botones florales, D) Botones florales recolectados en tubos falcón de 50mL en agua fría estéril.

2.1.2. Disección de botones florales

Los botones florales se desinfectaron con hipoclorito de calcio (Granulado al 70 %) a 50 mg por 100 mL por 25 minutos en cámara de flujo laminar (Söndahl et al., 1993; Lázaro et al., 2015; Luis et al., 2016), posteriormente estos se enjuagaron con agua tipo II. Los botones se colocaron en una placa de Petri estéril donde se fueron colocando de 5 en 5 en otra placa de Petri En esta placa se procedió a cortar de forma transversal a los botones florales a la altura de 1/3 del botón. Posteriormente con ayuda de pinzas y bisturí se separó a los estaminodios de las demás piezas florales (Figura 2).



Figura 2. Proceso de desinfección y disección de los botones florales de cacao. A) Botones florales en solución de hipoclorito de calcio. B) Botones florales ya esterilizados. C) Botón floral diseccionado. D) Estaminodios.

2.1.3. Obtención de embriones por embriogénesis primaria

Los medios de cultivo y soluciones se prepararon de acuerdo con García et al. (2018) el cual también se tomó como base para inducción de callos primarios y secundarios. Los estaminodios fueron sembrados en medio (PCG) a una densidad de 25 estaminodios por placa e incubados por 15 días a 27°C en oscuridad. Después de haber transcurrido los 15 días en PCG se transfirió los callos a medio de inducción a callo secundario (SCG) se incubó por 15 días a 27°C en oscuridad (Figura 3 B). Posteriormente se transfirió los callos a medio desarrollo embrionario (ED4) con osmoregulador Polietilenglicol (PEG) a concentración de 10 % por litro, se incubó por 15 días a 27 °C en oscuridad. Los callos se transfirieron a medio ED4 +PEG por 3 veces. Una vez que aparecieron los embriones globulares o inicios de torpedo, estos se transfirieron a medio desarrollo embrionario con 30 gramos de glucosa (ED3) por 15 días incubados a 27 °C en oscuridad. Los embriones llegaron hasta estadio cotiledonal en medio ED3.

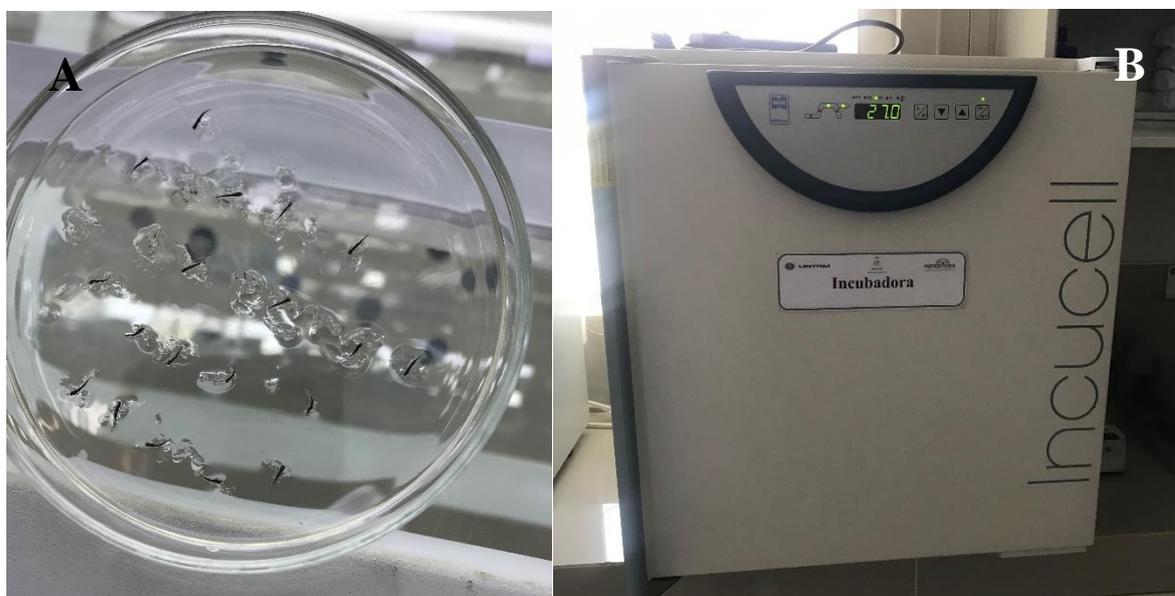


Figura 3. Establecimiento de estaminodios de botones florales de cacao. A) En medio de cultivo para inducción a callo primario (PCG). B) Incubación a 27°C.

2.1.4. Obtención de embriones por embriogénesis secundaria

Los embriones que se obtuvieron por embriogénesis primaria en estadio cotiledonal fueron cortados en 3 de forma transversal, posteriormente fueron transferidos a medio SCG e incubados por 15 días a 27 °C en oscuridad, con la finalidad de inducir a callo secundario. Al transcurrir los 15 días se transfirieron a medio ED4+PEG a 27 °C en oscuridad con la finalidad de obtener embriones por embriogénesis secundaria (Figura 4). Los callos fueron colocados en medio ED4+PEG 3 veces con periodos de 15 días por cambio.



Figura 4. Embriones producidos por embriogénesis indirecta secundaria con 30 días en medio ED4+PEG sub cultivados cada 15 días.

2.1.5. Determinación de mejor medio de cultivo y frecuencia de inmersión, utilizando el sistema de inmersión temporal RITA en el desarrollo embrionario y regeneración a planta.

Los embriones obtenidos por embriogénesis secundaria fueron colocados en los RITA (Figura 6) a densidad de 10 embriones por RITA (Figura 5) con medios de cultivo: M1 (Peña et al., 2016), M2 (García et al., 2018) y M3 (Niemenak et al., 2008) (Tabla 2) y colocados al sistema de aireación automatizado por 1 minuto a 2 frecuencias de inmersión (6 y 8 veces en 24 horas) (Figura 6) a 25° C y fotoperiodo de 9/15 horas oscuridad/luz. Este proceso se mantuvo este sistema por 30 días para lograr su desarrollo embrionario.

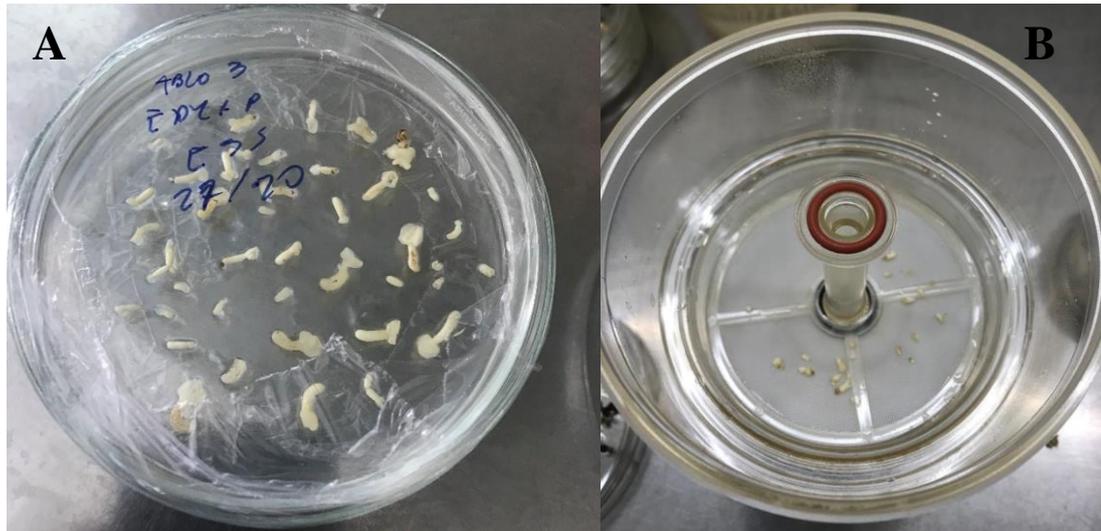


Figura 5. Embriones instalados en los RITAS. A) Embriones seleccionados. B) Embriones en los RITAS.

El ensayo de regeneración a plántulas los embriones estuvieron cultivados en medio ED3 por 30 días sugerido por Garcia et al., (2018). Estos embriones fueron sometidos a tres medios de cultivo enriquecidos con aminoácidos para su regeneración a planta: M1 (Peña et al., 2016), M2 (Garcia et al., 2018), M3 (Niemenak et al., 2008) (Tabla 3). Estos fueron cultivados por 90 días con cambios de medios mensuales, con los mismos parámetros de frecuencia de inmersión, temperatura y fotoperiodo del ensayo anterior.



Embriones somáticos de cacao en sistema de inmersión automatizado (RITA) bajo dos frecuencias de inmersión.

Tabla 2. *Medios de cultivo desarrollo embrionario (ED).*

Medio 1		
Componente	Unidad	Para 1000 mL
DKW Maco	mililitros	100
DKW macro b	mililitros	100
DKW micro c	mililitros	10
DKW vitaminada	mililitros	1
Glucosa (DEXTROSA)	gramos	10
Sacarosa	gramos	5
Glutamina	mg	250
KNO ₃	mg	3
Medio 2		
Componente	Unidad	Para 1000 mL
Solution DKW A	mL	100
Solution DKW B	mL	100
Micro Solution DKW	mL	10
Vitamin Solution DKW	mL	1
Sacarosa	g	30
Medio 3		
Componente	Unidad	Para 1000 mL
Solution DKW A	mL	100
Solution DKW B	mL	100
Micro Solution DKW	mL	10
Vitamin Solution DKW	mL	1
Sacarosa	gramos	30
Glucosa (DEXTROSA)	gramos	1

Tabla 3. *Medios para regeneración a planta para 1 litro.*

Medio 1		
Componente	Unidad	Cantidad
Solution DKW A	mL	100
Solution DKW B	mL	100
Micro Solution DKW	mL	10
Vitamin Solution DKW	mL	1
Amino acid solution	mL	1
Glucosa (DEXTROSA)	gramos	10
Sacarosa	gramos	5
Glutamina	mg	250
kno ₃	mg	3
Medio 2		
Componente	Unidad	Cantidad
Solution DKW A	mL	100

Solution DKW B	mL	100
Micro Solution DKW	mL	10
Vitamin Solution DKW	mL	1
Amino acid solution	mL	1
Glucose (DEXTROSA)	g	20
KNO3	g	0.3

Medio 3

Componente	Unidad	Cantidad
Solution DKW A	mL	100
Solution DKW B	mL	100
Micro Solution DKW	mL	10
Vitamin Solution DKW	mL	1
Amino acid solution	mL	1
Sacarosa	gramos	30
Glucosa (DEXTROSA)	gramos	1

2.3. Análisis de la viabilidad económica

2.3.1. Análisis del entorno

Se realizó la descripción del sector analizando el medio externo e interno con la técnica (AMOFIT) (Schmidt y Van de Walle, 2022). Mediante la investigación de información de fuentes primarias y secundarias en Google académico, revistas indexadas, revistas de citas en cacao, servicios de información, estadísticas del gobierno peruano y organismos mundiales dedicados a la seguridad alimentaria (Salman y Al-Omari, 2022).

2.3.2. Producto

Se realizó la descripción del producto (Plántulas comerciales) detallando las características físicas y agronómicas, descripción de cuidados, productividad y bondades (Wang et al., 2022). Este producto es libre de enfermedades e insectos, con buen rendimiento en taza y características organolépticas. Además la información de las características fisicoquímicas de los genotipos ABL03 se elaboró con los datos de fuente primaria de la cooperativa APROCAM y de los análisis realizados por la investigación de (Gonza Chapa, 2022).

2.3.4. El análisis de la demanda

La segmentación de mercado se rigió a los socios de APROCAM. Para ello, se realizó una encuesta para conocer la demanda objetivo, la cual fue validada por dos profesionales expertos en el sector (Fernández, 2010). Se tomo 400 socios como población total, el Z alfa a 95% con el valor de 1.96 y el margen de error del 5%, teniendo como resultado redondeado de 30 socios a los que se les aplicó las encuestas encuestas.

$$n = \frac{Z_{(1-\alpha)/2}^2 P Q N}{\varepsilon^2 (N - 1) + Z^2 P Q}$$

Donde:

n=Tamaño de muestra

N: Población total=400 familias

Z: Margen de seguridad valor de Tabla (Distribución normal) a un nivel de confianza establecido. =1.960

P: Probabilidad de ocurrencia con un valor de 24%

Q: probabilidad de no ocurrencia con un valor de 9 %

ε : margen de error =5%

La población demandante puede variar con el tiempo, por lo que se realizó la proyección lineal a cinco años de la demanda actual, encontrando la tasa de crecimiento anual (Oni, 1970).

$$P_n = P_0(1 + Tc)^n$$

Donde:

P_n: es la población futura

P₀: es la población inicial

Tc: Tasa de crecimiento

n: años a proyectar

2.3.5. Brecha demanda oferta

Para determinar la brecha de la demanda - oferta se tomó directamente la cantidad de la media de la intensión de compra (Morales et al., 2015). Que

posteriormente se proyectó tomando en cuenta el crecimiento en 5 % (Blank et al., 1991).

2.3.6. Estrategia de promoción

Se describió las ventajas centrales y competitivas, para que los plantines de cacao sean demandados efectivamente por los productores de cacao (Mathison & Primera, 2007). Se realizó el establecimiento del precio teniendo en cuenta los siguientes criterios: costos de producción, precios de la competencia, disponibilidad a pagar y riesgo del sector (D. Pérez & Martínez, 2006). Se realizó la descripción del canal de comercialización a utilizar (Córdova et al., 2008).

2.3.7. Diagnóstico de la situación actual del proceso productivo

Se identificó y describió la tecnología para producción masiva comercial, plasmándolo en un protocolo de multiplicación masiva con los resultados obtenidos de los parámetros optimizados en la tecnología sistemas de inmersión temporal automatizada (García et al., 2018).

2.3.8. Tamaño de la biofábrica y capacidad de producción

El tamaño de la biofábrica y su acondicionamiento se estableció con los datos que se obtuvieron en cuanto a la cantidad de área con que cuentan los socios de APROCAM. Así mismo se consideró la calidad de plantas obtenidas en la producción piloto que se realizó en los objetivos anteriores (Castillo, 2004). Para la localización de la biofábrica se tomó como referencia a las instalaciones del laboratorio de calidad de APROCAM, debido a su cercanía a los productores en todo el sector de Bagua capital, donde se produce cacao con fines de exportación, siendo ésta la zona con mayor producción de cacao y APROCAM la cooperativa más grande de Amazonas y por la facilidad al acceso del material vegetativo (Suárez et al., 2009). El plan de ventas se realizó en relación con la demanda y oferta, como resultado de la brecha de la demanda insatisfecha y considerando la capacidad operativa. El plan de ventas se proyectó a cinco años (Ramírez et al., 2021). El plan de producción se ejecutó en relación al plan de venta y a la capacidad de producción está determinada por el número de embriones que puede alcanzar un callo generalmente obtuvimos entre 12 a 35 embriones, en cada placa se coloca 20

callos y se trabajaría con al menos 50 placas con lo que se alcanzara fácilmente los 15000 embriones, que colocados entre los 100 RITAS sería 150 embriones por cada uno (Echavarría et al., 2014).

2.3.9. Requerimientos de infraestructura

La infraestructura, requerimientos de equipos, materiales e insumos, recursos humanos y servicios se identificaron proyectando una extensión del laboratorio de FISIOBVEG.

2.3.10. Estudio financiero

Se estimó los costos y gastos de inversión por el costeo estándar. La inversión comprendió los activos fijos tangibles, intangibles y capital de trabajo (Blocher et al., 2008). Se incluyó los costos de mitigación de impactos ambientales negativos, certificaciones y autorizaciones.

Los costos de producción fueron divididos en costos directos y costos indirectos. Además los gastos de operación comprendieron gastos administrativos y gastos de venta (Pence, 2011). Se realizó un análisis de depreciación monetaria de bienes según SUNAT y la deducción admitida según ley. También se realizó los flujos de costos de operación incrementales para el tiempo proyectado (Blank, 1991). Se estimó los ingresos en base al precio establecido y a la cantidad de plantines proyectados a vender. Se presentó las fuentes de financiamiento considerando el patrimonio y servicios de capital (Blank, 1991).

El estado de ganancias y pérdidas se realizó utilizando el método de causación para lo cual se consideró la proyección el horizonte de evaluación a 5 años (Calderón et al., 2021).

2.3.11. Flujo de caja

Se elaboró el flujo de caja en el cual se muestran los ingresos y egresos actuales y futuros, que se utilizó para el análisis de viabilidad económica (Pérez & Inchausti, 1996).

2.3.12. Determinación del costo de capital

Se determinó el costo de capital que se utilizaría en la inversión de este proyecto en relación a la oferta económica con las entidades financieras u otros proyectos en la dirección a la estrategia tomada (García, 2014).

Costo de oportunidad del capital (COK)

$$COK=TF+R$$

Donde:

TF: rendimiento fijo de capital propio

R: riesgo del sector

2.3.13. Evaluación de la rentabilidad económica

Para la evaluación económica se consideró los siguientes cinco indicadores de rentabilidad: valor actual neto (VAN) retorno sobre la inversión (ROI) relación beneficio-costo (RB/C) índice de deseabilidad (ID) y periodo de recuperación (PR). EL VAN y la TIR o TRF se obtuvo mediante la utilización de comandos financieros de Excel, metodología basada en (Magaña et al., 2019) y en el cual se utilizó las expresiones:

Valor neto actual

$$VAN = \sum_{t=1}^n \frac{F_t}{(1+k)^t} - I_0$$

Relación costo /beneficio

$$\frac{C}{B} = \frac{Ingreso\ Total}{Costo\ Total}$$

2.4. Análisis de datos

El análisis de datos en el experimento de desarrollo embrionario para las variables, biomasa, diámetro longitudinal, transformación a planta en relación a la frecuencia de inmersión se utilizó la prueba no paramétrica Manm-Whitney para muestras independientes (Smida et al., 2022) y con relación al medio de cultivo se utilizó la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis para muestras independientes (Johnson, 2022).

