



Solutions for environment and development  
Soluciones para el ambiente y desarrollo

Evaluación de dos protocolos para la inducción de embriogénesis somática en clones de cacao (*Theobroma cacao* L.) seleccionados por el Programa de Mejoramiento Genético de Cacao del CATIE

**ALLAN MATA QUIRÓS**

---



CENTRO AGRONÓMICO TROPICAL  
DE INVESTIGACIÓN Y ENSEÑANZA  
ESCUELA DE POSGRADO

Evaluación de dos protocolos para la inducción de embriogénesis somática en clones de cacao (*Theobroma cacao* L.) seleccionados por el Programa de Mejoramiento Genético de Cacao del CATIE

por

Allan Mata Quirós

Tesis sometida a consideración de la Escuela de Posgrado  
como requisito para optar por el grado de

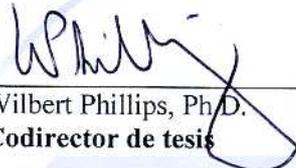
*Magister Scientiae* en Agricultura Ecológica

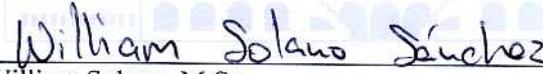
Turrialba, Costa Rica, 2013

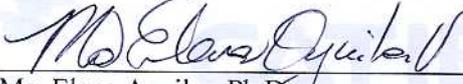
Esta tesis ha sido aceptada en su presente forma por la División de Educación y la Escuela de Posgrado del CATIE y aprobada por el Comité Consejero del estudiante, como requisito parcial para optar por el grado de

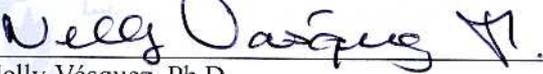
**MAGISTER SCIENTIAE EN AGRICULTURA ECOLÓGICA**

**FIRMANTES:**

  
\_\_\_\_\_  
Wilbert Phillips, Ph.D.  
Codirector de tesis

  
\_\_\_\_\_  
William Solano, M.Sc.  
Codirector de tesis

  
\_\_\_\_\_  
Ma. Elena Aguilar, Ph.D.  
Miembro Comité Consejero

  
\_\_\_\_\_  
Nelly Vásquez, Ph.D.  
Miembro Comité Consejero

  
\_\_\_\_\_  
Thomas Dormody, Ph.D. / Francisco Jiménez, Dr. Sc.  
Decano / Vicedecano de la Escuela de Posgrado

  
\_\_\_\_\_  
Allan Mata Quirós  
Candidato

## DEDICATORIA

*A mi esposa, por su gran amor y su apoyo constante para culminar con éxito este importante reto.*

*A mis padres, por su amor, dedicación y entrega a lo largo de mi vida.*

*A mis hermanos, por impulsarme para cumplir mis metas.*

*A mi sobrina María Carolina, por llenarme de energía y felicidad con su sonrisa y sus palabritas.*

*A mi tía Fely, mi ángel, por su interminable amor, porque desde el cielo me acompaña y me inspira para ser cada día mejor.*

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco profundamente a Dios por acompañarme en el camino para llegar hasta la culminación de esta importante meta y porque en medio de las dificultades me ha hecho ver que no estoy solo.

A mi esposa, por su amor incondicional, por su apoyo con los trabajos en el laboratorio, por inyectarme de energía y positivismo cuando más lo necesité y principalmente por ser mi inspiración y un ejemplo para querer superarme cada vez más.

A mis padres, por su sacrificio y entrega, por la mejor herencia que me han brindado: la oportunidad de estudiar para superarme y salir adelante. Por su invaluable apoyo, por ser mi inspiración y por enseñarme a luchar para cumplir los objetivos propuestos.

Al Dr. Wilbert Phillips Mora, por su gran apoyo para la realización de mis estudios de Posgrado y por la confianza depositada en mí, porque más que un jefe y asesor de tesis, ha sido un amigo siempre dispuesto a tenderme su mano y brindarme su consejo.

Al M.Sc. William Solano Sánchez, por su amistad y su apoyo técnico en la realización de esta investigación, por compartirme su experiencia y conocimientos y por estar siempre en la mejor disposición de brindarme su ayuda.

A la Dra. María Elena Aguilar Vega y a la Dra. Nelly Vásquez Morera, por sus valiosos aportes y sugerencias para la realización de esta investigación y por compartirme su experiencia en el tema.

A los compañeros del Laboratorio de Biotecnología del CATIE, especialmente a Karla Garita y Alexis Pereira, por su desinteresada colaboración que sin duda me facilitó en gran medida las labores en el laboratorio.

A los compañeros del Programa de Mejoramiento Genético de Cacao, por el apoyo y la solidaridad brindados durante estos dos años de estudio y múltiples carreras y trabajos.

Al CATIE, por brindarme la oportunidad y facilitarme las condiciones para emprender mis estudios de Maestría, en especial a la MBA. Adriana Arce Mena, ex-Gerente de Desarrollo Humano, por su valioso apoyo en este proceso.

Al Fondo de Incentivos del Ministerio de Ciencia y Tecnología de Costa Rica y al Consejo Nacional para Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICIT), por el apoyo financiero para la realización de mis estudios de Posgrado. Al personal del CONICIT, por el buen trato y amabilidad que siempre he recibido de su parte.

A todos los compañeros de la Promoción 2011-2012, especialmente a mis compañeros y amigos de la Maestría en Agricultura Ecológica, por hacer de estos dos años, los mejores desde que llegué al CATIE.