Experimento 1: Biomasa **x** frecuencia de inmersión

Biomasa **x** medio de cultivo

Biomasa **x** frecuencia de inmersión **x** medio de cultivo

Experimento 2: Diámetro **x** frecuencia de inmersión

Diámetro **x** frecuencia de inmersión

Diámetro x frecuencia de inmersión x medio de cultivo

Experimento 3: Transformación a planta x frecuencia de inmersión

Transformación a planta x frecuencia de inmersión

Transformación a planta x frecuencia de inmersión x medio de cultivo

Para el análisis de datos en el experimento a transformación a planta primero se realizó la prueba de normalidad con la prueba Shapiro-Wilk. Después se realizó el análisis de varianza (ANOVA) para 2 factores y su interacción, además de la prueba Tukey al 95 % de confianza para las variables frecuencia de inmersión, medio de cultivo con la biomasa, embriones transformados a planta y sobrevivencia (Graefe et al., 2022).

Experimento 4: Biomasa x Frecuencia de inmersión

Biomasa x medio de cultivo

Biomasa x Frecuencia de inmersión y medio de cultivo

Experimento 5: Numero de plantas transformadas x frecuencia de inmersión

Numero de plantas transformadas x medio de cultivo

Numero de plantas transformadas x frecuencia de inmersión x medio de cultivo

Experimento 6: Sobrevivencia x frecuencia de inmersión

Sobrevivencia x medio de cultivo

Sobrevivencia x frecuencia de inmersión x medio de cultivo

Modelo bifactorial con interacciones

Para $i = 1, \dots, I$, $j = 1, \dots, J$ y $k = 1, \dots, K$

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + u_{ijk}$$

Donde μ : es la respuesta media global

α_i : Efecto adicional debido al nivel i del factor α

β_j : Efecto adicional debido al nivel del factor

$(\alpha\beta)_{ij}$: Efecto adicional debido a la interacción entre los niveles i de α y j de β :

u_{ijk} : Media

Modelo aditivo lineal del experimento con 3 factores con interacciones

$$Y_{ijkl} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \gamma_k + (\alpha\beta)_{ij} + (\alpha\gamma)_{ik} + (\beta\gamma)_{jk} + (\alpha\beta\gamma)_{ijk} + \varepsilon_{ijkl}$$

$$i = 1, 2, \dots, a; j = 1, 2, \dots, b; k = 1, 2, \dots, c; l = 1, 2, \dots, n$$

Donde:

Y_{ijkl} es la variable respuesta (los tres factores a evaluar).

μ = efecto común a todas las observaciones.

α_i es el efecto del nivel i -ésimo del factor A.

β_j es el efecto del nivel j del factor B.

γ_k es el efecto del nivel k en el factor C.

$(\alpha\beta)_{ij}, (\alpha\gamma)_{ik}, (\beta\gamma)_{jk}$ representan efectos de interacción doble (de dos factores) en los niveles ij, ik, jk , respectivamente .

$(\alpha\beta\gamma)_{ijk}$ es el efecto de interacción triple en la combinación o punto ijk .

ε_{ijkl} representa el error aleatorio en la combinación $ijkl$.

l son las repeticiones del experimento.

El análisis de datos para la rentabilidad económica en la producción de plantas mediante embriogénesis somática secundaria a través del sistema de inmersión temporal automatizada RITA se realizó empleando la estadística descriptiva con ratios e índices (Blank et al., 1991).

III. RESULTADOS

3.1. Evaluación tiempos de inmersión, medios de cultivo en RITA® y porcentajes de sombra en climatización de embriones somáticos de cacao fino de aroma.

3.1.1. Ensayo desarrollo embrionario - biomasa, frecuencia de inmersión y medios de cultivo

3.1.1.1 Biomasa en relación con la frecuencia de inmersión

En la Figura 7, se muestra los embriones del genotipo ABL03 en sistema RITA, mantenidos a 25 °C de temperatura y fotoperiodo 10/14 horas Luz/oscuridad, bajo frecuencias de inmersión de 6 y 10 veces/día, notándose un mayor incremento de la biomasa y mejor estado de desarrollo de los embriones en la frecuencia de inmersión 6 veces/día. En la Tabla A 3 se observa los resultados de la prueba de Manm-whitney, evidenciándose que no existe diferencia significativa ($0.340 > 0.05$). Por lo que pese a las diferencias matemáticas (rangos promedio de la mediana F1: 8.22 y F2:10.78 (Tabla 3) estadísticamente la variable biomasa es igual para las dos frecuencias de inmersión. En la Figura 8, gráfica de medias también se evidencia que la frecuencia de inmersión 2 presenta medianas similares de biomasa a la frecuencia de inmersión 1.

Figura 6. Embriones de genotipo ABL03 en sistema RITA, mantenidos a 25 °C de temperatura y fotoperiodo 10/14 horas Luz/oscuridad. A) Frecuencia de inmersión 6 veces/día. B) Frecuencia de inmersión 10 veces/día.



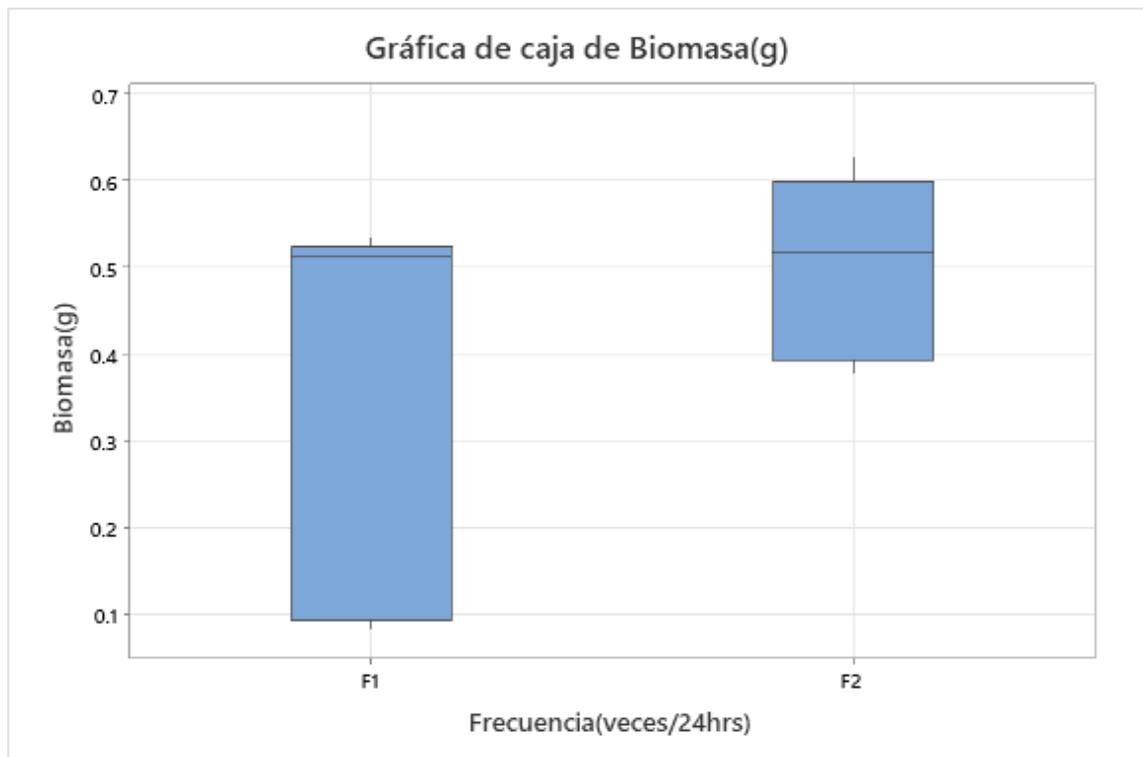


Figura 7. Gráfico de medias de la variable biomasa y frecuencia de inmersión. F1(Frecuencia de inmersión de 6 veces en 24 horas) y F2 (Frecuencia de inmersión de 10 veces en 24 horas).

3.1.1.2 Biomasa en relación con medios de cultivo

La prueba de normalidad de Shapiro-Wilk mostró que los datos no tienden a la normalidad (Tabla A 4) la prueba de Kruskal-Wallis, mostró que no existe diferencia significativa (Tabla A 5) la significancia fue de $0.064 < 0.05$. La Figura 9 muestra que existe una desviación estándar muy alta para el grupo M1 y las medianas están muy cerca de los límites de los otros tratamientos.

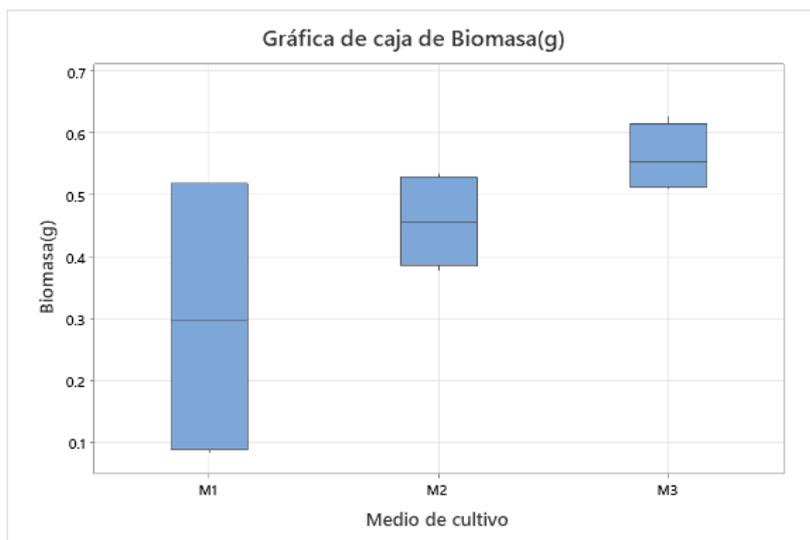


Figura 8. Gráfica de cajas de la biomasa en diferentes medios de cultivo

El medio de cultivo que alcanzó los mejores valores de la mediana en cuanto a biomasa fue el M3 con 0.55 g y el que obtuvo el menor valor fue el M1 con 0.3 g. En la Figura 10, se observa a los embriones en los diferentes medios de cultivo y frecuencias de inmersión en su desarrollo es muy similar visualmente.



Figura 9. Embriones del genotipo ABL03 desarrollados en Sistema RITA por 1 mes en 3 medios diferentes, A) Medio de cultivo M1-F1, B) Medio de cultivo M2-F1, C) Medio de cultivo M3-F1, D) Medio de cultivo M1-F2, E) Medio de cultivo M2-F2, F) Medio de cultivo M3-F2.

3.1.2. Ensayo desarrollo embrionario - diámetro con relación a la frecuencia de inmersión y medios de cultivo

3.1.2.1 Diámetro de las plántulas en relación con la frecuencia de inmersión

Los datos obtenidos presentan normalidad según la prueba de Shapiro-Wilk con $(0.28 > \alpha 0.05)$ (Tabla A 7). La prueba t-Student para muestras independientes mostró diferencias significativas $(0.035 < 0.05)$ (Tabla A 9) entre las frecuencias de inmersión. En la Figura 11, se muestra las medianas alcanzadas por cada uno de los tratamientos, siendo la frecuencia de inmersión 2 la que obtuvo mayor diámetro embriones con 13 mm.

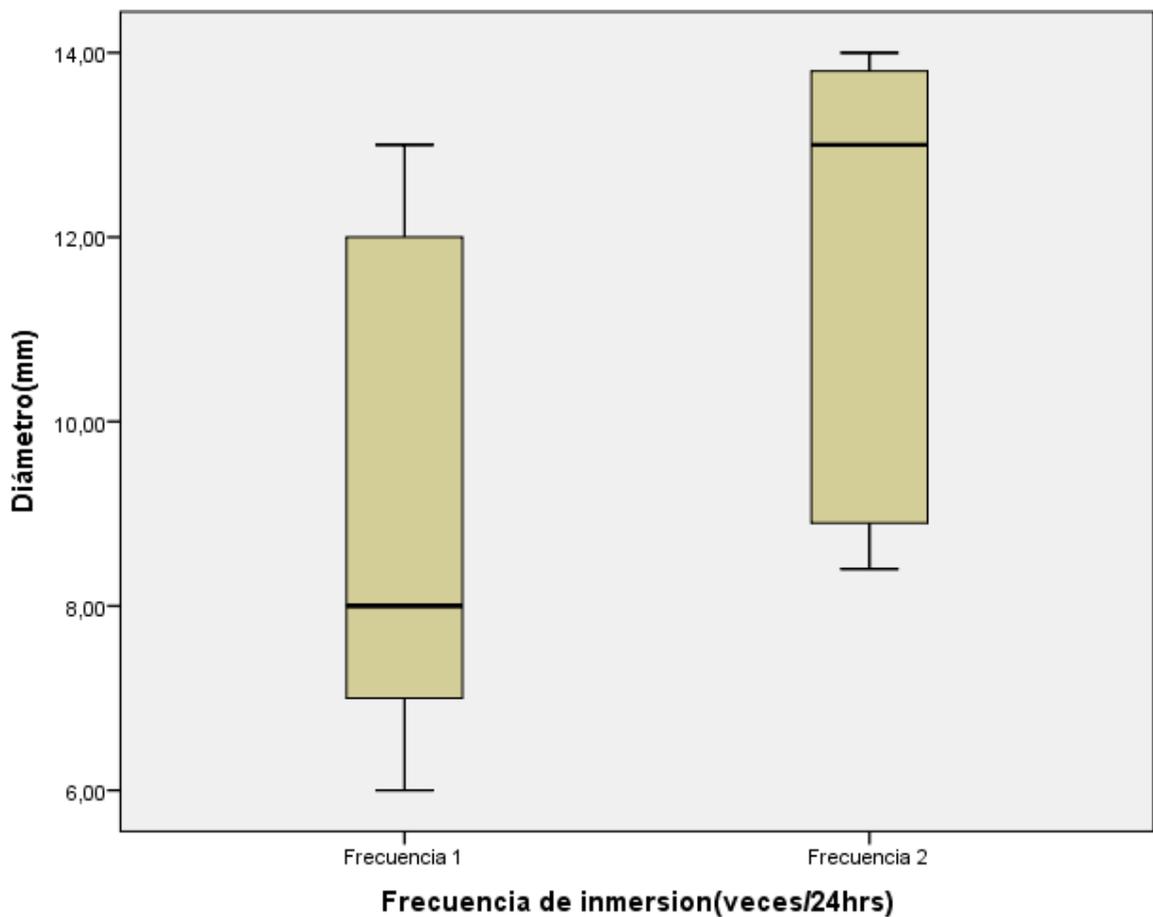


Figura 10. Figura de cajas del diámetro y la frecuencia de inmersión en el ensayo de desarrollo embrionario.

3.1.2.2 El diámetro con relación con los medios de cultivo

La prueba de Shapiro-Wilk muestra que no en todos los medios los datos tienden a la normalidad (Tabla A 10). En la prueba de Kruskal-Wallis se observa que existe diferencias significativas entre los medios de cultivo con relación al diámetro longitudinal de los embriones ($0.013 < 0.05$) (Tabla A 12). El medio de cultivo que mayor rango obtuvo fue el medio de cultivo M3 con mediana de 13mm. En la Figura 12 podemos observar que el medio M3 se obtuvo mayor media en relación con los otros medios.

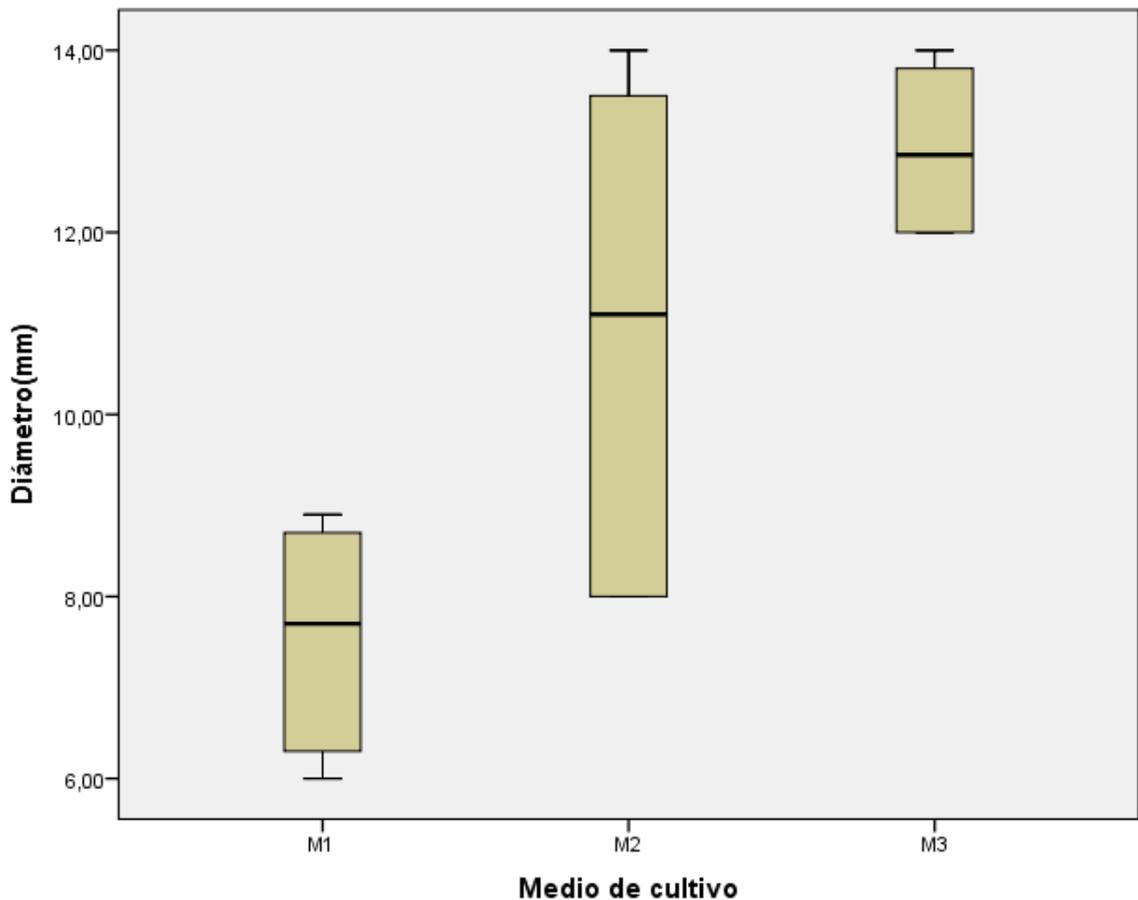


Figura 11. Figura de cajas del diámetro de los embriones en relación con el medio de cultivo.

3.1.3. Ensayo desarrollo embrionario -variables número de embriones transformados, frecuencia de inmersión y medios de cultivo.

3.1.3.1. Número de embriones en relación con la frecuencia de inmersión

La prueba de normalidad mostró que los datos no siguen la tendencia normal $0.003 < 0.05$ (Tabla A 13). Con prueba de Man-Whitney para muestras independientes obtuvimos la significancia de $0.006 < 0.05$ (Tabla A 14) mostrando la diferencia significativa entre los grupos de frecuencia 1 y frecuencia 2, así mismo la frecuencia 1 obtuvo mayor rango promedio y en la Figura 13 encontramos que la frecuencia 1 tiene mayor mediana.

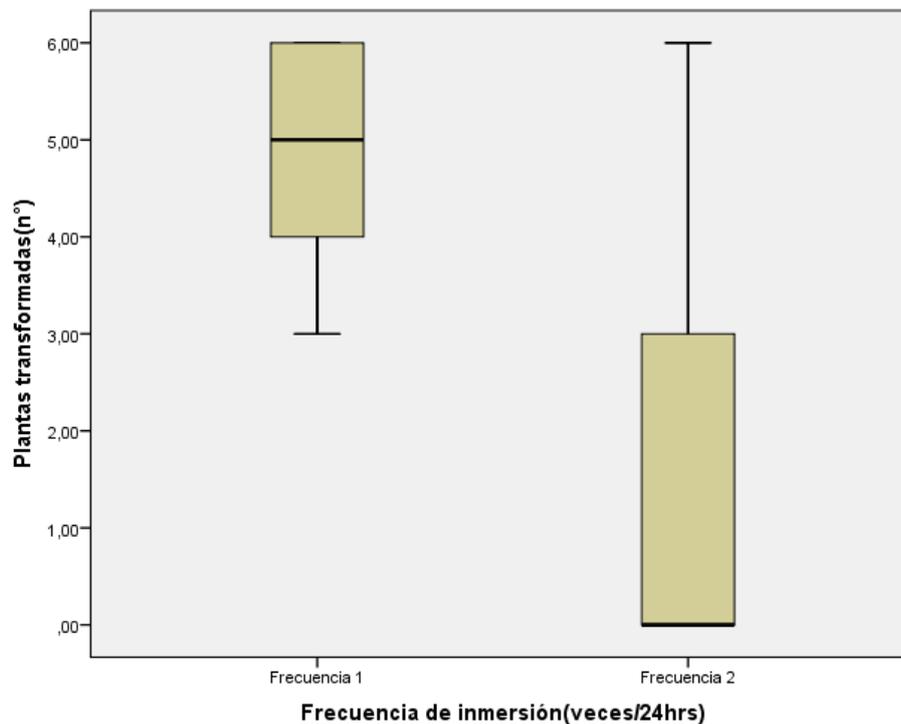


Figura 12. Figura de cajas de las medias de las plantas transformadas en relación con la frecuencia de inmersión.

3.1.3.2. Número de embriones en relación con el medio de cultivo

Los resultados de la prueba de Normalidad de Shapiro-Wilk obtuvimos que los datos de algunos tratamientos fueron normales y otros no por lo que asumimos que los datos no eran normales. La prueba de Kruskal-Wallis

mostró como resultado que no hubo significancia ($0.893 > 0.05$) (Tabla A 16) el medio M2 tubo el mayor rango promedio 10.25 (Tabla A 17). Así mismo en la Figura 14 se muestra que el medio m2 obtuvo mayor mediana.

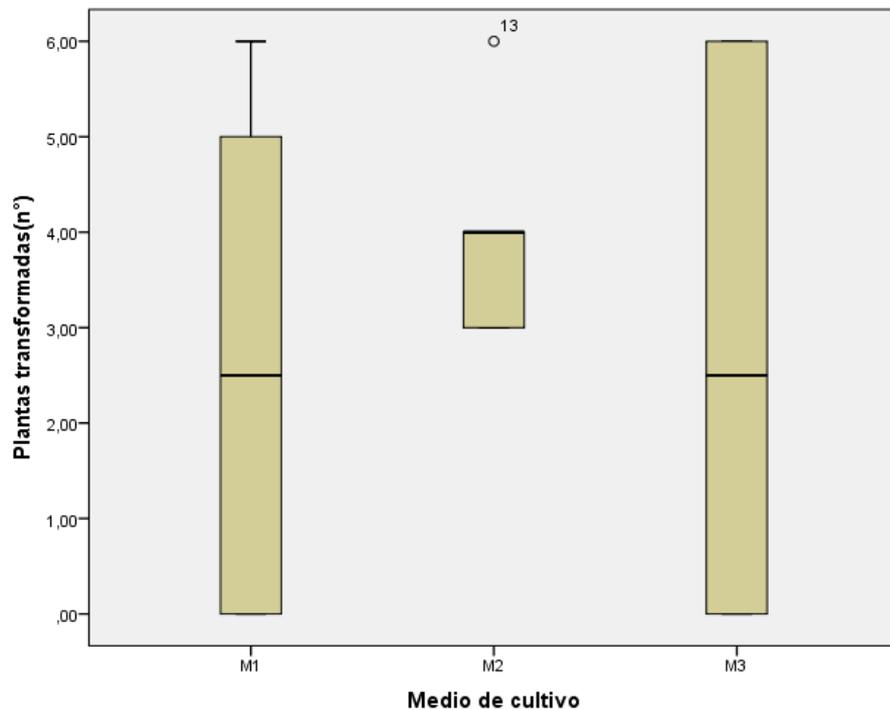


Figura 13. Embriones transformados a plantas en tres medios de cultivo para desarrollo embrionario.

3.1.4. Ensayo regeneración a planta -variables; biomasa, frecuencia de inmersión y medios de cultivo

En el experimento con 2 frecuencias de inmersión y 3 medios de cultivo para la regeneración a planta se obtuvo que los datos recabados de biomasa (peso total de RITA) siguen la tendencia normal $0.100 > 0.05$ (Tabla A 19) en el análisis de varianza se obtuvo las significancias de $0.001 < 0.05$ para la frecuencia y $0.000 < 0.05$ para medio de cultivo, son significativos indicando la diferencia entre sus grupos, pero no para la interacción entre medio de cultivo y frecuencia de inmersión $0.08 > 0.05$ de significancia (Tabla A 20). En el análisis de Tukey la frecuencia 1 con la frecuencia 2 son distintos teniendo mayor media la frecuencia 2 con relación a la biomasa (Tabla 4).

Tabla 4. *Método de Tukey para la variable frecuencia de inmersión temporal en 24 horas.*

Frecuencia	N	Media	Agrupación
F2	9	4.43689	A
F1	9	3.37889	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Para el factor medio de cultivo se evidencia que el medio M3 y M1 son grupos iguales mientras que el Medio M2 (Figuras 14 y 15) es diferente con media superior de biomasa a los otros medios (Tabla 5).

Tabla 5. *Método de Tukey para la variable medio de cultivo en la regeneración.*

Medio de Cultivo	N	Media	Agrupación
M2	6	5.07433	A
M3	6	3.44167	B
M1	6	3.20767	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes a una confianza de 95%



Figura 14. Plantas en sistema RITA en 6 meses a 25° C en condición de 10 horas de luz y 14 horas de oscuridad, en medio M2 transformación a planta; A) Embriones cultivados en RITA en medio M2 en frecuencia de inmersión de 6 veces en 24 horas (F1) B) Embriones cultivados en RITA en medio M2 en frecuencia de inmersión de 10 veces por 24 horas (F2).

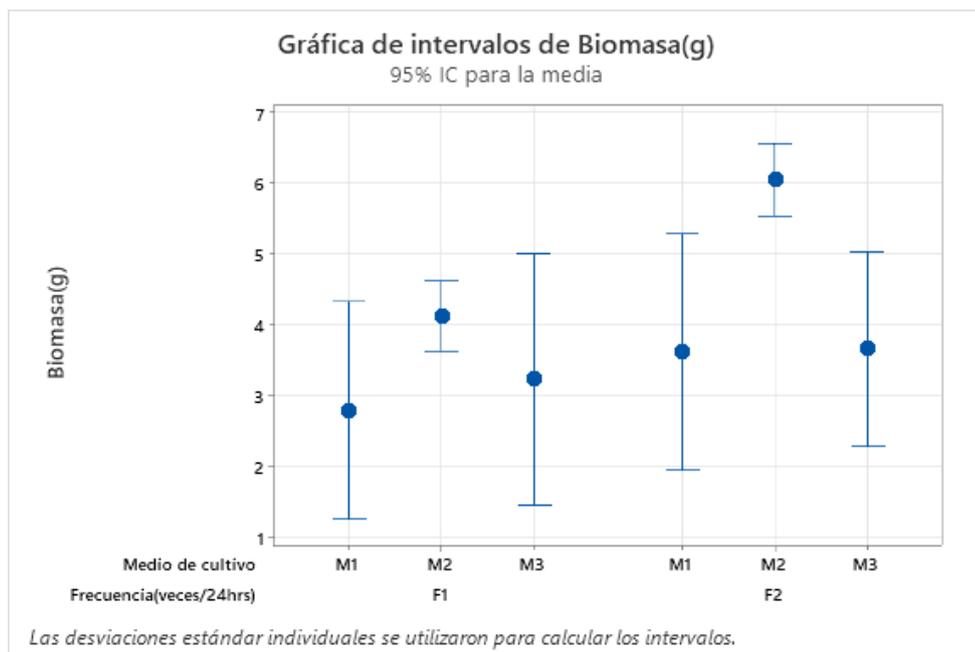


Figura 15. Gráfico de intervalos de biomasa en relación con la frecuencia de inmersión y tres medios de cultivo. El medio de cultivo M2 sobresale con mayor media de biomasa en las dos frecuencias de inmersión.

3.1.5. Ensayo regeneración a planta -variables; Transformación a planta, frecuencia de inmersión y medios de cultivo.

Los datos del número de plantas transformadas se confirmó su normalidad con la prueba de shapiro wilk ($0.562 > 0.05$) (Tabla A 22). Los datos de la sobrevivencia en el experimento en RITA con las variables de frecuencia de inmersión y varios medios de cultivo, dio como resultado que en la variable frecuencia y medio de cultivo existe diferencia significativa $0.597 > 0.05$ (Tabla A 23). Así mismo, la interacción de estas variables tubo diferencia significativa ya que la significancia fue de $0.493 < 0.05$. Posteriormente la prueba Tukey se obtuvo diferencias entre la frecuencia 1 y la frecuencia 2, destacando con mayor media la frecuencia 2 (Tabla 6).

Tabla 6. *Método de Tukey para los datos de la variable frecuencia de inmersión en el medio de cultivo en 24 horas.*

Frecuencia	N	Media	Agrupación
F1	9	4	A
F2	9	2.33333	B

Los grupos de medios de cultivo el medio 1 y el medio 3 son similares en sus medias mientras que el medio 2 es diferente (Tabla 7) y se obtuvo mayor número de plantas transformadas el medio 2 (Figura 17).

Tabla 7. *Método de Tukey para los datos de la variable medio de cultivo en transformación de planta.*

Medio	N	Media	Agrupación
M2	6	4.5	A
M3	6	2.5	B
M1	6	2.5	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.



Figura 16. Embriones del genotipo ALB03 en medio de cultivo M2 en las frecuencias F2 y F1 por el periodo de 6 meses, A) Transformada a planta B) No transformada en planta.

En la interacción de las variables de frecuencia, medio con en número de plantas transformadas, obtenemos que el medio 2 con las frecuencias 1 y 2 son grupos similares y mientras que la frecuencia 1 y los medios 1 y 3 son grupos similares con medias ente 3,6 y 1.6 y por ultimo los con menor media la frecuencia F2 con el medio 1(Tabla 8) (Figura 17).

Tabla 8. Método de Tukey para las variables frecuencia de inmersión *medio de cultivo en la transformación a planta.

Frecuencia*Medio	N	Media	Agrupación
F1 M2	3	5	A
F2 M2	3	4	A B
F1 M1	3	3.66667	A B C
F1 M3	3	3.33333	A B C
F2 M3	3	1.66667	B C
F2 M1	3	1.33333	C

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Las plantas en relación con la frecuencia y medio de cultivo, el medio M2 destaca con mayor media en las dos frecuencias de inmersión como se muestra en la Figura 18.

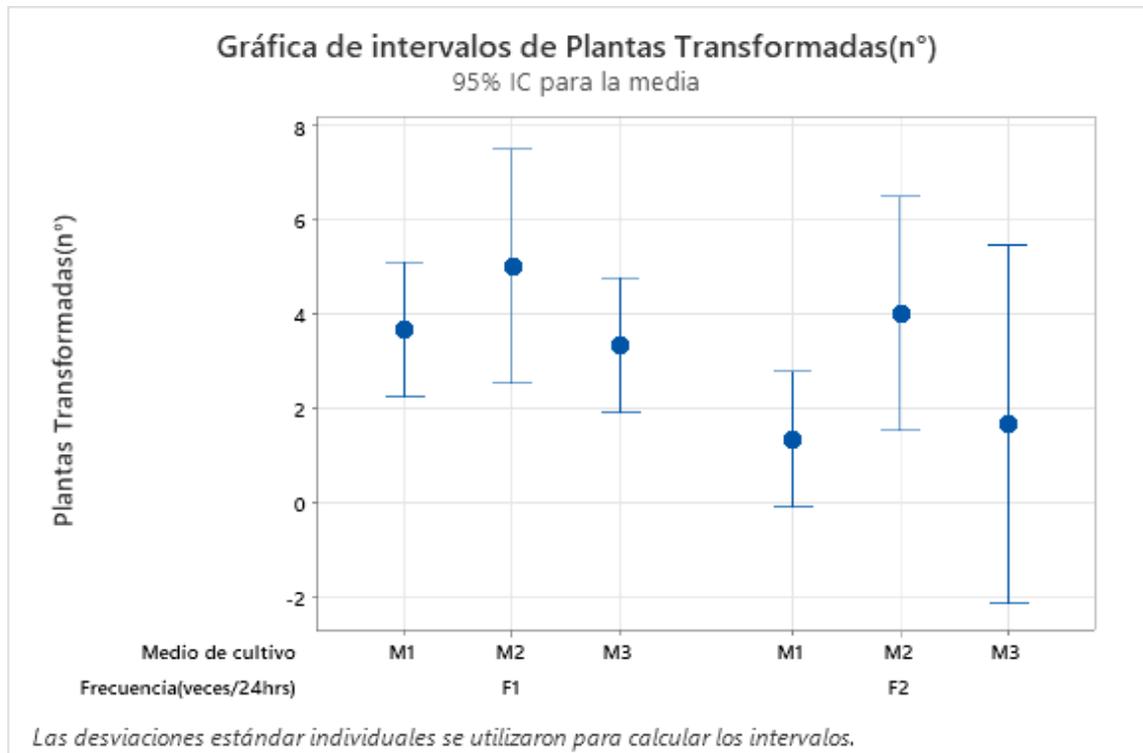


Figura 17. Gráfico de intervalos de los embriones transformadas a planta con interacción del medio de cultivo y la frecuencia de inmersión en el medio de cultivo.

3.1.6. Ensayo regeneración a planta -variables; sobrevivencia, frecuencia de inmersión y medios de cultivo

Los datos obtenidos en el ensayo sobrevivencia de los embriones en los RITA son normales $0.959 > 0.05$ (Tabla A 23). En la comparación de las medias (ANOVA) de la sobrevivencia con las variables frecuencia de inmersión y en varios medios de cultivo; obtuvimos la frecuencia, la interacción frecuencia y medios de cultivo no hay diferencia significativa (Tabla A 24) los medios de cultivo mostraron tener diferencias significativas $0 < 0.05$ (Tabla A 24).