## **BIOGRAFÍA**

El autor nació en Turrialba, Costa Rica, el 31 de diciembre de 1983. Cursó la primaria en la Escuela Nuestra Señora de Sion de Turrialba y sus estudios de secundaria en el Instituto Dr. Clodomiro Picado Twilight de esa misma ciudad, donde obtuvo su Bachillerato en Educación Media en el año 2001. En el 2002 inició la carrera de Biología en la Universidad de Costa Rica y en el 2003 optó por la carrera de Ingeniería en Biotecnología en el Instituto Tecnológico de Costa Rica, la cual culminó en enero del 2007.

Durante el período de junio del 2006 a enero del 2007, desarrolló su Trabajo Final de Graduación en el CATIE, en el que evaluó un sistema de propagación vegetativa de cacao por medio de ramillas, con el cual obtuvo Mención Honorífica.

Su carrera profesional ha estado relacionada principalmente con el cultivo del cacao, pues desde febrero del 2007 forma parte del equipo técnico del Programa de Mejoramiento Genético de Cacao del CATIE, donde se desempeña como Asistente de Investigación.

En el 2011 ingresó al Programa de Maestría del CATIE para cursar la Maestría en Agricultura Ecológica, al mismo tiempo que continuó laborando en el Programa de Mejoramiento Genético, hasta la actualidad.

## CONTENIDO

DEDICATORIA .....	III
AGRADECIMIENTOS .....	IV
BIOGRAFÍA.....	V
CONTENIDO .....	VI
RESUMEN .....	IX
SUMMARY.....	XI
ÍNDICE DE CUADROS .....	XIII
ÍNDICE DE FIGURAS .....	XIV
LISTA DE UNIDADES, ABREVIATURAS Y SIGLAS .....	XV
1. INTRODUCCIÓN .....	1
1.1 Objetivos del estudio .....	2
1.1.1 Objetivo general.....	2
1.1.2 Objetivos específicos .....	3
1.2 Hipótesis del estudio.....	3
2. REVISIÓN DE LITERATURA .....	4
2.1 Aspectos generales del cultivo de cacao.....	4
2.2 Descripción botánica.....	4
2.2.1 El árbol.....	4
2.2.2 La flor .....	5
2.3 Principales limitantes del cultivo.....	6
2.3.1 Enfermedades.....	7
2.4 Clones seleccionados por el CATIE .....	8
2.5 Métodos de propagación de cacao .....	10
2.5.1 Propagación sexual .....	10
2.5.2 Propagación asexual .....	11
2.6 Embriogénesis somática .....	14
2.7 Fases de la embriogénesis somática.....	14
2.8 Embriogénesis somática de cacao.....	15
2.9 Factores que afectan la embriogénesis somática de cacao .....	15
2.9.1 Genotipo.....	16
2.9.2 Patrón .....	16

2.9.3	Tipo de explante.....	16
2.9.4	pH.....	17
2.9.5	Fuente de carbono.....	17
2.9.6	Condiciones de luz.....	18
2.10	Comportamiento en campo de plantas derivadas de embriogénesis somática .....	18
2.11	Ventajas de la embriogénesis somática .....	19
2.11.1	Adaptación a condiciones adversas .....	19
2.11.2	Uniformidad de plantaciones .....	19
2.11.3	Facilidad para realizar prácticas agrícolas .....	20
2.11.4	Criopreservación de germoplasma.....	20
2.11.5	Obtención de plántulas libres de patógenos.....	21
2.11.6	Alto volumen de producción de plantas .....	21
3.	<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>23</b>
3.1	Localización del experimento.....	23
3.2	Material vegetal .....	23
3.3	Colecta del material .....	23
3.4	Desinfección del material .....	23
3.5	Disección de botones florales .....	24
3.6	Descripción de los protocolos.....	25
3.6.1	Protocolo Nestlé.....	25
3.6.2	Protocolo Penn State University.....	25
3.7	Efecto genotípico sobre la capacidad embriogénica.....	26
3.8	Efecto del portainjerto sobre la respuesta embriogénica .....	27
3.9	Embriogénesis somática secundaria .....	28
3.10	Diseño experimental .....	32
3.11	Variables evaluadas .....	32
3.11.1	Reactividad .....	32
3.11.2	Capacidad embriogénica.....	32
3.11.3	Número de embriones somáticos producidos .....	33
3.12	Análisis de datos .....	33
4.	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>34</b>
4.1	Observaciones generales.....	34

4.2	Evaluación del efecto genotípico sobre la capacidad embriogénica.....	36
4.2.1	Reactividad .....	36
4.2.2	Capacidad embriogénica.....	39
4.2.3	Número de embriones somáticos producidos .....	42
4.3	Evaluación del efecto del portainjerto sobre la respuesta embriogénica .....	46
4.3.1	Reactividad .....	46
4.3.2	Capacidad embriogénica.....	47
4.3.3	Número de embriones somáticos producidos .....	48
4.4	Embriogénesis somática secundaria .....	51
5.	CONCLUSIONES .....	54
6.	RECOMENDACIONES.....	56
7.	BIBLIOGRAFÍA .....	57
8.	ANEXOS .....	66

## RESUMEN

El cultivo del cacao tiene gran importancia en la economía de muchos países tropicales, sin embargo, su producción se ha visto limitada por el impacto de las enfermedades y el bajo potencial productivo de las plantaciones. Como respuesta a esta situación, el Programa de Mejoramiento Genético de Cacao del CATIE puso a disposición de los productores, un grupo de clones con alto potencial productivo y tolerancia a las principales enfermedades. No obstante, a pesar de los múltiples esfuerzos realizados, no se cuenta con un método eficiente de propagación de plantas, por lo que la embriogénesis somática es visualizada como una herramienta para la producción masiva de estos clones. Se evaluaron los protocolos de Nestlé (NT) y Penn State University (PSU) para inducir la formación de embriones somáticos en los clones de cacao: CATIE-R1, CATIE-R4, CATIE-R6, CC-137, ICS-95 T1, PMCT-58 y UF-273 T1, con el objetivo de definir una estrategia eficiente de obtención de plantas. Para esto se colectaron botones florales cerrados y se extrajeron los pétalos y los estaminoides para utilizarlos como explantes.