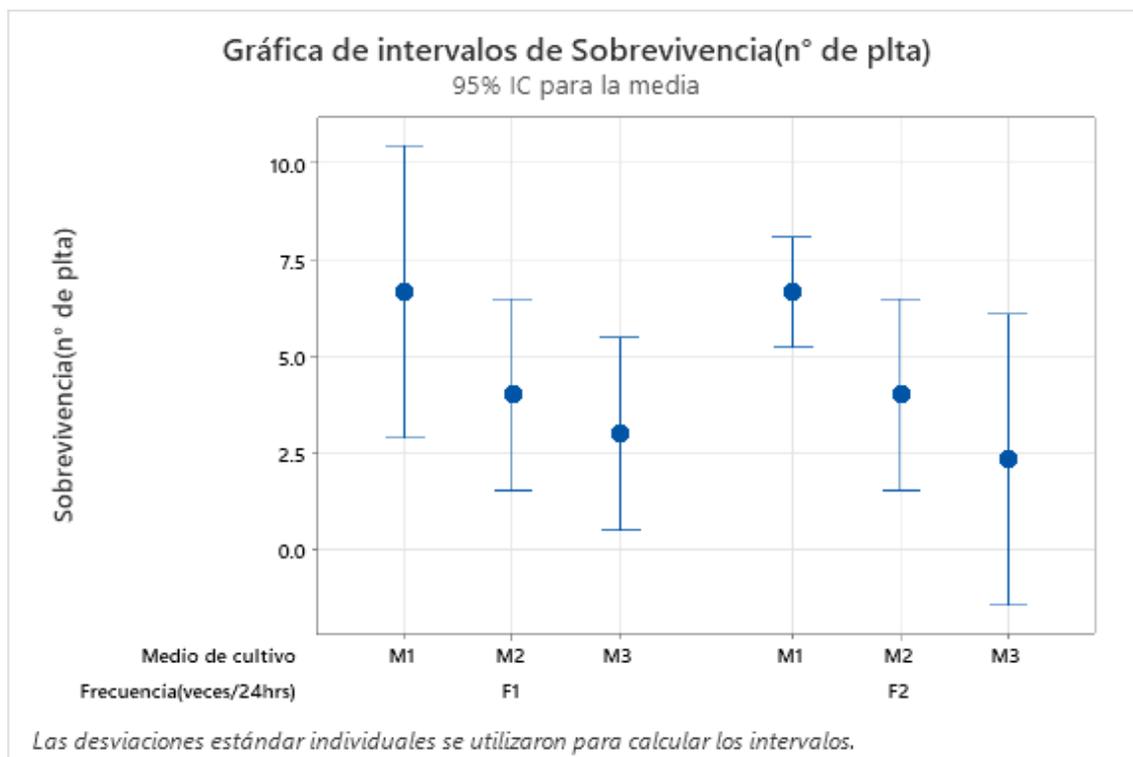


Figura 18. Grafica de cajas de la supervivencia de embriones en relación con la frecuencia y tres medios de cultivo.

En el análisis Post Hoc Tukey de la variable medios de cultivo en relación con la supervivencia se observa 2 grupos el primer grupo solo el medio 1 y el segundo grupo por el medio M2 y M3, donde el que obtuvo mayor media en supervivencia fue en el medio M1(Figura 19) (Tabla 9).

Tabla 9. Método de Tukey y una confianza de 95% para la variable medio de cultivo en la regeneración a planta.

Medio	N	Media	Agrupación
M1	6	6.66667	A
M2	6	4	B
M3	6	2.66667	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

3.2. Análisis de la viabilidad económica de la producción masiva de embriones somáticos de cacao fino de aroma empleando el sistema de inmersión temporal automatizada RITA®.

3.2.1. Producto

El producto que se desarrolló en la investigación son plantines *in vitro* de cacao nativo criollo fino de aroma del genotipo ABL03 de 3 meses de edad, producto que será comercializado al mercado objetivo.

3.2.2. Plantines de cacao *in vitro* de 2 meses

Se trata de un producto con excelentes características agronómicas y sensoriales en sus frutos del genotipo ABL03, libres de patógenos, estarán presentados en recipientes transparentes de 1litro de capacidad donde contendrá entre 40 y50 plantas potenciales.

3.2.3. Productos sustitutos o similares

En el mercado existen una gran variedad de productos similares, como por ejemplo plantines propagados por semilla botánica (bayas) y semilla biológica (injertos) cacaos criollos y CCN51. Los cuales son producidos por los mismos productores o por viveros cercanos.

3.2.4. Productos complementarios

Cuando los productores adquieren plantines también suelen adquirir abonos granulados o foliares y enraizante entre otros.

3.2.5. Análisis de la demanda

La demanda fue determinada por la encuesta dando como resultado que el 76,7 % (Tabla 10) de los encuestados indicaron su intención de compra como positiva y el promedio de plantas que requerirá cada uno será de 677 (Tabla 11) (Anexo 4). Se realizó la proyección del incremento de estas plantas considerando el crecimiento anual del 5% (Blank et al., 1991).

Tabla 10. *Consulta de intención de compra de plantines de cacao ex vitro.*

		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos	Si	23	76.7	76.7	76.7
	No	7	23.3	23.3	100.0
	Total	30	100.0	100.0	

Según la encuesta realizada a productores de cacao se tiene en mínimo y máximo de plantas que adquirirían de existir la oferta como se muestra en la Tabla 11.

Tabla 11. *Estadísticos descriptivos de la cantidad de la cantidad de plantines que compraría.*

	N	Mínimo	Máximo	Media	Desv. típ.
Cantidad que compra	23	30.00	2000.00	677.3913	564.86698
N válido (según lista)	23				

Se consideró la demanda efectiva como la brecha demanda- oferta porque se preguntó directamente a la población indicando su intención de compra (Tabla 12).

Tabla 12. *Demanda potencial -Demanda efectiva-Brecha demanda oferta de plantines de cacao.*

Año	Demanda potencial	Demanda efectiva-Brecha demanda oferta
2022	700000	181741
2023	735000	190828
2024	771750	200369
2025	810338	210388
2026	850854	220907

3.2.6. Estrategia de promoción

La estrategia comercial de los plantines que se siguió fue la de reducción de costos (Estrategia de precios bajos) las ventajas centrales que se tiene en la producción cacao fino de aroma criollo es que se cuenta con la autoría de los genotipos y el protocolo establecido de producción masiva de plantas en sistema automatizados.

Para esto el precio establecido será de 2 soles cada plantín. La comercialización se realizará directamente en el local de APROCAM en comunicación directa con el productor y sus necesidades.

3.2.7. Diagnóstico de la situación actual del proceso productivo

La producción actual de plantas en APROCAM se realiza por estacas y semilla botánica limitándose a pocas plantas no mayor a 30 plantas por genotipo (Anexo 5), realizándose injertos de las plantas madre.

El proceso productivo que proponemos tendría el proceso de obtención del material vegetativa, instalación, multiplicación, transformación a planta.

3.2.8. Tamaño de la biofábrica y capacidad de producción

La biofabrica tendrá capacidad para producir 15000 plantas trimestral, la biofabrica estará ubicada en APROCAM en una parte de su laboratorio de calidad donde cuenta con un área de 50 metros cuadrados suficientes para poder instalar el sistema.

3.2.9. Inversión

La inversión contos de los costos de las obras civiles (Tabla 13) los equipos, muebles y enseres (Tabla 14) la inversión fija tangible (Tabla 15) las remuneraciones al personal (Tabla 16) materias primas e insumos (Tabla 17) y el capital de trabajo inicial (Tabla 18) finalmente se tiene la suma total de la inversión de S/107,261.70 (Tabla19).

Tabla 13. *Total, Terrenos y Obras Civiles necesarios para la producción de plantines in vitro de cacao.*

Item	Unidad	Cantidad	Costo unitario	Costo total
Acondicionamiento de ambiente	Global	1	S/500.00	S/500.00
TOTAL, TERRENOS Y OBRAS CIVILES				S/500.00

Los equipos que se consideraron están establecidos como mínimos para la producción de plantas *in vitro* empleando el sistema de inmersión temporal automatizada, así como los materiales que asciende a la suma de S/156,168.00 siendo el material con más alto precio los RITA como se muestra en la Tabla 14.

Tabla 14. *Equipos, Muebles, materiales necesarios para la producción de plantines de cacao.*

Ítem	Unidad	Cantidad	Costo unitario	Costo total
Equipos				S/45,700.00
Incubadora	unidad	1	S/9,000.00	S/9,000.00
Balanza analítica	unidad	1	S/8,500.00	S/8,500.00
Potenciómetro	unidad	1	S/3,000.00	S/3,000.00
Autoclave	unidad	1	S/5,000.00	S/5,000.00
Concina eléctrica	unidad	1	S/200.00	S/200.00
Cámara de flujo laminar	unidad	1	S/20,000.00	S/20,000.00
Muebles y materiales				S/55,234.00
Estantes	unidad	2	S/300.00	S/600.00
Tubos falcón De 50 MI	unidad	1000	S/0.35	S/350.00
Cooler	unidad	1	S/70.00	S/70.00
Vasos de 2 litros	unidad	2	S/52.00	S/104.00
Botellas de 1 litro	unidad	5	S/150.00	S/750.00
Placas Petri	unidad	500	S/5.00	S/2,500.00
Pinzas	unidad	5	S/30.00	S/150.00
Mechero de alcohol	unidad	4	S/60.00	S/240.00
Botella de tapa rosca 250 mL	unidad	3	S/100.00	S/300.00
Botellas de tapa rosca de 50 mL	unidad	2	S/50.00	S/100.00
Bandejas	unidad	4	S/10.00	S/40.00
Recipiente de 20 litros con tapa rosca	unidad	2	S/15.00	S/30.00
Kit instalación de RITA	global	100	S/500	S/50,000.00
Total				S/156,168.00

La inversión fija intangible se consideró agua y energía eléctrica que son esenciales para los equipos como por ejemplo la autoclave, preparación de medios y la limpieza del área y materiales como se muestra en la Tabla 15.

Tabla 15. *Inversión fija intangible para la producción de plantines de cacao.*

Ítem	Unidad	Cantidad	Costo unitario	Costo total
Agua	mensual	12	30	360
Energía eléctrica	mensual	12	30	360
Total				720

Las remuneraciones para el personal se han considerado como precio base, así como al ser un trabajo repetitivo con el tiempo no requiere tanta especialización los montos considerados como base se muestran en la Tabla 16.

Tabla 16. *Remuneraciones del personal que producirá y comercializará los plantines de cacao.*

Ítem	Unidad	Cantidad	Costo unitario	Costo total
MANO DE OBRA DIRECTA				S/18,000.00
Técnico laboratorista	mes	12	S/1,500.00	S/18,000.00
VENTAS				S/1,000.00
Responsable de comercialización	mes	1	S/ 1,000.00	S/1,000.00
ADMINISTRACION				S/4,000.00
Asistente administrativo	mes	4	S/ 1,000.00	S/4,000.00
Total				S/23,000.00

En la materia prima generalmente solo se necesita las sales DKW que fueron consideradas para la cantidad de litros que se prepararía para un año llegando a un total de S/8,753.48 a eso mismo se le suma la mano de obra otros costos indirectos llegando a ser el capital de trabajo anual de S/ 31753.48.

Tabla 17. *Consolidado de materias primas e insumos para la producción de plantines de cacao.*

CONCEPTO	COSTO TOTAL S/.
I. MATERIAS PRIMAS E INSUMOS	S/8,753.48
II. MANO DE OBRA	S/23,000.00
Responsable de comercialización	S/1,000.00
Asistente administrativo	S/4,000.00
Técnico laboratorista	S/18,000.00
III. OTROS COSTOS INDIRECTOS	S/0.00
TOTAL, CAPITAL DE TRABAJO	S/31,753.48

Se realizó la proyección del capital de trabajo el cual a partir del año 1 se reduce porque algunos insumos se necesitan en cantidades mínimas y lo que concierne al personal si se va incrementando por acoger el talento como muestra la proyección a los 5 años en la Tabla 18.

Tabla 18. *Capital de trabajo proyectado a 5 años para producir plantines de cacao.*

CONCEPTO	AÑOS					
	0	1	2	3	4	5
I. MATERIAS PRIMAS E INSUMOS	S/7,405.28	S/740.53	S/814.58	S/896.04	S/985.64	S/1,084.21
II. MANO DE OBRA	S/23,000.00	S/2,300.00	S/2,530.00	S/2,783.00	S/3,061.30	S/3,367.43
TOTAL, CAPITAL DE TRABAJO	S/30,405.28	S/3,040.53	S/3,344.58	S/3,679.04	S/4,046.94	S/4,451.64

La inversión conta de la inversión fija a esto sumándole la inversión intangible más el capital de trabajo a eso se le suma los gastos generales como imprevistos llegando al total de inversión de S/ 176,875.86 a mayor detalle de muestra en la Tabla 19.

Tabla 19. *Estructura de la Inversión para la producción de plantines de cacao.*

ESTRUCTURA DE LA INVERSIÓN	
CONCEPTO	TOTAL S/.
I. INVERSIÓN FIJA	S/102,154.00
I.1. INVERSIÓN FIJA TANGIBLE	S/101,434.00
I.1.1. TERRENOS Y OBRAS CIVILES	S/500.00
I.1.2. MAQUINARIA Y EQUIPO	S/45,700.00
I.1.3. MUEBLES Y ENSERES	S/55,234.00
I.2. INVERSIÓN FIJA INTANGIBLE	S/720.00
II. CAPITAL DE TRABAJO	S/30,405.28
III. GASTOS GENERALES (5 %) IF	S/5,107.70
TOTAL, INVERSIÓN	S/107,261.70

3.2.10. Costos y gastos

Los costos se consideran todos los egresos que se realiza en el proceso de producción en el cual se tiene los costos de materia prima (Tabla 22) otros costos indirectos (Tabla 24) los costos de producción proyectos a 5 años (Tabla 26). Los gastos de considera a todos los egresos que se tienen en la logística, gestión, venta y distribución del producto entre los cuales tenemos a los servicios básicos (Tabla 20) útiles de oficina y limpieza (Tabla 21) gastos de venta (Tabla 23) gastos de operación (Tabla 25) Depreciación Del Activo Fijo Tangible Y Amortización Intangibles (Tabla 27) finalmente tenemos el resumen de los gastos totales (Tabla 28).

Tabla 20. *Costeo de servicios básicos para la comercialización de plantines de cacao.*

Descripción	U. Med	Cantidad	P. Unit	Costo total
Luz	mes	12	60	720
Agua	mes	12	20	240
Telefonía	mes	12	30	360
Internet	mes	12	55	660
TOTAL				1980

Los útiles de oficina y limpieza se consideraron para el primer año de operaciones con un total de S/1000 como se muestra en la Tabla 21.

Tabla 21. *Útiles de oficina y limpieza para las oficinas encargadas de la administración y comercialización de los plantines de cacao.*

Descripción	U.Med	Cantidad	P.Unit	Costo total
Útiles de Oficina	Glob	1	500	S/500.00
Artículos de Limpieza	Glob	1	500	S/500.00
TOTAL				S/1,000.00

Los costos de materia prima están considerados para el primer año de funcionamiento esta materia prima es de reactivos necesarios para los medios de cultivo y algunos insumos para garantizar la inocuidad, como se muestra en la Tabla 22.

Tabla 22. *Costos de materia prima para la producción de plantines de cacao.*

COSTOS DEMATERIA PRIMA				
CONCEPTO	UNIDAD	CANTIDAD	P. UNIT	COSTO TOTAL
I. COSTOS DIRECTOS				8753.48
Agua destilada	litros	50	S/2.00	S/100.00
Alcohol de 96	litros	20	S/15.00	S/300.00
Mechero	unidad	2	S/60.00	S/120.00
Papel toalla	unidad	30	S/1.67	S/50.00
Hipoclorito de sodio	galón	2	S/6.00	S/12.00
Lavavajilla	galón	1	S/30.00	S/30.00
jabón para manos	galón	1	S/16.00	S/16.00
NH ₄ NO ₃	kilogramo	1	S/542.80	S/542.80
Ca(NO ₃) ₂ 4H ₂ O	gramos	500	S/0.14	S/72.00
K ₂ SO ₄	gramos	500	S/0.15	S/75.00
MgSO ₄ 7H ₂ O	kilogramo	1	S/238.95	S/238.95
KH ₂ PO ₄	gramos	250	S/0.80	S/200.00
CaCl ₂ .2H ₂ O	gramos	250	S/0.72	S/180.00
Zn(NO ₃) ₂ 6H ₂ O	gramos	250	S/0.80	S/200.00
MnSO ₄ H ₂ O	gramos	250	S/0.38	S/95.00
FeSO ₄ 7H ₂ O	gramos	500	S/0.40	S/200.00
Na-EDTA	gramos	100	S/1.00	S/100.00
H ₃ BO ₃	Kilogramo	1	S/80.00	S/80.00
CuSO ₄ 5H ₂ O	gramos	500	S/0.23	S/115.00
Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	gramos	500	S/0.30	S/150.00
Myoinositol	gramos	100	S/4.25	S/424.80
Thiaminin-HCL	gramos	10	S/7.90	S/79.00

Ácido nicotínico	gramos	5	S/9.00	S/45.00
Glicine	gramos	1	S/50.00	S/50.00
L-Lysine	gramos	5	S/9.00	S/45.00
L-leucine	gramos	5	S/19.00	S/95.00
L-tryptophan	gramos	5	S/8.76	S/43.82
Arginine	gramos	5	S/14.00	S/70.00
Glucose	Kilogramo	1	S/295.00	S/295.00
Glutamine	gramos	5	S/14.00	S/70.00
2,4-D	gramos	50	S/2.00	S/100.00
tidiazurón.	miligramos	50	S/14.36	S/717.99
McCow`s	gramos	30	S/9.20	S/276.12
Pyridoxine hydrochloride	gramos	1	S/50.00	S/50.00
Phytigel	gramos	500	S/1.49	S/743.40
BA	gramos	25	S/93.93	S/2,348.20
NaOH	kilogramo	0.2	S/200.00	S/40.00
Sucrose	kilogramo	1	S/153.40	S/153.40
KNO ₃	gramos	250	S/0.80	S/200.00
HCL	mililitros	50	S/0.60	S/30.00

Los gastos de venta se consideró el responsable de comercialización y la publicidad el cual no está integrado. La total llega a S/ 6,000.00 en el primer año (Tabla 23).

Tabla 23. *Gastos de venta de los plantines de cacao.*

CONCEPTO	COSTO TOTAL
MANO DE OBRA VENTA	S/1,000.00
Ventas-Responsable de la comercialización	S/1,000.00
OTROS GASTOS DE VENTA	S/5,000.00
Publicidad	S/5,000.00
TOTAL, GASTOS DE VENTA	S/6,000.00

En otros costos indirectos los cuales no están inmersos en la producción más si en la administración y ventas se consideró artículos de limpieza y servicios básicos (Tabla 24).

Tabla 24. *Otros costos indirectos.*

CONCEPTO	CANTIDAD	COSTO TOTAL
Artículos de Limpieza	Global	S/1,000.00
Servicios de mantenimiento y reparaciones	Global	S/0.00
Servicios básicos	Global	S/1,980.00
TOTAL OTROS COSTOS INDIRECTOS		S/2,980.00

Entonces como resumen tenemos los gastos de operación el cual agrupa los gastos de ventas y gastos administrativos ascendiendo a S/ 6,700.00 (Tabla 25).

Tabla 25. *Gastos de operación de la comercialización de los plantines de cacao.*

CONCEPTO	UNIDAD	CANTIDAD	PRECIO UNITARIO S/.	COSTO ANUAL S/.
I. GASTOS EN VENTAS				S/2,200.00
Ventas-Responsable de la comercialización	Mes	1	1000	S/1,000.00
Publicidad	Mes	12	100	S/1,200.00
II. GASTOS ADMINISTRATIVOS				S/4,500.00
Mano de obra Administrativa	Mes	4	1000	S/4,000.00
Útiles de Oficina	Mes	1	500	S/500.00
Total				S/6,700.00

En la Tabla 27 se muestra los costos de producción proyectados el cual tiene incremento por año de acuerdo con el crecimiento de la biofabrica empezando en S/29,733.48 y al quinto año llegando a S/43,532.79 (Tabla 26).

Tabla 26. *Costos de producción proyectados en 5 años de producción de plantines de cacao.*

CONCEPTO	AÑOS				
	1	2	3	4	5
I. COSTOS DIRECTOS	S/26,753.48	S/29,428.83	S/32,371.71	S/35,608.88	S/39,169.77
a) Materiales directos	S/8,753.48	S/9,628.83	S/10,591.71	S/11,650.88	S/12,815.97
b) Mano de obra directa	S/18,000.00	S/19,800.00	S/21,780.00	S/23,958.00	S/26,353.80
II. COSTOS INDIRECTOS	S/2,980.00	S/3,278.00	S/3,605.80	S/3,966.38	S/4,363.02
Mano de Obra Indirecta	S/0.00	S/0.00	S/0.00	S/0.00	S/0.00
Otros Costos indirectos	S/2,980.00	S/3,278.00	S/3,605.80	S/3,966.38	S/4,363.02
COSTO TOTAL DE PRODUCCION	S/29,733.48	S/32,706.83	S/35,977.51	S/39,575.26	S/43,532.79

NOTA: SE ESTA CONSIDERANDO UN INCREMENTO DEL 10% ANUAL DE MATERIAS PRIMAS E INSUMOS, DURANTE LOS 5 AÑOS.

Los activos fijos tangibles y amortización de los intangibles esta por S/ 16,892.32 por cada año (Tabla 27).

Tabla 27. *Depreciación del activo fijo tangible y amortización intangibles de la producción de plantines de cacao.*

CONCEPTO	Factor de depreciación	1	2	3	4	5
I. DEPRECIACIÓN DEL ACTIVO FIJO TANGIBLE		10118.4	10118.4	10118.4	10118.4	10118.4
I.1.1. OBRAS CIVILES	0.05	25	25	25	25	25
I.1.2. MAQUINARIA Y EQUIPO	0.1	4570	4570	4570	4570	4570
I.1.3. MUEBLES Y ENSERES	0.1	5523.4	5523.4	5523.4	5523.4	5523.4
II. AMORTIZACIÓN INTANGIBLES		144	144	144	144	144
II.1. INVERSIÓN FIJA INTANGIBLE	0.2	144	144	144	144	144
TOTAL (I + II)		S/10,262.40	S/10,262.40	S/10,262.40	S/10,262.40	S/10,262.40

Los costos totales, llegan a S/ 53,325.80 el primer año y para el quinto año S/67,125.11 (Tabla 28).

Tabla 28. *Costos totales de producción y comercialización de plantines de cacao.*

CONCEPTO	COSTOS TOTALES				
	AÑOS				
	1	2	3	4	5
I. COSTOS DE PRODUCCIÓN	S/29,733.48	S/30,608.83	S/33,669.71	S/39,575.26	S/43,532.79
I.1. COSTOS DIRECTOS	S/26,753.48	S/27,628.83	S/30,391.71	S/35,608.88	S/39,169.77
I.1.1. MATERIALES DIRECTOS	S/8,753.48	S/9,628.83	S/10,591.71	S/11,650.88	S/12,815.97
I.1.2. MANO DE OBRA DIRECTA.	S/18,000.00	S/18,000.00	S/19,800.00	S/23,958.00	S/26,353.80
I.2. COSTOS INDIRECTOS	S/2,980.00	S/2,980.00	S/3,278.00	S/3,966.38	S/4,363.02
OTROS COSTOS INDIRECTOS	S/2,980.00	S/2,980.00	S/3,278.00	S/3,966.38	S/4,363.02
II. GASTOS DE OPERACIÓN	S/6,700.00	S/6,700.00	S/6,700.00	S/6,700.00	S/6,700.00
II.1. GASTOS DE VENTA	S/2,200.00	S/2,200.00	S/2,200.00	S/2,200.00	S/2,200.00
II.2. GASTOS ADMINISTRATIVOS	S/4,500.00	S/4,500.00	S/4,500.00	S/4,500.00	S/4,500.00
III. DEPRECIACIÓN DE ACT.FIJO Y AMORTIZACION INTANG.	S/10,262.40	S/10,262.40	S/10,262.40	S/10,262.40	S/10,262.40
TOTAL, EGRESOS	S/46,695.88	S/47,571.23	S/50,632.11	S/56,537.66	S/60,495.19

3.2.11. Estado de ganancias y pérdidas

Las ganancias está directamente relacionadas con la producción , en este caso la producción de plantas de plantas después del establecimiento se tendrá plantas a los 5 meses con solo 2 meses de pre- climatización en laboratorio ,teniendo en total 4 campañas por año se tomó el crecimiento de 5% por año (Tabla 29).La multiplicación de la producción con el precio por planta es que se obtuvo los ingresos (Tabla 30) , entonces en la resta de los ingreso y los egresos (costos , gastos ,depreciación y los impuestos) se obtiene el estado de resultados (Tabla 31).

Tabla 29. *Cronograma de producción de plantines de cacao*

AÑO	PRODUCCION en unidades												CANTIDAD TOTAL
	Ene.	Feb.	Mar.	Abr.	May.	Jun.	Jul.	Ago.	Set.	Oct.	Nov.	Dic.	
1									15000				15000
2	15000				15000				15000				45000
3	16500				16500				16500				49500
4	18150				18150				18150				54450
5	19965				19965				19965				59895

Considerando un incremento de 10 % en el volumen de las ventas y un incremento de 10 % en el precio de venta

Los ingresos el cual se toma como base el número de plantas a producir en el primer año se producirá 15000 plantas a un costo de 1.5 y posteriormente incrementándose al cuarto año se tiene los ingresos que se detalla en la Tabla 30.

Tabla 30. *Ingresos por la venta de plantines de cacao.*

AÑO	CANTIDAD TOTAL TM	VALOR DE VENTA UNITARIO US\$ / TM	TOTAL S/.
1	15000	2.5	S/37,500.00
2	45000	2.75	S/123,750.00
3	49500	3.025	S/149,737.50
4	54450	3.3275	S/181,182.38
5	59895	3.66025	S/219,230.67

Nota: Considerando un incremento de 10 % en el volumen de las ventas en los meses de producción y un incremento de 10 % en el precio de venta

En el estado de resultados obtenemos el primer año con números negativos debido a la demora del establecimiento de las plantas *in vitro*, posteriormente al segundo año se obtiene la utilidad neta de S/66,009.20 incrementándose considerablemente para el quinto año como se muestra los detalles en la Tabla 31.

Tabla 31. *Estado de resultados de la producción y venta de plantines de cacao.*

CONCEPTO	ESTADO DE RESULTADOS				
	AÑOS				
	1	2	3	4	5
I. INGRESOS (VENTAS)	S/37,500.00	S/123,750.00	S/149,737.50	S/181,182.38	S/219,230.67
VENTAS	S/37,500.00	S/123,750.00	S/149,737.50	S/181,182.38	S/219,230.67
INGRESOS EXTRAORDINARIOS					
II. COSTOS DE PRODUCCIÓN	S/29,733.48	S/30,608.83	S/33,669.71	S/39,575.26	S/43,532.79

III. UTILIDAD BRUTA	S/7,766.52	S/93,141.17	S/116,067.79	S/141,607.11	S/175,697.89
IV. GASTOS DE OPERACIÓN	S/6,700.00	S/6,700.00	S/6,700.00	S/6,700.00	S/6,700.00
GASTOS DE VENTA	S/2,200.00	S/2,200.00	S/2,200.00	S/2,200.00	S/2,200.00
GASTOS ADMINISTRATIVOS	S/4,500.00	S/4,500.00	S/4,500.00	S/4,500.00	S/4,500.00
V. DEPRECIACIÓN DE A.F. Y AMORT. INTANG	S/10,262.40	S/10,262.40	S/10,262.40	S/10,262.40	S/10,262.40
VI. UTILIDAD OPERATIVA	-S/9,195.88	S/76,178.77	S/99,105.39	S/124,644.71	S/158,735.49
VII. UTILIDAD ANTES DE IMPUESTO	-S/9,195.88	S/76,178.77	S/99,105.39	S/124,644.71	S/158,735.49
IX. IMPUESTO A LA RENTA (30 %)		S/22,853.63	S/29,731.62	S/37,393.41	S/47,620.65
UTILIDAD NETA	-S/9,195.88	S/53,325.14	S/69,373.77	S/87,251.30	S/111,114.84

3.2.13. Flujo de caja económico

El flujo de caja económico es la resta del ingreso menos los egresos en este caso también se incluyen en los egresos el capital de trabajo (Tabla 32).

Tabla 32. *Flujo de caja económico de la producción de plantines de cacao.*

CONCEPTO	0	1	2	3	4	5
I. INGRESOS		37500	123750	149737.5	181182.375	219230.6738
INGRESOS POR VENTA		37500	123750	149737.5	181182.375	219230.6738
VALOR RESIDUAL						
RECUPERO DE CAPITAL						
II. EGRESOS		(39,474.01)	(63,507.04)	(73,780.37)	(87,715.62)	(102,305.07)
II.1. INVERSION FIJA AÑO 0	(137,666.98)					
II.1.1 INVERSION FIJA TANGIBLE	101434					
II.1.2 INVERSION FIJA INTANGIBLE	720					
II.1.3 CAPITAL DE TRABAJO	30405.28	(3,040.53)	(3,344.58)	(3,679.04)	(4,046.94)	(4,451.64)
II.1.4 GASTOS GENERALES	5107.7					
II.2. COSTOS DE PRODUCCIÓN		(29,733.48)	(30,608.83)	(33,669.71)	(39,575.26)	(43,532.79)
II.3. GASTOS DE OPERACIÓN		(6,700.00)	(6,700.00)	(6,700.00)	(6,700.00)	(6,700.00)
II.4. IMPUESTO A LA RENTA		-	(22,853.63)	(29,731.62)	(37,393.41)	(47,620.65)
FLUJO DE CAJA ECONÓMICO	(137,666.98)	1,974.01	60,242.96	75,957.13	93,466.76	116,925.60

3.2.14. Indicadores de rentabilidad

Los indicadores de rentabilidad que obtuvimos de la implementación de una biofabrica para la producción de plantines *in vitro* de cacao (*Theobroma cacao* sp.) con la inversión de 208,629.34. Tenemos los siguientes indicadores de rentabilidad, el valor económico actual neto (VANE) tasa

económica interna de retorno (TIRE) el índice beneficio costo la índice rentabilidad (Tabla 33).

Tabla 33. *Indicadores de rentabilidad de la producción de plantines de cacao.*

INDICADOS BENEFICIO/COSTO	S/0.95
INDICE DE RENTABILIDAD	5.17
VANE	38,544.49
TIRE	29%

IV. DISCUSIÓN

En el presente estudio, los recipientes de inmersión temporal automatizada (Rita) con medio de cultivo líquido favorecieron al incremento de la biomasa en el desarrollo embrionario. Resultados similares fueron encontrados por Peña et al., (2016) en la multiplicación de embriones. El sistema de inmersión temporal automatizada favorece el desarrollo embrionario debido a que los embriones se encuentran en mayor contacto con el medio de cultivo y mejora el intercambio gaseoso. Este sistema ha demostrado ser eficiente en la producción de embriones y su desarrollo embrionario en varios cultivos (Cabasson et al., 1997; Albarrán et al., 2005; Hvoslef-Eide et al., 2005; Akdemir et al., 2014; Aragón et al., 2014; Ramírez-Mosqueda y Iglesias-Andreu, 2016). Cabe mencionar que estos autores obtuvieron mayor biomasa ya que en este estudio la multiplicación de los embriones somáticos se realizó en medio de cultivo sólido para la embriogénesis somática primaria y secundaria. El presente estudio siguió la metodología sugerida por Garcia et al., (2018) mientras que autores como Peña et al., (2016) y Maximova et al., (2005) realizaron la multiplicación de embriones en el sistema de inmersión temporal RITA directamente en la embriogénesis secundaria logrando obtener multiplicación de embriones y obtener mayor biomasa.

La multiplicación *in vitro* de cacao fue efectiva en los sistemas de inmersión temporal aumentando el diámetro en la frecuencia de inmersión cada 3 horas y medio de cultivo (M3) sugerido por Niemenak et al., (2008) tuvo la composición esencial de sales DKW y la fuente de energía sacarosa 30g/L y glucosa 1g/L. (Niemenak et al., 2008). Estos resultados fueron similares a los obtenidos por Driver et al. (1984), Maximova et al. (2005) Peña et al. (2016) y Garcia et al. (2018) a pesar que este medio fue formulado para hortalizas por Driver et al., (1984). Otros cultivos generalmente para la multiplicación y desarrollo embrionario utilizan el medio MS (Murashige & Skoog, 1962) como en la propagación *in vitro* de café en sistema de inmersión temporal automatizada (Albarrán et al., 2005). La formación de plantas en nuestra investigación obtuvo aproximadamente el 34% de plantas transformadas en sistema de inmersión temporal. Muy semejante a lo obtenido por Norasekin et al., (2020) quienes en medio líquido en suspensión obtuvieron mayor número de embriones transformados a planta que en medio sólido.

Las modificaciones de frecuencia de inmersión afectaron en el desarrollo del embrión evidenciándose mayor diámetro y transformación a planta en la inmersión con mayor frecuencia. En la revisión de Etienne & Berthouly (2002) revela que la frecuencia de inmersión varía para cada especie y es esencial para la eficacia del sistema. Además la hiperhibrididad afecta generalmente en medio de cultivo líquido pero esto se puede controlar con la frecuencia de inmersión (Etienne & Berthouly, 2002).

Niemenak et al., (2008) obtuvo mayor biomasa con frecuencia de inmersión cada 4 horas por 1 minutos. Nuestro estudio obtuvo mayor biomasa en frecuencia de inmersión cada 3 horas por 1 minuto. Esto se puede explicar tal como indican Teisson & Alvard, (1995) que cuanto mayor es la frecuencia de inmersión se puede obtener más proliferación de embriones y desarrollo. Así mismo Teisson & Alvard, (1995) explican que la absorción de nutrientes generalmente se da por la película retenida en los tejidos de la planta por capilaridad. Aunque Albarrán et al., (2005) indica que a mayor frecuencia de inmersión causa la hiperhibrididad.

En este trabajo, los ensayos de desarrollo embrionario en sistema de inmersión temporal automatizada con medio DKW obtuvo el 100 % de sobrevivencia a diferencia de los ensayos de regeneración a planta, donde la sobrevivencia se fue reduciendo. Esto se debe a que, en la regeneración a planta los embriones están sometidos a mayor tiempo en los RITA. Esto incrementa el riesgo contaminación y estrés. Por otra parte, Ramírez-Mosqueda & Iglesias-Andreu, (2016) obtuvieron el 100 de sobrevivencia en todo el tiempo con la especie de *Vanilla planifolia* Jacks con medio MS.

El material vegetal propagado por inmersión temporal tiene mejores resultados en la fase de climatización que el material obtenido en medios semisólidos o líquido (Etienne & Berthouly, 2002). Existen estudios que indican que la fuente de energía puede afectar en la climatización de las plantas *ex vitro*. Por ejemplo, en el cultivo de rosa se informó que los medios de cultivo altos en sacarosa tuvieron mayor probabilidad de supervivencia en la climatización (Capellades et al., 1991). Niemenak et al., (2008) utilizaron medio de cultivo DKW con 60 g/L sacarosa colocando los embriones cotiledonales directos a sustrato de arena y logrando la transformación a planta.