Se evaluó la capacidad de formación de callo a los dos meses y se observó que los pétalos mostraron mayor reactividad en el protocolo NT, mientras que los estaminoides reaccionaron mejor en el protocolo PSU. Se observó un 100% de callogénesis en los clones CATIE-R1 y PMCT-58 en el protocolo NT con pétalo como explante, al igual que en los clones CATIE-R1 y CATIE-R4 en el protocolo PSU con explante estaminoide. Los menores porcentajes de formación de callo se presentaron en el protocolo NT con el cultivo de pétalos, y fue en los clones UF-273 T1, CATIE-R4, CC-137 y PMCT-58 con 20,9%; 42,4%; 46,3% y 48,5%, respectivamente.

A los cuatro meses se evaluó la capacidad embriogénica y se determinó que el cultivo de estaminoides en el protocolo NT fue la combinación más exitosa, con la cual se obtuvo una capacidad embriogénica de 46% de explantes de CATIE-R6 y 42,6% de CATIE-R1. Para el número de embriones producidos por explante, se encontraron diferencias significativas entre las combinaciones clon-protocolo y clon-tipo de explante, por lo que se determinó que la combinación más exitosa fue el cultivo de estaminoides en el protocolo NT para los clones CATIE-R1 y UF-273 T1 con un promedio de 6,32 y 3,00 embriones, respectivamente. El uso de estaminoides en el protocolo NT favoreció la producción de embriones somáticos de los

clones CATIE-R6, UF-273 T1, PMCT-58 y CATIE-R4, mientras que para los clones CATIE-R1 y CC-137 no se encontraron diferencias significativas entre los dos tipos de explantes.

También se evaluó el efecto de cinco portainjertos sobre los que está injertada la planta madre para la obtención de botones florales y se encontró que éste interactúa de forma significativa con el genotipo y el protocolo, siendo las combinaciones con mayor éxito el clon CATIE-R6 injertado sobre EET-400 y sobre PA-121; aunque no se encontraron diferencias significativas entre los portainjertos para el clon CATIE-R4.

Se cultivaron fragmentos de los embriones somáticos de tres estados de desarrollo, obtenidos en las evaluaciones previas para la obtención de embriones somáticos secundarios, lo cual favorece el aumento en el número de embriones producidos, así como la morfología de los mismos, sin embargo a los cuatro meses, no se ha observado la formación de embriones, aunque se determinó la formación de callo no embriogénico y crecimiento de los fragmentos embrionarios.

**Palabras clave:** *Theobroma cacao*, embriogénesis somática, propagación asexual, cultivo *in vitro*, callogénesis, clones, portainjertos.

Mata-Quirós, A. 2013. Evaluación de dos protocolos para la inducción de embriogénesis somática en clones de cacao (*Theobroma cacao* L.) seleccionados por el Programa de Mejoramiento Genético de Cacao del CATIE. Tesis M.Sc. Turrialba, CR. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. 80 p.

## SUMMARY

Cacao cultivation is very important in the economies of many tropical countries; however, its production has been limited by the impact of diseases and low-yield potential plantations. Responding to this situation, CATIE's Cacao Genetic Breeding Program has created a group of six high yielding and diseases-tolerant clones for farmers.

However, despite the efforts conducted, there is still no efficient plant propagation method. For this reason, somatic embryogenesis is considered to be a tool for the mass production of these clones. The Nestle (NT) and Penn State University (PSU) protocols to induce the formation of somatic embryos in the cacao clones CATIE-R1, CATIE-R4, CATIE-R6, CC-137, ICS-95 T1, PMCT-58 and UF-273 T1 were evaluated, in order to define an efficient strategy to obtain plants. In order to do this, unopened flowers were collected and petals and staminodes were extracted to be used as explants.

At two months, the calli formation capacity was evaluated; petals showed more reactivity in NT protocol, whereas staminodes reacted better in PSU protocol. 100% callogenesis was observed in clones CATIE-R1 and PMCT-58 in NT protocol with petals as explants, and in clones CATIE-R1 and CATIE-R4 in PSU protocol with staminodes as explants. The lowest percentages of calli formation were observed in the NT protocol with the culture of petals in clones UF-273 T1, CATIE-R4, CC-137 and PMCT-58 with 20.9, 42.4, 46.3 and 48.5%, respectively.

At four months, the embryogenic capacity was evaluated, and it was determined that the culture of staminodes in the NT protocol was the most successful combination, obtaining an embryogenic capacity of 46.0% of CATIE-R6 and 42.6% of CATIE-R1 explants. Regarding the number of embryos produced per explant, significant differences were found between the explant combinations of clone-protocol and clone-type. Thus, it was determined that the best combination was the culture of staminodes in the NT protocol for clones CATIE-R1 and UF-273 T1, with an average of 6.32 and 3.00 embryos, respectively. The use of staminodes in the NT protocol favored the production of somatic embryos of clones CATIE-R6, UF-273 T1, PMCT-58 and CATIE-R4; whereas for clones CATIE-R1 and CC-137 there were not significant differences between the two types of explants.