La rentabilidad de la propagación de plantas de cacao por propagación vegetativa con injertos de variedades comerciales o criollos tiene una excelente relación B/C de 10.81 (Armijo, 2015). La gran limitante de la propagación por injertos es que no se puede

obtener mayor a 1000 plantas al año debido a que solo existe 3 plantas madre de cacao criollo para los genotipos ALB03, mientras que por cultivo *in vitro* se podría obtener hasta 60000 plantas por año. Así mismo Ramírez-Mosqueda & Iglesias-Andreu, (2016) en sus hallazgos confirman la utilidad de los sistemas BIT® en la optimización de la micropropagación comercial de esta especie *Vanilla planifolia* Jacks. Además, este sistema reduce los costes asociados al uso de los sistemas RITA®. La alta producción de embriones está directamente relacionadas con la reducción de costos lo que puede permitir la producción masiva de genotipos superiores (Ramírez et al., 2018).

Magaña et al., (2019) en su investigación de la rentabilidad de anturios propagados por *in vitro* demuestra la rentabilidad de la biofábrica con RITAS produciendo 400000 plantas al año con 210 RITA obteniendo un TIR de 73.64% y relación beneficio costo de 1.67 valor actual neto de US\$ 131230.08. Si dividimos esto por 4 ciclos por año estaría cargando 476 plantas por RITA lo que sí es posible, pero en el caso de cacao criollo aún no se puede llegar a esa cantidad de multiplicación de embriones. Para nuestro caso solo se ha considerado 100 RITA debido a su alto costos de unidad. Los embriones llegan hasta 35 por cada callo y en cada placa Petri se cultiva 20, por lo tanto, se tiene un rendimiento de 300 embriones por placa, siendo muy factible alcanzar los 15000 como mínimo. La cantidad de embriones colocados sería de 150 embriones por RITA para 250 mL de medio de cultivo, pero el periodo de cultivo sería de 3 meses en los RITA en lo que puede alcanzar a 5 hojas por planta lo que obtendríamos menores beneficios en el cultivo de cacao debido a que el cacao por planta se vende más barato que las plantas ornamentales.

Los biorreactores de inmersión temporal RITA son herramientas muy efectivas para la producción masiva de plantas pero también tiene sus desventajas como la costosa implementación y la frecuente contaminación (Trauger et al., 2022). El costo de implementación de la biofábrica que desarrollamos en este trabajo confirma que solo los recipientes de inmersión temporal automatizada son aproximadamente el 50 % de la inversión para la instalación de una biofabrica productora masiva de plantas. Sin embargo, si se cambia a otro sistema como los matraces gemelos con la misma eficiencia y con el sistema de bolsas plásticas de Trauger et al., (2022) reduciría aproximadamente el 30 y 40 % de la inversión en la creación de una biofabrica.

V. CONCLUSIONES

- El desarrollo de los embriones con dos frecuencias de inmersión y tres medios de cultivo no muestran diferencias significativas en la producción de biomasa.
- El desarrollo de los embriones con el medio 3 basado en (Niemenak et al., 2008) con la frecuencia de 8 veces por día por 1 minuto en relación al diámetro longitudinal y la cantidad de embriones con inicios de transformación a planta mostró los mejores resultados.
- Los embriones en su regeneración a planta presentó mejores resultados en el medio M2 basado en (Garcia et al., 2018) con la frecuencia de 8 veces por día por 1 minuto de inmersión obteniendo mayor biomasa y transformación a planta. Sin embargo, se encontró mayor sobrevivencia en el medio 1.
- El presente estudio obtuvo una rentabilidad de biofábrica produciendo cacao criollo fino de aroma con 60 mil plantas en base a 100 RITAS y con el indicador de costo beneficio de 0.95, valor actual neto de S/ 38,544.49, índice de rentabilidad de 5.17 y tasa interna de retorno de 29% tomando como precio de venta de 1.5 por cada planta. Cabe mencionar que si se cambia los recipientes de inmersión temporal automatizada (RITA) por el sistema de matraces gemelos se reduciría el costo un 37.5 % de la inversión.

VI. RECOMENDACIONES

- Se recomienda utilizar el medio de cultivo M2 para la producción de embriones de cacao fino de aroma mediante embriogénesis somática en el sistema de inmersión temporal automatizada (RITA®). Este medio demostró ser eficiente en términos de diámetro y biomasa, contribuyendo significativamente a la transformación a planta.
- El tiempo de inmersión óptimo para obtener los mejores resultados en términos de diámetro y biomasa fue de 10 veces por 1 minuto al día. Esta frecuencia de inmersión mostró significancia en la transformación a planta y se sugiere como la práctica más adecuada.
- Considerando el precio de venta de S/ 2.5 por planta, se sugiere continuar con la implementación y expansión de este método de producción
- Se recomienda continuar investigando y perfeccionando estos parámetros para mejorar aún más la eficiencia y sostenibilidad de la producción de embriones de cacao fino de aroma a través de la embriogénesis somática en el sistema RITA®.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Akdemir, H., Süzerer, V., Onay, A., Tilkat, E., Ersali, Y., & Çiftçi, Y. O. (2014). Micropropagation of the pistachio and its rootstocks by temporary immersion system. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 117(1) 65–76. <https://doi.org/10.1007/s11240-013-0421-0>
- Albarrán, J., Bertrand, B., Lartaud, M., & Etienne, H. (2005). Cycle characteristics in a temporary immersion bioreactor affect regeneration, morphology, water and mineral status of coffee (*Coffea arabica*) somatic embryos. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 81(1) 27–36. <https://doi.org/10.1007/s11240-004-2618-8>
- Alemanno, L., Berthouly, M., & Michaux-Ferrière, N. (1996). Histology of somatic embryogenesis from floral tissues cocoa. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 46(3) 187–194. <https://doi.org/10.1007/BF02307094>
- Aragón, C. E., Sánchez, C., Gonzalez-Olmedo, J., Escalona, M., Carvalho, L., & Amâncio, S. (2014). Comparison of plantain plantlets propagated in temporary immersion bioreactors and gelled medium during *in vitro* growth and acclimatization. *Biologia Plantarum*, 58(1) 29–38. <https://doi.org/10.1007/s10535-013-0381-6>
- Armijo, A. A. (2015). *Alidación de tres métodos de propagación en cacao (Theobroma cacao L.) nacional y trinitario en la Finca Experimental La Represa.*
- Arthur, T., Mahamadou, S., Cheikh, M. M., & and, K.-R. L. (2017). Comparative effects of plant growth promoters and earthworms (*Millsonia anomala*) on rooting of cocoa orthotropic cuttings. *African Journal of Biotechnology*, 16(16) 860–868. <https://doi.org/10.5897/ajb2017.15933>
- Banda, G. (2018). A Brief Review of Independent, Dependent and One Sample t-test. *International Journal of Applied Mathematics and Theoretical Physics*, 4(2) 50. <https://doi.org/10.11648/j.ijamtp.20180402.13>
- Beg, M. S., Ahmad, S., Jan, K., & Bashir, K. (2017). Status, supply chain and processing of cocoa - A review. *Trends in Food Science and Technology*, 66, 108–116. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.06.007>
- Blank, L. T., Tarquin, A. J., & Mendoza, C. F. (1991). *Ingenieria Economica*. In McGraw-

- Hill , *Global Conference on Business and Finance Proceedings* (Vol. 3, Issue 2).
- Cabasson, C., Alvard, D., Dambier, D., Ollitrault, P., & Teisson, C. (1997). Improvement of Citrus somatic embryo development by temporary immersion. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 50(1) 33–37. <https://doi.org/10.1023/A:1005896725780>
- Calderón, X. C., Yohana, G., Castillo, C., & Calderón, R. E. (2021). *Revista faeco sapiens The importance of financial statements in financial-accounting decision making.* 82–96.
https://revistas.up.ac.pa/index.php/faeco_sapiensRecibido:18/03/21Aceptado:01/5/21
- Capellades, M., Lemeur, R., & Debergh, P. (1991). Effects of sucrose on starch accumulation and rate of photosynthesis in Rosa cultured *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 25(1) 21–26. <https://doi.org/10.1007/BF00033908>
- Castillo, A. (2004). *Propagación de plantas por cultivo*.
- Chía Wong, J., Marquéz Dávila, Ka., Cárdenas Salazar, H., Hurtado Gonzales, O., Huaman Camacho, T., Cespedes del Pozo, W., Saavedra Arbildo, R., Beraun Cruz, Y., Carranza Cruz, M., & Gutarra Castillo, B. (2017). Avances en el estudio de las bases genéticas y organolépticas del cacao fino o de aroma en el Perú. *International Symposium on Cocoa Research (ISCR) November, 4*.
- Córdova, V., Mendoza-Palacios, J. D., Vargas-Villamil, L., Izquierdo-Reyes, F., & Ortiz-García, C. F. (2008). Participacion de las asociaciones campesinas en el acopio y comercialización de cacao (*Theobroma cacao* L.) en Tabasco, México. *Universidad y Ciencia*, 24(2) 147–158. www.ujat.mx/publicaciones/uciencia
- Díaz-Valderrama, J. R., Leiva-Espinoza, S. T., & Catherine Aime, M. (2020). The history of cacao and its diseases in the Americas. *Phytopathology*, 110(10) 1604–1619. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-05-20-0178-RVW>
- Driver, J., Kuniyuki, R., & Knniyuki, A. (1984). *In vitro* propagation of Paradox walnut rootstock. *HortScience*, 19, 507–550.
- Echavarría, J. J., Esguerra, P., McAllister, D., & Robayo, C. F. (2014). *Caficultura en Colombia (versión preliminar , no citar ni reproducir sin autorización de los autores) Juan José Echavarría , Pilar Esguerra , Daniela McAllister , Carlos Felipe*

Robayo.

- Esan, E. B. (1992). *Micropropagation of Cocoa (Theobroma cacao L.)*. 18, 96–122. https://doi.org/10.1007/978-3-642-76422-6_5
- Etienne, H., & Berthouly, M. (2002). Temporary immersion systems in plant micropropagation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 69(3) 215–231. <https://doi.org/10.1023/A:1015668610465>
- Fiallos, G. (2021). La correlación de pearson y el proceso de regresión por el método de mínimos cuadrados. *Ciencia latina Revista científica multidisciplinar*, 5(3) 2491–2509. https://doi.org/10.37811/cl_rcm.v5i3.466
- García-González, R., Quiroz, K., Carrasco, B., & Caligari, P. (2010). Plant tissue culture: Current status, opportunities and challenges. *Ciencia e investigación agraria*, 37(3) 5–30. <https://doi.org/10.4067/s0718-16202010000300001>
- García, B. H. (2014). Acerca de la tasa de descuento en proyectos. In *Quipukamayoc* (Vol. 15, Issue 29).
- García, C., Marelli, J. P., Motamayor, J. C., & Villela, C. (2018). Chapter 15. *Somatic Embryogenesis in Theobroma Cacao L.*, 279, 368–396. [https://doi.org/10.1206/0003-0090\(2003\)279<0368:c>2.0.co;2](https://doi.org/10.1206/0003-0090(2003)279<0368:c>2.0.co;2)
- Gonza Chapa, S. R. (2022). *Caracterización física y química de almendras secas del cacao fino de aroma (Theobroma cacao L.) provenientes de la región Amazonas*. Universidad nacional toribio rodríguez de mendoza de Amazonas.
- Graefe, L., Hahn, S., & Mayer, A. (2022). On the Relationship between ANOVA Main Effects and Average Treatment Effects. *Multivariate Behavioral Research*, 1, 17.
- Henao, A. M., & Urrea, A. I. (2020). Somatic Embryogenesis for Clonal Propagation and Associated Molecular Studies in Cacao (*Theobroma cacao L.*). In *Agricultural, Forestry and Bioindustry Biotechnology and Biodiscovery*.
- Hvoslef-Eide, A. K., Olsen, O. A. S., Lyngved, R., Munster, C., & Heyerdahl, P. H. (2005). Bioreactor design for propagation of somatic embryos. *Liquid Culture Systems for in vitro Plant Propagation*, 9781402031, 41–59. https://doi.org/10.1007/1-4020-3200-5_3

- Johnson, R. W. (2022). Alternate Forms of the One-Way ANOVA F and Kruskal–Wallis Test Statistics. *Journal of Statistics and Data Science Education*, 30(1) 82–85. <https://doi.org/10.1080/26939169.2021.2025177>
- Kryukov, L. A., Vodolazhsky, D. I., & Kamenetsky-Goldstein, R. (2022). Micropropagation of Grapevine and Strawberry from South Russia: Rapid Production and Genetic Uniformity. *Agronomy*, 12(2) 1–10. <https://doi.org/10.3390/agronomy12020308>
- Lázaro, A., Azpeitia Morales, A., Sáenz-Carbonell, L., & Mirafuentes Hernández, F. (2015). Embriogénesis somática secundaria en el genotipo de cacao (*Theobroma cacao* L.) inifap 1 y su descripción histológica. *Nova Scientia*, 7(14) 398. <https://doi.org/10.21640/ns.v7i14.35>
- Li, Z., Traore, A., Maximova, S., & Gultinan, M. J. (1998). *Theobroma cacao*. 293–299.
- López, A. A. D., Sánchez, D., Leal, J. V., & García, A. L. V. (2015). Formación de embriones somáticos en cinco cultivares de *Theobroma cacao* L. *Biotecnología Vegetal*.
- Luis, J., Embriones, I. D. E., Cacao, S. D. E., Automatico, S. D. E. I., Peña-lópez, J. L., Azpeitia-morales, A., Mirafuentes-hernández, F., Ruíz-carrera, V., & Sáenz-carbonell, L. (2016). *Theobroma cacao* L.) *Theobroma cacao* L.) in *Immersion System*.
- Magaña, J. C. A., Velazquez, J. H. C., Chan, M. A. C., Lopez, J. E. V., & Montero, J. A. R. (2019). *Biofactory and temporary immersion bioreactor: 12*, 23–29.
- Mathison, L., & Primera, C. (2007). Innovación : factor clave para lograr ventajas competitivas innovation : key factor to achieve competitive advantages Introducción Consideraciones Iniciales. *Revista NEGOTIUM / Ciencias Gerenciales*, 7, 65–83. <http://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=2573532>
- Maximova, S. N., Young, A., Pishak, S., Miller, C., Traore, A., & Gultinan, M. J. (2005). Integrated System for Propagation of. *Protocol for Somatic Embryogenesis in Woody Plants*, 209–227.
- Ministerio de Agricultura y Riego. (2020). Observatorio de Commodities - Cacao. *Boletín de Publicación Trimestral*.

- Morales, O., Borda, A., Argandoña, A., Farach, R., Naranjo, L. ., & Lazo, K. (2015). La Alianza Cacao Perú y la cadena productiva del cacao fino de aroma. In *Esan Ediciones*.
http://repositorio.esan.edu.pe/bitstream/handle/ESAN/111/Gerencia_para_el_desarrollo_49.pdf
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). "Citation classics" and classic citations in JAFc. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(1) 1–19.
<https://doi.org/10.1021/jf9040386>
- Niemenak, N., Saare-Surminski, K., Rohsius, C., Ndoumou, D. O., & Lieberei, R. (2008). Regeneration of somatic embryos in *Theobroma cacao* L. in temporary immersion bioreactor and analyses of free amino acids in different tissues. *Plant Cell Reports*, 27(4) 667–676. <https://doi.org/10.1007/s00299-007-0497-2>
- Norasekin, T., Norhana, S., & Kasran, R. (2020). Induction and propagation of somatic embryos from cell suspension cultures of *Theobroma cacao* L. *Malaysian Cocoa Journal*, 12(November).
- Peña, J. L., Azpeitia-Morales, A., Mirafuentes-Hernández, F., Ruíz-Carrera, V., & Sáenz-Carbonell, L. (2016). Embriogénesis somática en cacao (*Theobroma cacao*) en sistemas de inmersión automático. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios*, 3(8) 215–224. www.ujat.mx/era215
- Pence, V. C. (2011). Evaluating costs for the *in vitro* propagation and preservation of endangered plants. *In vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 47(1) 176–187. <https://doi.org/10.1007/s11627-010-9323-6>
- Pérez, A., & Inchausti, B. G. (1996). *Análisis dinámico de la capacidad de los flujos de fondos para determinar los futuros flujos de caja*. XXV, 9–34.
- Pérez, D., & Martínez, I. (2006). El Precio. Tipos y Estrategias de fijación. *EOI Marketing*, 4, 53. <https://static.eoi.es/savia/documents/componente45108.pdf>
- Ramírez-Mosqueda, M. A., & Iglesias-Andreu, L. G. (2016). Evaluation of different temporary immersion systems (BIT®, BIG, and RITA®) in the micropropagation of *Vanilla planifolia* Jacks. *In vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 52(2) 154–160. <https://doi.org/10.1007/s11627-015-9735-4>

- Ramírez, A., de la Hoz Vasquez, T., Ospina Osorio, T. M., Garcés, L. A., & Urrea Trujillo, A. I. (2018). Evaluation of the potential of regeneration of different Colombian and commercial genotypes of cocoa (*Theobroma cacao* L.) via somatic embryogenesis. *Scientia Horticulturae*, 229(October 2017) 148–156. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.10.040>
- Ramírez, P., Vera, A. A. M., Rivera, M. G. Z., & Álvarez, R. H. A. (2021). *El flujo de caja en la evaluación de proyectos inversión*. 5, 150–168.
- Rusconi, M., & Conti, A. (2010). *Theobroma cacao* L., the Food of the Gods: A scientific approach beyond myths and claims. *Pharmacological Research*, 61(1) 5–13. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2009.08.008>
- Salman, D. D., & Al-Omari, M. M. A. H. (2022). The impact of internal and external factors of the competitive environment on the competitive performance of the Iraqi Company for Seed Production (ICSP). *Materials Today: Proceedings*, 49, 2765–2772.
- Schmidt, E., & Van de Walle, S. (2022). Defending, prospecting or reacting? Strategic management during cutbacks in the Dutch penitentiary sector. *Financial Accountability and Management*, 38(1) 77–96. <https://doi.org/10.1111/faam.12271>
- Shires, M. E., Florez, S. L., Lai, T. S., & Curtis, W. R. (2017). Inducible somatic embryogenesis in *Theobroma cacao* achieved using the DEX-activatable transcription factor-glucocorticoid receptor fusion. *Biotechnology Letters*, 39(11) 1747–1755. <https://doi.org/10.1007/s10529-017-2404-4>
- Smida, Z., Cucala, L., Gannoun, A., & Durif, G. (2022). A Wilcoxon-Mann-Whitney spatial scan statistic for functional data. *Computational Statistics & Data Analysis*, 167, 107378. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.csda.2021.107378>
- Söndahl, M. R., Liu, S., Bellato, C., & Bragin, A. (1993). Cacao Somatic Embryogenesis. In *Acta Horticulturae* (Issue 336, pp. 245–248). <https://doi.org/10.17660/actahortic.1993.336.31>
- Suárez, M., Martín Iturrieta, L., Orellana, P., Triana, R., Pérez, Z., Rodríguez, M., Agramonte, D., Sarría, Z., & para correspondencia, A. (2009). Procedimiento metodológico para la conformación, implementación y perfeccionamiento de sistemas de calidad para biofábricas. *Biotecnología Vegetal*, 9(3) 141–152.

<http://132.248.9.34/hevila/Biotecnologiavegetal/2009/vol9/no3/2.pdf>

- Teisson, C., & Alvard, D. (1995). *A New Concept of Plant In vitro Cultivation Liquid Medium: Temporary Immersion*. 105–110. https://doi.org/10.1007/978-94-011-0307-7_12
- Trauger, M., Hile, A., Sreenivas, K., Shouse, E. M., Bhatt, J., Lai, T., Mohandass, R., Tripathi, L., Ogden, A. J., & Curtis, W. R. (2022). CO₂ supplementation eliminates sugar-rich media requirement for plant propagation using a simple inexpensive temporary immersion photobioreactor. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 150(1) 57–71. <https://doi.org/10.1007/s11240-021-02210-3>
- Wang, Z., Lu, Y., Ran, L. and, & Yang, D. (2022). Multichannel retailers' prominent attribute and product positioning strategies. *Https://Www.Emerald.Com/Insight/Publication/Issn/0959-0552, ahead-of-p, ahead-of-prin.*
- Zamora, L. M. V., Aguila, S. R.-D., Abad, J. C. G., Torres, G. V., Correa, S. A. I., Flores, E. T., Sequeira, F. M., & Guivin, M. A. C. (2022). Propagation of Theobroma cacao by Rooted Cuttings in Mini-Tunnels. *Advances in Agriculture*, 2022, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2022/1196381>
- Ziv, M. (2005). Simple bioreactors for mass propagation of plants. *Liquid Culture Systems for in vitro Plant Propagation*, 9781402031, 79–93. https://doi.org/10.1007/1-4020-3200-5_5

Anexos

Anexo 1: Tablas de estadísticos de los ensayos

Tabla A 1. *Prueba de normalidad ensayo desarrollo embrionario biomasa-frecuencia.*

Shapiro-Wilk			
	Estadístico	gl	Sig.
Biomasa	.772	18	.001

Tabla A 2. *Prueba de Mann-Whitney ensayo desarrollo embrionario la variable biomasa -frecuencia.*

Frecuencia de inmersión	N	Rango promedio
Biomasa		
Frecuencia 1	9	8.22
Frecuencia 2	9	10.78
Total	18	

Tabla A 3. *Estadísticos de contraste de la prueba de Mann-Whitney para la variable biomasa -frecuencia, ensayo desarrollo embrionario.*

	Biomasa
U de Mann-Whitney	29.000
W de Wilcoxon	74.000
Z	-1.015
Sig. asintót. (bilateral)	.310
Sig. exacta [2*(Sig. unilateral)]	.340 ^b

a. Variable de agrupación: Frecuencia de inmersión

b. No corregidos para los empates.

Tabla A 4. *Prueba de normalidad para los datos de la biomasa y medio de cultivo-ensayo desarrollo embrionario.*

		Shapiro-Wilk		
Medio de cultivo		Estadístico	gl	Sig.
Biomasa	M1	.712	6	.008
	M2	.786	6	.044
	M3	.847	6	.148

Tabla A 5. *Estadístico Kruskal-Wallis de los datos de la variable Biomasa-ensayo desarrollo embrionario.*

Medio de cultivo	N	Rango promedio
Biomasa M1	6	6.17
M2	6	9.00
M3	6	13.33
Total	18	

Tabla A 6. *Estadístico de contraste de variables biomasa, frecuencia de inmersión y medios de cultivo-ensayo desarrollo embrionario.*

	Biomasa
Chi-cuadrado	5.485
gl	2
Sig. asintót.	.064

a. Prueba de Kruskal-Wallis

b. Variable de agrupación: Medio de cultivo

Tabla A 7. *Prueba de normalidad para los datos de la variable diámetro de embriones-ensayo desarrollo embrionario.*

	Estadístico	gl	Sig.
Diámetro longitudinal	.882	18	.028

Tabla A 8. *Prueba de Mann-Whitney variable diámetro de embriones-Frecuencia de inmersión -ensayo desarrollo embrionario.*

Frecuencia de inmersión	N	Rango promedio	Suma de rangos
Diámetro Frecuencia 1	9	6.50	58.50
Frecuencia 2	9	12.50	112.50
Total	18		

Tabla A 9. *Estadístico de contraste variable diámetro de embriones-frecuencia de inmersión-ensayo desarrollo embrionario.*

		Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias		
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)
Diámetro	Se han asumido varianzas iguales	.018	.894	-2.350	16	.032
	No se han asumido varianzas iguales			-2.350	15.908	.032

Tabla A 10. *Prueba de normalidad para el diámetro de embriones-medios de cultivo-ensayo desarrollo embrionario.*

Medio de cultivo		Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Sig.
Diámetro	M1	.871	6	.230
	M2	.813	6	.077
	M3	.896	6	.350

*. Este es un límite inferior de la significación verdadera.

a. Corrección de la significación de Lilliefors

Tabla A 11. *Prueba de Kruskal-Wallis para la variable diámetro de embriones-ensayo desarrollo embrionario.*

Medio de cultivo		N	Rango promedio
Diámetro	M1	6	4.50
	M2	6	10.67
	M3	6	13.33
	Total	18	

Tabla A 12. *Estadístico de contraste Kruskal-Wallis diámetro de embriones-ensayo desarrollo embrionario.*

	Diámetro
Chi-cuadrado	8.679
gl	2
Sig. asintót.	.013

a. Prueba de Kruskal-Wallis
b. Variable de agrupación: Medio de cultivo

Tabla A 13. *Prueba de normalidad para los datos del ensayo embriones transformados a planta-desarrollo embrionario.*

	Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.
Transformadas a planta	.817	18	.003

Tabla A 14. *Prueba Mann-Whitney para las variables transformadas a planta con la frecuencia-ensayo desarrollo embrionario.*

Frecuencia de inmersión		N	Rango promedio	Suma de rangos
Transformadas a planta	Frecuencia 1	9	12.89	116.00
	Frecuencia 2	9	6.11	55.00
	Total	18		

Tabla A 15. *Estadístico de contraste variables transformadas a planta con la frecuencia-ensayo desarrollo embrionario.*

	Plantas transformadas
U de Mann-Whitney	10.000
W de Wilcoxon	55.000
Z	-2.772
Sig. asintót. (bilateral)	.006
Sig. exacta [2*(Sig. unilateral)]	.006 ^b

- a. Variable de agrupación: Frecuencia de inmersión
b. No corregidos para los empates.

Tabla A 16. *Prueba de normalidad para la transformación a plantas con varios medios de cultivo-ensayo desarrollo embrionario.*

Medio de cultivo		Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Sig.
Plantas transformadas	M1	.750	6	.020
	M2	.814	6	.078
	M3	.733	6	.014

Tabla A 17. *Prueba de Kruskal-Wallis para las variables transformación a planta -medios de cultivo-ensayo desarrollo embrionario.*

Medio de cultivo		N	Rango promedio
Plantas transformadas	M1	6	8.83
	M2	6	10.25
	M3	6	9.42
	Total	18	

Tabla A 18. *Estadístico de contraste de la prueba Kruskal-Wallis para las variables transformación a planta con medios de cultivo-ensayo desarrollo embrionario.*

		Plantas transformadas
Chi-cuadrado		.226
gl		2
Sig. asintót.		.893

a. Prueba de Kruskal-Wallis

b. Variable de agrupación: Medio de cultivo

Tabla A 19. *Prueba de normalidad para los datos de la variable biomasa con Shapiro-Wilk-ensayo regeneración a planta.*

	Estadístico	gl	Sig.
Biomasa	.914	18	.100

a. Corrección de la significación de Lilliefors

Tabla A 20. *Análisis de Varianza para las variables frecuencia, medio de cultivo, frecuencia de inmersión-ensayo regeneración a planta.*

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Frecuencia	1	5.037	5.0371	17.6	0.001
Medio	2	12.41	6.2048	21.68	0
Frecuencia*Medio	2	1.795	0.8974	3.14	0.08
Error	12	3.435	0.2862		
Total	17	22.676			

Tabla A 21. *Prueba de normalidad para los datos de la variable transformación a plantas-ensayo regeneración a planta.*

	Estadístico	gl	Sig.
Transformadas a planta	0.958	18	0.562

Tabla A 22. *Anova de las variables transformación a planta con la frecuencia de inmersión y medio de cultivo-ensayo regeneración a planta.*

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Frecuencia	1	12.5	12.5	14.06	0.003
Medio	2	16	8	9	0.004
Frecuencia*Medio	2	1.333	0.6667	0.75	0.493
Error	12	10.667	0.8889		
Total	17	40.5			

Tabla A 23. *Pruebas de normalidad Shapiro-Wilk para la variable sobrevivencia-ensayo regeneración a planta.*

	Estadístico	gl	Sig.
Sobrevivencia	.959	18	.577

*. Este es un límite inferior de la significación verdadera.

a. Corrección de la significación de Lilliefors

Tabla A 24. *Análisis de Varianza para las variables sobrevivencia con la frecuencia de inmersión, medio de cultivo y su interacción-ensayo regeneración a planta.*

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Frecuencia	1	0.2222	0.2222	0.17	0.69
Medio	2	49.7778	24.8889	18.67	0
Frecuencia*Medio	2	0.4444	0.2222	0.17	0.848
Error	12	16	1.3333		
Total	17	66.4444			

Anexo 2: Validación de encuestas para estudio de Mercado

INSTRUMENTO PARA LA VALIDEZ DE CONTENIDO (JUICIO DE EXPERTOS)

El presente instrumento tiene como finalidad validar el cuestionario de una encuesta, el mismo que será aplicado a familias productoras de cacao en la provincia de Bagua, que forman parte del estudio "PRODUCCIÓN DE EMBRIONES DE CACAO FINO DE AROMA (Theobroma cacao L.) MEDIANTE EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN EL SISTEMA DE INMERSIÓN TEMPORAL AUTOMATIZADA (RITA®)", con un diseño no experimental descriptivo.

Instrucciones

La evaluación requiere de una lectura detallada y completa de cada uno de los ítems propuestos, a fin de cotejarlos de manera cualitativa con los criterios propuestos relativos a) **Claridad de redacción**, b) **Congruencia con el contenido**, c) **Contexto correcto del ítem** y d) **Dominio del Constructo**. Por cada ítem de acuerdo con los criterios propuestos deberá emitir un juicio de valor, asignándole una calificación, y de ser necesario anotar las observaciones si hubiera.

Juez N°: 01

Fecha actual: 23/05/2022

Nombres y Apellidos de Juez: Segundo Grimaldo Chavez Quintana

Universidad donde labora: Universidad Nacional Toribio Rodriguez de Mendoza de Amazonas

Años de experiencia profesional o científica: 10 años.

Profesión: Ingeniero Agroindustrial

Mayor Grado Académico que ostenta: Máster en economía agroalimentaria y del medio ambiente.

Puesto que desempeña: Investigador y Docente

Competencias que ha evaluado: claridad, congruencia, contexto y dominio del constructo


Segundo Grimaldo Chavez Quintana
DNI N° 44011631

 0000-0002-0946-3445

INVENTARIO DEL CUESTIONARIO: PRODUCCIÓN DE EMBRIONES DE CACA O FINO DE AROMA (Theobroma cacao L.) MEDIANTE EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN EL SISTEMA DE INMERSIÓN TEMPORAL AUTOMATIZADA (RITA*)
 INSTRUMENTO PARA FINES ESPECÍFICOS DE LA VALIDACIÓN DE CONTENIDO (JUICIO DE EXPERTOS)

Calificación: Muy aceptable (5) Aceptable (4) Regular (3) Poco aceptable (2) Inaceptable (1)

Nº	DIMENSION DEMOGRAFICA	Claridad					Congruencia					Contexto					Dominio del constructo					Sugerencias					
		5	4	3	2	1	5	4	3	2	1	5	4	3	2	1	5	4	3	2	1						
1	¿Cuál es su nivel educativo?	X					X					X					X										
CUESTIONARIO																											
Nº	ECONOMÍA DEL PRODUCTOR	Claridad					Congruencia					Contexto					Dominio del constructo					Sugerencias					
		5	4	3	2	1	5	4	3	2	1	5	4	3	2	1	5	4	3	2	1						
2	¿Con qué área de terreno cuenta?	X					X					X					X										
3	¿Cuánto es su ingreso mensual?	X					X					X					X										
4	¿Qué variedad de cacao cultiva?	X					X					X					X										
5	¿Cuántos quintales de cacao cosecha por campaña?	X					X					X					X										
6	¿Prefiere plántones de cacao injertados?	X					X					X					X										
7	¿A usted le interesaría comprar plántones de cacao criollo fino de aroma ex vitro?	X					X					X					X										
8	¿Cuánto pagaría por ciento de plántones de cacao ex vitro?	X					X					X					X										
9	¿Qué cantidad compraría usted de plántones de cacao ex vitro?	X					X					X					X										

Encuesta de Estudio de Mercado

El presente cuestionario tiene el objetivo de recabar información para conocer los diferentes aspectos de la economía del productor y sus hábitos de consumo. Con el cual se pretende tener una idea y conocimientos sobre la economía y hábitos de consumo.

Los resultados obtenidos serán tratados con la absoluta confidencialidad.

Nombre: _____

DNI : _____ Edad : _____

I. Dimensión demográfica

1. ¿Cuál es su nivel educativo?

- a) () Sin estudios
- b) () Primaria
- c) () Secundaria
- d) () Superior

II. Dimensión Económica

2. ¿Con qué área de terreno cuenta?

3. ¿Cuánto es su ingreso mensual?

4. ¿Qué variedad de cacao cultiva?

5. ¿Cuántos quintales de cacao cosecha por campaña?

6. ¿Prefiere plántones de cacao injertados?

- a) () Si
- b) () No

7. ¿A usted le interesaría comprar plántones de cacao criollo fino de aroma ex vitro?

- a) () si
- b) () no

8. ¿Cuánto pagaría por ciento de plántones de cacao ex vitro?

9. ¿Qué cantidad compraría usted de plántones de cacao ex vitro?



INSTRUMENTO PARA LA VALIDEZ DE CONTENIDO (JUICIO DE EXPERTOS)

El presente instrumento tiene como finalidad validar el cuestionario de una encuesta, el mismo que será aplicado a familias productoras de cacao en la provincia de Bagua, que forman parte del estudio “PRODUCCIÓN DE EMBRIONES DE CACAO FINO DE AROMA (*Theobroma cacao* L.) MEDIANTE EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN EL SISTEMA DE INMERSIÓN TEMPORAL AUTOMATIZADA (RITA®)”, con un diseño no experimental descriptivo.

Instrucciones

La evaluación requiere de una lectura detallada y completa de cada uno de los ítems propuestos, a fin de cotejarlos de manera cualitativa con los criterios propuestos relativos a) **Claridad de redacción**, b) **Congruencia con el contenido**, c) **Contexto correcto del ítem** y d) **Dominio del Constructo**. Por cada ítem de acuerdo con los criterios propuestos deberá emitir un juicio de valor, asignándole una calificación, y de ser necesario anotar las observaciones si hubiera.

Juez №: 02

Fecha actual: 23/05/2022

Nombres y Apellidos de Juez: Ligia Magali García Rosero

Universidad donde labora: Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas

Años de experiencia profesional o científica: 13 años.