The effects of five rootstocks which are grafted onto the mother plant in order to get unopened flowers were also evaluated. It was found that they interact significantly with the genotype and the protocol, where the most successful clone was the CATIE-R6 grafted onto the EET-400

and the PA-121. Nevertheless, no significant differences were found between the rootstocks for the clone CATIE-R4.

Fragments from the somatic embryos in three development stages obtained in the previous evaluations to acquire secondary somatic embryos were cultured. This favored the increase in the number of produced embryos, as well as their morphology. However, at four months, no embryo formation was observed, although the formation on non-embryogenic calli and growth of embryonary fragments was seen.

**Key words:** *Theobroma cacao*, somatic embryogenesis, asexual propagation, *in vitro* culture, callogenesis, clones, rootstocks.

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b>	Características agro-fisiológicas de los clones de cacao seleccionados por el Programa de Mejoramiento Genético de Cacao del CATIE.....	<b>9</b>
<b>Cuadro 2.</b>	Tratamientos evaluados para determinar la capacidad embriogénica de siete clones de cacao seleccionados por el CATIE, utilizando dos tipos de explantes en dos protocolos distintos.....	<b>27</b>
<b>Cuadro 3.</b>	Tratamientos evaluados para determinar la capacidad embriogénica de dos clones de cacao seleccionados por el CATIE injertados sobre cinco portainjertos, utilizando dos tipos de explantes en dos protocolos distintos...	<b>29</b>
<b>Cuadro 4.</b>	Tratamientos evaluados para la inducción de embriogénesis somática secundaria de clones de cacao seleccionados por el CATIE, utilizando dos protocolos distintos.....	<b>31</b>
<b>Cuadro 5.</b>	Porcentaje de explantes de dos clones de cacao injertados sobre cinco portainjertos, con reactividad a los dos meses, utilizando dos tipos de explantes y dos protocolos.....	<b>46</b>
<b>Cuadro 6.</b>	Porcentaje de explantes de dos clones de cacao injertados sobre cinco portainjertos, que presentaron capacidad embriogénica a los cuatro meses, utilizando dos tipos de explantes y dos protocolos.....	<b>47</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	La flor de cacao y sus partes.....	<b>6</b>
<b>Figura 2.</b>	Metodología de introducción de explantes en el medio de cultivo.....	<b>24</b>
<b>Figura 3.</b>	Clasificación de embriones somáticos de acuerdo a su tamaño y estado de desarrollo para ser cultivados en el medio de cultivo de embriogénesis somática secundaria.....	<b>30</b>
<b>Figura 4.</b>	Formación de callo en explantes de CATIE-R4 dos meses después de la introducción al medio de inducción de los protocolos NT y PSU.....	<b>34</b>
<b>Figura 5.</b>	Formación de callo y embriones somáticos a los cuatro meses de cultivo.....	<b>35</b>
<b>Figura 6.</b>	Porcentaje de explantes reactivos de siete clones de cacao a los dos meses de cultivo.....	<b>37</b>
<b>Figura 7.</b>	Porcentaje de explantes reactivos de siete clones de cacao a los dos meses, utilizando dos tipos explantes y dos protocolos.....	<b>38</b>
<b>Figura 8.</b>	Porcentaje de explantes de siete clones de cacao que presentaron formación de embriones somáticos a los cuatro meses de cultivo.....	<b>40</b>
<b>Figura 9.</b>	Porcentaje de explantes de siete clones de cacao con capacidad embriogénica a los cuatro meses, utilizando dos tipos de explante y dos protocolos.....	<b>41</b>
<b>Figura 10.</b>	Número promedio de embriones somáticos obtenidos por explante de acuerdo con la combinación clon-protocolo.....	<b>43</b>
<b>Figura 11.</b>	Número promedio de embriones somáticos producidos por explante de acuerdo con la combinación clon-tipo de explante utilizando el protocolo NT.....	<b>45</b>
<b>Figura 12.</b>	Número promedio de embriones somáticos formados por explante en dos clones de cacao injertados sobre cinco portainjertos, utilizando dos tipos de explantes y dos protocolos.....	<b>49</b>
<b>Figura 13.</b>	Número promedio de embriones somáticos formados por explante de acuerdo con la combinación clon-portainjerto.....	<b>49</b>
<b>Figura 14.</b>	Número promedio de embriones somáticos formados por explante de acuerdo con la combinación portainjerto-protocolo.....	<b>50</b>
<b>Figura 15.</b>	Fragmentos de embriones somáticos dos meses después del cultivo para la embriogénesis secundaria.....	<b>51</b>

## LISTA DE UNIDADES, ABREVIATURAS Y SIGLAS

**2,4,5-T:** 2,4,5 triclorofenoxiacético

**2,4-D:** 2,4 diclorofenoxiacético

**6-BA:** 6-bencil amino purina

**ED:** Embryo Development

**kg/ha/año:** kilogramos de cacao fermentado y seco producidos por hectárea por año

**NT:** Nestlé.

**PCG:** Primary Callus Growth

**PSU:** Pennsylvania State University.

**SCG:** Secondary Callus Growth

**TDZ:** tidiazuron

**v/v:** volumen/volumen

# 1. INTRODUCCIÓN

El cacao (*Theobroma cacao* L.) es un cultivo de gran importancia en la economía de muchos países de los trópicos de Asia, África, Centro y Sur América, donde forma parte de los medios de vida de 40-50 millones de personas. La producción mundial de cacao para el período de octubre 2011 a setiembre 2012 fue de 3,9 millones de toneladas, siendo Costa de Marfil el principal productor con 34,4% de la producción mundial, seguido por Ghana e Indonesia con 17% y 15%, respectivamente (ICCO 2012). En el continente americano los mayores productores son Brasil y Ecuador, cada uno con el 4,4% de la producción mundial.