Profesión: Ingeniero Agrónomo

Mayor Grado Académico que ostenta: DOCTORIS PHILOSOPHIAE EN AGRICULTURA SUSTENTABLE

Puesto que desempeña: Investigadora y Docente

Competencias que ha evaluado: claridad, congruencia, contexto y dominio del constructo



Ligia Magali García Rosero

Carnet de extranjería: 001691738

 <https://orcid.org/0000-0001-7508-7516>

**INVENTARIO DEL CUESTIONARIO: PRODUCCIÓN DE EMBRIONES DE CACAO FINO DE AROMA (Theobroma cacao L.)
 MEDIANTE EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN EL SISTEMA DE INMERSIÓN TEMPORAL AUTOMATIZADA (RITA®)
 INSTRUMENTO PARA FINES ESPECIFICOS DE LA VALIDACION DE CONTENIDO (JUICIO DE EXPERTOS)
 Calificación: Muy aceptable (5) Aceptable (4) Regular (3) Poco aceptable (2) Inaceptable (1)**

Nº	CUESTIONARIO	Claridad					Congruencia					Contexto					Dominio del constructo					Sugerencias																			
		5	4	3	2	1	5	4	3	2	1	5	4	3	2	1	5	4	3	2	1																				
DIMENSION DEMOGRAFICA																																									
1	¿Cuál es su nivel educativo?	x					x					x					x																								

Nº	CUESTIONARIO	Claridad					Congruencia					Contexto					Dominio del constructo					Sugerencias																			
		5	4	3	2	1	5	4	3	2	1	5	4	3	2	1	5	4	3	2	1																				
ECONOMÍA DEL PRODUCTOR																																									
2	¿Con qué área de terreno cuenta?	x					x					x					x																								
3	¿Cuánto es su ingreso mensual?	x					x					x					x																								
4	¿Qué variedad de cacao cultiva?	x					x					x					x																								
5	¿Cuántos quintales de cacao cosecha por campaña?	x					x					x					x																								
6	¿Prefiere plantines de cacao injertados?	x					x					x					x																								
7	¿A usted le interesaría comprar plantines de cacao criollo fino de aroma <i>ex vitro</i> ?	x					x					x					x																								
8	¿Cuánto pagaría por ciento de plantines de cacao <i>ex vitro</i> ?	x					x					x					x																								
9	¿Qué cantidad compraría usted de plantines de cacao <i>ex vitro</i> ?	x					x					x					x																								

Encuesta de Estudio de Mercado

El presente cuestionario tiene el objetivo de recabar información para conocer los diferentes aspectos de la economía del productor y sus hábitos de consumo. Con el cual se pretende tener una idea y conocimientos sobre la economía y hábitos de consumo.

Los resultados obtenidos serán tratados con la absoluta confidencialidad.

Nombre: _____

DNI : _____ Edad : _____

I. Dimensión demográfica

1. ¿Cuál es su nivel educativo?

- a) () Sin estudios
- b) () Primaria
- c) () Secundaria
- d) () Superior

II. Dimensión Económica

2. ¿Con qué área de terreno cuenta?

3. ¿Cuánto es su ingreso mensual?

4. ¿Qué variedad de cacao cultiva?

5. ¿Cuántos quintales de cacao cosecha por campaña?

6. ¿Prefiere plantines de cacao injertados?

- a) () Si
- b) () No

7. ¿A usted le interesaría comprar plantines de cacao criollo fino de aroma *ex vitro*?

- a) () si
- b) () no

8. ¿Cuánto pagaría por ciento de plantines de cacao *ex vitro*?

9. ¿Qué cantidad compraría usted de plantines de cacao *ex vitro*?



Anexo 3: Protocolo de producción de plantas por embriogénesis somática secundaria en RITA.

1. Materiales y equipos

Protocolo de multiplicación masiva de embriones

Equipos	Materiales
Incubadora	Tubos Falcon De 50 ML
balanza analítica	Cooler
Potenciómetro	Vasos De 2 Litros
Autoclave	Botellas De 1 Litro
concina eléctrica	Placas Petry
<u>Cámara de flujo laminar</u>	Pinzas
	Mechero de alcohol
	Botella de tapa rosca 250 mL
	Botellas de tapa rosca de 50 mL
	Bandejas
	Recipiente de 20 litros con tapa
	Kit instalación de RITAS

2. Reactivos, soluciones

A continuación, se muestra las Tablas de 1 al 5 de los componentes para preparar las soluciones madre Macro A, Macro B Micro C, Solución vitaminada y solución de aminoácidos, para lo cual se pesará en stocks pesando las cantidades que se indican en las Tablas y se mezclan en el orden que están las Tablas, la solución macro A, macro B y micro C se conservan de 4 a 7 ° C, mientras que la solución vitaminada y la solución de aminoácido se conservan a -20 °C.

Tabla 1

Solución DKW Macro A		
Componente	unidad	Cantidad por litro
NH ₄ NO ₃	g	14.16
Ca(NO ₃) ₂ 4H ₂ O	g	19.68

Tabla 2

Solución DKW Macro B		
Componente	unidad	Cantidad por litro
K ₂ SO ₄	g	15.59
MgSO ₄ 7H ₂ O	g	7.4
KH ₂ PO ₄	g	2.65
CaCl ₂ 2H ₂ O	g	1.49

Tabla 3

Solución DKW micro C		
Componente	Unidad	Cantidad por litro
Zn(NO ₃) ₂ 6H ₂ O	g	1.7
MnSO ₄ H ₂ O	g	3.34
FeSO ₄ 7H ₂ O	g	3.38
Na-EDTA	g	4.54
H ₃ BO ₃	g	0.48
CuSO ₄ 5H ₂ O	mg	25
Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	mg	39

Tabla 4

Solución DKW Vitaminada		
Componente	unidad	Cantidad por 100 mL
Myoinositol	g	10
Thiaminin-HCL	g	0.2
Glycine	g	0.2
Tryptophan	g	0.1

Tabla 5

Solución Stock Amino acido		
Componete	unidad	Cantidad por 100 mL
L-lysine	mg	45.65
L-leucine	mg	32.8
L-tryptophan	mg	51.05
Arginine	mg	43.55
Glycine	mg	18.76

Recomendaciones químicas y condiciones de preparación de medios. El pH del medio se ajusta utilizando NaOH 1 N antes de la autoclave. Todos los medios se esterilizan en autoclave durante 20 min a 121 °C. Sin embargo, debido a la naturaleza higroscópica de los reactivos, utilizamos soluciones madre que contienen los componentes químicos de las diferentes soluciones de sales, hormonas y vitaminas utilizadas para la preparación de medios. Macronutrientes en el medio Driver y Kuniyuki (DKW) se separan en soluciones madre A y B para evitar interacciones químicas entre sales inorgánicas en altas concentraciones y para evitar la precipitación de sales durante el almacenamiento. Cada 3 meses se preparan soluciones madre frescas de reguladores del crecimiento, incluidos tiazurón (TDZ) 6-benciladenina (BA) kinetina y ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D). Hipoclorito de calcio.

Preparación de medios para embriogénesis somática indirecta. Preparar la solución madre de sales DKW, vitaminas DKW, y aminoácidos como se indica en las Tablas anteriores. Todos los reactivos deben aplicarse en el orden correcto para evitar la precipitación. Antes de esterilizar los medios en autoclave, el pH debe calibrarse a 5,8 con KOH 1 N. Las soluciones madre y los medios de los reguladores del crecimiento de las plantas deben prepararse siguiendo las indicaciones a continuación.

(a) Solución de TDZ (0.5 mg mL⁻¹). Disuelva 5 mg de tiazurón en 100 µL de KOH 1 N y agregue agua Milli-Q hasta un volumen final de 10 mL. Almacenar a 4 ° C.

(b) Solución de 2,4-D (10 mg mL⁻¹). Disuelva 100 mg de 2,4-D en 8 mL de etanol al 100 % y luego agregue agua Milli-Q a 10 mL. Almacenar a 4 ° C.

(b) Solución de 2,4-D (10 mg mL⁻¹). Disuelva 100 mg de 2,4-D en 8 mL de etanol al 100 % y luego agregue agua Milli-Q a 10 mL. Almacenar a 4 ° C.

(c) Soluciones de kinetina y BA (10 mg mL⁻¹). Disuelva 10 mg de kinetina o BA en 50 µL de NaOH 1 N y agregue agua Milli-Q a 1 mL. Conservar a -20 °C.

2.1. Medios de cultivo

La preparación de los medios de cultivo se coloca los componentes en el orden que están en la Tabla (Excepto el gelificante) ,luego se agrega agua tipo II hasta aforar a 1 litro posteriormente esta solución se calibra a 5.80 de pH con NaOH para subir el pH o HCL para bajar el pH ,posterior mezclan con el gelificante con la solución y verter en un matraz intentando que este al ¾ del total(con la finalidad que no se derrame o explote por la

presión en el esterilizado) posteriormente se esteriliza a 121° por 20 minutos .Después se sirve en las placas y se conserva a 7°C.

Tabla 6

Inducción a callo primario (PCG)		
Componente	unidad	cantidad por litro
Solution DKW A	mL	100
Solution DKW B	mL	100
Micro solution DKW	mL	10
Vitamin Solution DKW	mL	1
glucose	gramos	20
glutamine	mg	250
myoinositol	mg	100
Solution 2,4-D	ul	200
phytagel	gramos	2
solution TDZ	ul	10

Tabla 7

Inducción a callo secundario (SCG)		
Componente	unidad	Cantidad a 1 litro
McCow`s	gramos	2.3
Gamborg`s vitamin solution	mL	1
Glucose	gramos	20
Solution 2,4-D	uL	200
BA solution	uL	5
Phytagel	gramos	2.2

Tabla 8

Desarrollo embrionario (ED4)		
Componente	Unidad	Cantidad a 1 Litro
Solution DKW A	mL	100
Solution DKW B	mL	100
Micro Solution DKW	mL	10
Vitamin Solution	mL	1
Sucrose	g	40
Phytagel	g	2

2.2. Medios para RITA

La preparación de medios para los RITA se calcula el medio para cada RITA es de 250 mL .para los RITA solo tenemos 2 medios de cultivo que son el ED3 Y EDL ,para esto

primero se debe medir las soluciones y verter en un vaso de precipitación de 2 litros luego pesar los componentes ,después aforar a 1 litro ,posteriormente se ajusta el pH a 5.80 luego se verterá la solución en los RITAS se arma los RITA con sus filtros se coloca todo el recipiente en una bolsa plástica resistente a 121°(Bolsa común en presentación de rollo) por 20 min ,se deja la bolsa doblada y la tapa de los RITA flojos y se procede a esterilizar a 121°C por 20 minutos .Una vez que este esterilizado procedemos a torcer la bolsa a la bolsa y cerrándola con nudo intentando no haber tocado e interior de la bolsa y se almacena a 7° hasta que se tenga que utilizar .

Tabla 9

Desarrollo embrionario (ED3)		
Componete	unidad	cantidad por litro
Solution DKW A	mL	100
Solution DKW B	mL	100
Micro Solution DKW	mL	10
Vitamin Solution DKW	mL	1
sucrose	g	30

Tabla 10

Regeneration a plant (EDL)		
Solution DKW A	mL	100
Solution DKW B	mL	100
Micro Solution DKW	mL	10
Vitamin Solution DKW	mL	1
Acid solution	mL	1
Glucose	g	20
KNO3	g	0.3

3. Obtención del material vegetativo

El material vegetativo constara de la recolección de botones florares a punto de eclosionar de aproximadamente de 1 a 2 semanas de edad en el cuales los más grandes y cerrados son más fáciles de trabajar y tienen más probabilidad se formar callo .Para la recolección de los estaminodios previamente se tiene que preparar los tubos facón de 50 mL (Estériles) y agua tipo II estéril y las pinzas ,una vez preparados los materiales se colectara los botones florales en campo colocándolos en los tubos falcón que contendrán agua fría estéril el cual se guardara en el cooler el cual mantendrá la temperatura de 7°C para que

los botones florales no se abran .y llegue al laboratorio cerrado para la fase de esterilización

4. Esterilización y disección

Los botones florales se trasladan a la cámara de flujo donde se colocaran a otro tubo falcón y se añadiría la solución de hipoclorito de calcio por 20 minutos ,una vez transcurrido el tiempo se procede a aflojar la tapa y escurrir la solución de hipoclorito de calcio con el tubo entrecerrado una vez drenado se procede a agregar agua tipo II estéril se agita una 3 veces luego de vuelve a drenar ,se realizara este proceso 3 veces luego se procederá a colocar en una placa estéril los botones florales ya desinfectados .Posteriormente estos botones florales se colocaran a otro placa Petri de 5 en 5 .En las placas que contiene los 5 botones se procede a realizar un corte en parte 1/3 del botón tomando como punto de partida la base posteriormente con la ayuda de otras pinzas y otro bisturí se procede a abrir el botón floral y aislar los estaminodios.

5. Inducción a callo primario

Los estaminodios ya aislados se siembran en medio de cultivo PCG y se coloca a incubar por 15 días a 27°C en oscuridad.

6. Inducción a callo secundario

Los callos primarios se trasladan a medio de cultivo SCG y se coloca a incubar por 15días a 27°C en oscuridad

7. Proliferación de callos

Los callos secundarios se trasladan a medio ED4 y se colocan a incubar por 15 días 27 °C en oscuridad, este proceso se realizará hasta que se obtenga embriones pues realizarse hasta 3 veces cada 15 días.

8. Inducción a callo secundario

Los embriones que se obtuvieron en la embriogénesis primaria se seleccionaran lo que estén en estadio de torpedo o inicios de cotiledón se cortaran en 3 de forma transversal y se colocaran en medio SCG con el mismo procedimiento de la embriogénesis primaria pasando por ED3 Y ED4 hasta obtener embriones.

9. Instalación en RITA

Los embriones que se logren obtener en la embriogénesis secundaria en estadio torpedo e inicios de cotiledones se colocaran a sistema de inmersión temporal en RITA el cual primero se colocara a medio ED3 el cual completara su desarrollo del cotiledón .Para esto

los RITA que se encuentran cubiertas en bolsas se procede a colocar en la cámara de flujo previamente desinfectada con alcohol de 70° y con luz uv por 15 minutos con juntamente de las pinzas estériles .Se rompe la bolsa por la parte media con las manos o con un bisturí estéril intentando no topar la parte exterior con la interior o tocar con las manos. Posteriormente se destapa los RITA y se coloca los embriones y se vuelve a cerrar. Luego de coloca al sistema de aireación donde se dejará incubando por 1 mes. Transcurrido el mes se cambiarán los embriones a medio EDL en otro RITA y incubado por 1 mes, se mantendrá en medio EDL por 3 meses o hasta que este transformada en planta con hojas verdaderas.

Anexo 4. Datos de la encuesta

Nivel educativo	Área con que cuenta	Ingreso mensual	Variedad cacao	Total, de cosecha	Preferencia de injerto o franca	Intención de compra	Cuanto estaría dispuesto a pagar	Cantidad que compraría
4,00	2,00	2000,00	1,00	44,00	1,00	1,00	150,00	500,00
4,00	2,00	4000,00	1,00	5,00	2,00	1,00	200,00	1000,00
3,00	3,00	700,00	1,00	20,00	2,00	1,00	200,00	200,00
3,00	3,00	800,00	2,00	10,00	1,00	2,00		
3,00	2,00	700,00	1,00	20,00	2,00	1,00	300,00	1000,00
3,00	2,00	600,00	2,00	9,00	2,00	1,00	200,00	600,00
3,00	3,00	900,00	2,00	20,00	1,00	1,00	200,00	1000,00
3,00	8,00	1500,00	1,00	140,00	2,00	1,00	300,00	800,00
2,00	2,60	800,00	1,00	15,00	1,00	2,00		
3,00	1,00	500,00	1,00	10,00	2,00	2,00		
3,00	4,50	1000,00	1,00	30,00	1,00	1,00	200,00	30,00
3,00	1,50	700,00	1,00	24,00	1,00	1,00	100,00	1000,00
2,00	2,00	600,00	1,00	24,00	1,00	1,00	100,00	600,00
2,00	2,00	1000,00	2,00	8,00	1,00	1,00	200,00	50,00
3,00	3,00	1200,00	2,00	2,00	2,00	2,00		
4,00	3,00	2000,00	2,00	12,00	1,00	1,00	300,00	200,00
2,00	5,00	1000,00	1,00	12,00	1,00	1,00	200,00	100,00
3,00	4,00	1500,00	1,00	32,00	1,00	1,00	300,00	100,00
3,00	7,00	2000,00	1,00	300,00	2,00	1,00	200,00	1000,00
2,00	1,60	400,00	2,00	20,00	2,00	1,00	200,00	1000,00
3,00	7,50	1000,00	1,00	80,00	1,00	1,00	250,00	2000,00
2,00	2,50	800,00	2,00	30,00	1,00	1,00	200,00	1200,00
3,00	3,00	700,00	2,00	36,00	1,00	1,00	200,00	200,00
3,00	3,00	900,00	1,00	70,00	1,00	2,00		
3,00	1,00	550,00	1,00	10,00	2,00	1,00	300,00	200,00
2,00	3,50	1000,00	1,00	84,00	2,00	2,00		
3,00	1,50	800,00	1,00	26,00	1,00	1,00	250,00	500,00
3,00	1,00	800,00	1,00	24,00	1,00	2,00		

3,00	3,50	860,00	1,00	70,00	2,00	1,00	200,00	300,00
3,00	4,00	600,00	1,00	12,00	1,00	1,00	300,00	2000,00
Nivel educativo				1: Sin estudios	2: Primaria	3: Secundaria	4: Superior	
Variedad de cacao				1: Criollo	2: Criollo y CCN51			
Preferencia de injerto o franca				1: Injertado	2: Sin injertar			
Intensión de compra				1: si	2: no			

Anexo 5. Genotipos criollos, fino de aroma propagados convencionalmente

N°	Genotipo
1	ABL01
2	ABL03
3	VVA01
4	VVA02
5	MRC05
6	MRC10
7	JBB02
8	JBB04