En Centroamérica más de la mitad de la producción se concentra en fincas de pequeños productores con menos de 5 hectáreas, cuya producción se ve limitada por el impacto de enfermedades y la presencia de plantaciones viejas de bajo potencial productivo (Phillips-Mora *et al.* 2006; Phillips-Mora *et al.* 2009).

En Costa Rica, de acuerdo con el Programa Nacional de Cacao del Ministerio de Agricultura y Ganadería (2007), citado por Canacacao (2008), el cacao es cultivado por 1 656 pequeños agricultores en plantaciones que suman 3 819 hectáreas ubicadas principalmente en las regiones Atlántica (cantones de Talamanca y Limón) y Huetar Norte (cantones de Guatuso y Upala).

Con el objetivo de hacer frente a los problemas de la cacaocultura en la región, el Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE) inició en 1996 un Programa de Mejoramiento Genético de Cacao con el apoyo de la World Cocoa Foundation tendiente a seleccionar genotipos superiores con características de alta producción y calidad industrial, así como resistentes a enfermedades como la moniliasis (*Moniliophthora roreri*), la cual representa una de las mayores limitantes para la producción rentable del cultivo (Phillips-Mora *et al.* 2012a).

Dicho programa ha seleccionado un grupo de genotipos superiores, los cuales han sido distribuidos en seis países de Centroamérica y México para su observación y evaluación. Las primeras plantaciones, establecidas en el 2007, ya están mostrando prometedores resultados. Esto ha provocado que se incremente el interés por estos clones en otras regiones de Costa Rica y Latinoamérica.

Por tratarse de clones, la propagación de materiales seleccionados se debe realizar usando métodos de multiplicación vegetativa, los cuales tienen importantes limitaciones que

serán detalladas más adelante. Esto ha provocado que en países como Ecuador, la renovación de plantaciones se haya ejecutado muchas veces con plantas obtenidas mediante semillas de polinización libre, acarreado importantes consecuencias tales como la reducción de la producción (Garzón y Paulin 2006), por lo que es necesario contar con una estrategia eficiente de producción masiva de plantas para evitar esta situación.

A pesar de los múltiples esfuerzos del CATIE por contar con una metodología eficiente de multiplicación de plantas por medio de injertación de parche y de púa (Phillips-Mora *et al.* 2012b; Sánchez 2012) y ramillas (Mata 2006), todavía no se cuenta con un método para propagar masivamente los materiales, debido a que estas técnicas tradicionales tienen un comportamiento errático y están limitadas por la disponibilidad de material propagativo.

La embriogénesis somática es visualizada como una alternativa con gran potencial para la multiplicación masiva de plantas, sin embargo, se requiere del desarrollo y ajuste de protocolos específicos para cada clon, los cuales no son fáciles de obtener en cacao.

Estudios previos realizados en CATIE han hecho avances importantes en el uso de esta técnica, obteniéndose incluso la inducción de tejido embriogénico en explantes de 10 genotipos de interés comercial (Chanatásig 2004; Solano 2008). No obstante, todavía es necesario realizar ajustes en algunas etapas del proceso como son la conversión de los embriones a plántulas y la aclimatación de las mismas. En la presente investigación se pretende completar esta información para siete clones de importancia regional. Dado que se ha encontrado que algunos materiales son sensibles a la técnica usada, se evaluarán los dos protocolos de embriogénesis somática más exitosos en cacao, los cuales fueron desarrollados por Penn State University y Nestlé.

## **1.1 Objetivos del estudio**

### ***1.1.1 Objetivo general***

Evaluar dos protocolos para la inducción de la embriogénesis somática en siete clones de cacao (*Theobroma cacao* L.) seleccionados por el Programa de Mejoramiento Genético de Cacao del CATIE para definir una estrategia eficiente e individualizada de multiplicación y obtención de plantas para cada uno de ellos.

### ***1.1.2 Objetivos específicos***

1. Evaluar la capacidad embriogénica de los clones de cacao CATIE-R1, CATIE-R4, CATIE-R6, CC-137, ICS-95 T1, PMCT-58 y UF-273 T1 usando dos protocolos de embriogénesis somática (Nestlé y Penn State University).
2. Evaluar el efecto de cinco portainjertos utilizados en la injertación de las plantas madre sobre la respuesta embriogénica de los clones CATIE-R4 y CATIE-R6.
3. Analizar las interacciones entre los factores: genotipo, protocolo, tipo de explante y portainjerto y su relación con la capacidad embriogénica de los clones.
4. Estudiar el desarrollo y maduración de los embriones en medio de cultivo líquido en inmersión temporal para la obtención de plántulas de cacao.
5. Estudiar el comportamiento en condiciones de aclimatación de las plantas obtenidas mediante esta técnica.

### **1.2 Hipótesis del estudio**

1. La capacidad para formar embriones somáticos en iguales condiciones de cultivo es dependiente del genotipo.
2. El portainjerto sobre el que está injertada la planta madre para la toma de explantes, ejerce un efecto sobre la respuesta embriogénica de los diferentes genotipos.
3. Los factores: tipo de explante, protocolo y portainjerto interactúan entre sí y producen una respuesta embriogénica diferente de acuerdo al genotipo.
4. El cultivo en medio líquido en inmersión temporal es una técnica que favorece el desarrollo de plántulas con una mayor eficiencia y a mayor escala.
5. Las plántulas obtenidas por embriogénesis somática se adaptan a las condiciones de aclimatación.

## **2. REVISIÓN DE LITERATURA**

### **2.1 Aspectos generales del cultivo de cacao**

El cacao es un cultivo tropical, originario de la cuenca alta del río Amazonas, el cual representa la principal fuente de ingreso para miles de pequeños agricultores, tanto de América Tropical como de países del Oeste de África y el Sudeste Asiático. Sus semillas son usadas por la industria chocolatera y cosmética, lo cual representa billones de dólares para un sector que está en auge (WCF 2011).

El género *Theobroma* pertenece al orden Malvales y a la familia Malvaceae que además del cacao (*T. cacao*), incluye otras especies de importancia económica limitada como son *T. grandiflorum* (cupuaçu) y *T. bicolor* (pataste). El cacao era considerado por las culturas indígenas de la región azteca como el “alimento de los dioses” y sus granos, además de ser utilizados como moneda, lo consumían como bebida. Aunque es un cultivo estrictamente tropical, es elaborado y consumido principalmente en regiones templadas como bebida estimulante y alimento energético y además, su grasa es un subproducto importante para la fabricación de cosméticos y productos farmacéuticos (León 2000).

### **2.2 Descripción botánica**

#### **2.2.1 El árbol**

El árbol de cacao alcanza normalmente alturas de 4 a 7 metros, aunque bajo condiciones óptimas de temperatura, viento, agua y suelo puede alcanzar hasta los 10 metros. En condiciones silvestres puede superar los 20 metros de altura (Enríquez 2004).

Al igual que otras especies tropicales, el cacao presenta un marcado dimorfismo de ramas. En las plantas que provienen de semilla se presenta un solo eje vertical ortotrópico cuyo crecimiento se detiene a una altura de entre 1 y 1,5 metros y emite en la parte superior de tres a cinco ramas laterales con crecimiento plagiotrópico que forma la horqueta o molinillo. Debajo de la horqueta brotan yemas ortotrópicas (chupones) que forman una nueva horqueta, proceso que se puede repetir incrementando paulatinamente la altura del árbol (León 2000).

Las plantas obtenidas mediante técnicas de reproducción vegetativa como ramillas o acodos no poseen una raíz principal o pivotante como ocurre en las provenientes de semillas,

sino varias raicillas alimentadoras que proliferan cerca de la superficie formando una masa compacta (León 2000).

El manejo de las plantas obtenidas por semilla es más sencillo para los agricultores, ya que requieren sólo una poda de formación, la eliminación rutinaria de los chupones y el manejo de la altura del árbol. En la etapa de crecimiento se requiere propiciar un desarrollo equilibrado y balanceado de las ramas primarias, lo cual se realiza mediante un despunte mínimo para dar la estructura del árbol (Mejía y Palencia 2000).

Por el contrario, en los árboles clonales la poda es más temprana, exigente y cuidadosa, sobre todo durante las etapas iniciales de formación del árbol, debido a que usualmente se utilizan yemas plagiotrópicas que provocan un crecimiento lateral de las ramas. Además, la arquitectura final del árbol dependerá de la distribución de ramas primarias y secundarias cuya formación, a su vez, depende del estímulo dado a través de las labores de poda, por lo que el equilibrio y distribución de la copa está relacionado con el manejo que se le dé a la planta (Mejía y Palencia 2000; Enríquez 2004).

Al igual que las plantas obtenidas por semilla, las derivadas de embriogénesis somática presentan un crecimiento dimórfico con un eje principal ortotrópico y un sistema radical pivotante que les permite explorar con mayor facilidad las capas inferiores del suelo (Traore *et al.* 2003).

### **2.2.2 La flor**

El cacao es una especie cauliflora, por lo que las flores se agrupan en inflorescencias llamadas cojines florales que aparecen sobre el tronco y las ramas principales en las posiciones axilares de las hojas. La flor (Figura 1) es pentámera y sostenida por un pedicelo largo y fino de 1 a 3 centímetros de longitud. Posee cinco sépalos agudos de color blanco o rosado que se extienden en forma de estrella. La corola está formada por cinco pétalos blancos compuestos por una base cóncava en forma de concha y una lígula triangular, muy delgada en la base, ancha y cóncava hacia el ápice (León 2000).

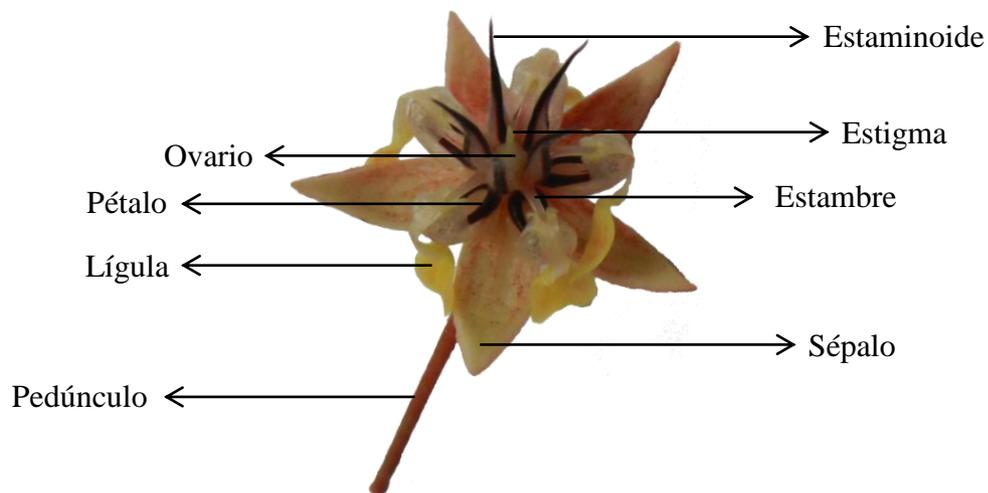
Los pétalos poseen como característica distintiva líneas coloreadas en la parte interna que son llamadas líneas guía, pues se presume que facilitan la orientación de los insectos polinizadores hacia las anteras (Bartley 2005).

En el centro de la flor se ubica el tubo estaminal, formado por cinco estambres fértiles cortos y doblados hacia afuera donde se ubican los sacos polínicos, cada uno encerrado en la

concha de un pétalo. Además se encuentran cinco estaminoides agudos y en posición erecta de color pardo y pubescentes de cinco a seis milímetros de largo que rodean el pistilo (León 2000). De acuerdo con Bartley (2005), estos órganos son estructuras especializadas características del género *Theobroma* que se han desarrollado como estambres estériles con la función específica de proteger el gineceo.

El ovario es un cuerpo ovoide, súpero y con cinco celdas en las que contiene entre 30 y 50 óvulos. El estilo es cilíndrico, de color blanco y se abre en la parte superior o estigma, en cinco ramas, algunas de las cuales frecuentemente permanecen cerradas (León 2000).

La intensidad de la floración puede variar considerablemente de acuerdo con el genotipo, aunque también es fuertemente influenciado por factores ambientales (Bartley 2005). Según León (2000), del total de flores, menos del 5% es fecundado y produce fruto, lo cual se debe a la autoincompatibilidad de las plantas y a que los mecanismos de polinización tienen poca eficiencia por la influencia de los agentes polinizadores, la estructura de la flor y su biología.



**Figura 1.** La flor de cacao y sus partes.

### 2.3 Principales limitantes del cultivo

El cacao es seriamente afectado por diferentes factores bióticos y abióticos que limitan la producción y ponen en riesgo la sostenibilidad de una actividad de la cual dependen miles de pequeños agricultores alrededor del mundo. Dentro de los principales factores que tienen

un impacto negativo sobre la cacaocultura se encuentran las enfermedades y el bajo potencial productivo de las plantaciones debido a razones genéticas y de manejo (Phillips-Mora *et al.* 2009).

### **2.3.1 Enfermedades**

El ambiente de los trópicos húmedos es propicio para la producción del cacao, pero también para el desarrollo y diseminación de las enfermedades que lo afectan. El ataque de las enfermedades se ve favorecido por el mal manejo de las plantaciones, pues éste es más severo cuando hay sombra excesiva y mal manejada y cuando los árboles de cacao no se podan y se produce mayor autosombreamiento, causando una menor entrada de luz y una mayor humedad. De igual forma, la presencia de malezas muy altas también favorece la incidencia de enfermedades, ya que al dificultar la circulación de aire, favorecen una mayor humedad dentro de la plantación (Phillips-Mora y Cerda 2009).

Las principales enfermedades en la región que causan importantes pérdidas en la producción son: la moniliasis (*Moniliophthora roreri*), la mazorca negra (*Phytophthora palmivora*) y la escoba de bruja (*Moniliophthora perniciosa*).

- **Moniliasis:** Es una enfermedad que ataca únicamente a los frutos de *T. cacao* y de todas las otras especies de los géneros *Theobroma* y *Herrania*. Debido a que ataca solamente los frutos y generalmente su daño es total, constituye el factor de mayor impacto en la producción de cacao, causando pérdidas de hasta un 80% de los frutos (Falconí *et al.* 2007; Phillips-Mora y Cerda 2009).

En el caso del cacao, puede causar diferentes síntomas o combinaciones de éstos, tales como deformaciones, maduración prematura, manchas cafés y presencia de micelio blanco sobre las manchas. El hongo se reproduce cuando, sobre las manchas, aparece una felpa blanca formada por el micelio donde se producen millones de esporas diminutas que se desprenden y son llevadas hasta los frutos sanos, principalmente por el viento, aunque también participan en la diseminación otros agentes como la lluvia, los animales y el ser humano (Phillips-Mora y Cerda 2009).

- **Mazorca negra:** Además de los frutos, esta enfermedad ataca otras partes de la planta como las hojas, los brotes jóvenes de plantas adultas (chupones) y el tronco; pero los daños

más importantes se presentan en los frutos cercanos a la madurez. Es una enfermedad que se encuentra mundialmente distribuida en todas las regiones cacaoteras, pues su diseminación es favorecida por la existencia de al menos cinco especies del género *Phytophthora* con una amplia gama de hospederos (Falconí *et al.* 2007).

Uno de los síntomas más comunes en los frutos es la aparición de manchas cafés con borde regular y de rápido crecimiento que llega a cubrir el fruto en muy pocos días mientras va causando internamente una pudrición. Sobre las manchas externas se produce un micelio con apariencia de un algodoncillo blancuzco y poco denso donde se producen las esporas, las cuales tienen la capacidad de nadar y se activan cuando hay condiciones de alta humedad y un período de baja temperatura seguido por uno caliente. Las esporas se transportan por el salpique de la lluvia, las corrientes de agua, el viento, las hormigas y por contacto directo entre frutos (Phillips-Mora y Cerda 2009).

- **Escoba de bruja:** esta es una de las enfermedades más dañinas del cacao, pues ataca todas las partes de la planta, produciendo crecimientos anormales y lesiones en los brotes, las ramas, los cojines florales y los frutos, así como a las plántulas de vivero. El síntoma más característico de esta enfermedad se presenta en los terminales de las ramas nuevas, las cuales se desarrollan anormalmente, presentado la forma de una escoba debido al daño que causa el patógeno al tejido meristemático activamente en crecimiento (Falconí *et al.* 2007; Phillips-Mora y Cerda 2009).

La escoba de bruja está presente en América del Sur hasta el sur del Canal de Panamá y en algunos países del Caribe, por lo que constituye un riesgo permanente para los países productores de cacao de Centroamérica. Debido a esto se recomienda no introducir plantas de cacao ni ninguna de sus partes desde Suramérica o cualquier otro país donde el patógeno está presente (Phillips-Mora y Cerda 2009).

## **2.4 Clones seleccionados por el CATIE**

El CATIE, a través del Programa de Mejoramiento Genético de Cacao, seleccionó en el 2007 un grupo de seis clones provenientes del experimento de 42 clones (L6) establecido entre 1998 y 1999 en la Finca Experimental La Lola, ubicada en la región Atlántica de Costa Rica. Todos los árboles de este experimento fueron evaluados mensualmente a partir de los

dos años después de la siembra, mediante el conteo de frutos sanos y enfermos y el peso fresco de las semillas para estimar el rendimiento de cada clon en kg/ha/año y la incidencia de enfermedades en condiciones naturales (Phillips-Mora *et al.* 2012a).

La selección de los clones se basó en su capacidad de producción y su tolerancia a moniliasis, encontrándose que los clones más sobresalientes son CATIE-R6 y CATIE-R4, los cuales a través de los años han mostrado de manera consistente los niveles más altos de producción y los menores porcentajes de incidencia de moniliasis; además, el promedio de producción registrado en el período 2007-2011 fue de más de 2.000 kg/ha/año (Cuadro 1).

Mientras tanto, los otros clones seleccionados corresponden a materiales obtenidos en Costa Rica en diferentes períodos, tales como CATIE-R1, CC-137 y PMCT-58, además del ICS-95 T1, un clon ampliamente cultivado en Suramérica por su alto potencial productivo (Phillips-Mora *et al.* 2012a). En esta investigación, a este grupo se sumó el clon UF-273 T1, pues es un genotipo con sobresalientes características que lo convierten en un candidato para ser liberado en un corto plazo.

**Cuadro 1.** Características agro-fisiológicas de los clones de cacao seleccionados por el Programa de Mejoramiento Genético de Cacao del CATIE.

Clon	Producción (kg/ha/año)		Incidencia natural (%)		Autocompatibilidad <sup>3/</sup>	Índices		Calidad	
	11 años <sup>1/</sup>	5 años <sup>2/</sup>	Moniliasis	Mazorca negra		Fruto <sup>4/</sup>	Semilla <sup>5/</sup>	% grasa	Calidad <sup>6/</sup>
<b>CATIE-R1</b>	1.066	1.674	12	7	+	29	1,3	52,3	Alta
<b>CATIE-R4</b>	1.336	2.070	9	1	-	18	1,5	56,2	Intermed
<b>CATIE-R6</b>	1.485	2.363	5	0	-	24	1,4	55,7	Intermed
<b>CC-137</b>	990	1.321	32	1	+	24	1,7	50,6	Baja
<b>ICS-95 T1</b>	636	926	26	6	+	22	1,2	55,0	Intermed
<b>PMCT-58</b>	789	1.036	26	4	-	27	1,2	59,1	Alta
<b>UF-273 T1</b>	933	1.395	14	4	+	31	1,3	--	--

<sup>1/</sup> Promedio de producción de 11 años (2000-2011).

<sup>2/</sup> Promedio de producción de los últimos cinco años (2007-2011)

<sup>3/</sup> (+) = autocompatible; (-) = autoincompatible.

<sup>4/</sup> Número de frutos necesarios para producir 1 kg de cacao fermentado y seco.

<sup>5/</sup> Peso promedio (gramos) de 100 semillas fermentadas y secas.

<sup>6/</sup> Calificación dada por compañías chocolateras con base en análisis químicos.

Fuente: Datos del Programa de Mejoramiento Genético de Cacao. CATIE 2011.

Phillips-Mora *et al.* 2012a.

Actualmente, estos clones se encuentran a disposición de los agricultores asociados al Proyecto Cacao Centroamérica del CATIE mediante una estrategia de evaluación y

propagación de los mismos que incluye cinco hectáreas de Jardines Clonales establecidos en seis países de Centroamérica (CATIE 2011). De acuerdo con la experiencia de los productores en la zona de Talamanca, Costa Rica, los clones tienen muy buen comportamiento en cuanto a producción y tolerancia a moniliasis, con lo cual superan en gran medida a los genotipos locales con los que se establecieron, por lo que se ha dado un importante crecimiento del interés de los agricultores de la región por obtener los materiales con el fin de establecerlos en sus fincas (Rodríguez 2010)<sup>1/</sup>.

## **2.5 Métodos de propagación de cacao**

### ***2.5.1 Propagación sexual***

Consiste en la utilización de la semilla botánica para la reproducción del cacao. Esta constituye la forma más antigua y más utilizada para la siembra de la especie, por lo que la mayoría de las plantaciones establecidas en las regiones cacaoteras de América provienen de semillas de árboles comunes seleccionados sin ningún criterio específico (Enríquez 2004; Cueto *et al.* 2007).

A pesar de que este es el método más sencillo para la obtención de plantas, tiene la desventaja de producir individuos muy desuniformes genética y fenotípicamente, lo cual es producto de la combinación de dos padres que no son líneas puras. Esta situación tiene consecuencias sobre características de importancia económica como la producción, estimándose que en las plantaciones de árboles provenientes de semillas, el 70% de la producción se obtiene a partir del 30% de los árboles, es decir que el restante 70% son individuos de bajo potencial productivo (Enríquez 2004; Somarriba *et al.* 2010b).

De acuerdo con Cueto *et al.* (2007) las semillas pueden tener varios orígenes, ya sean de árboles productivos seleccionados dentro de la plantación, híbridos de polinización libre provenientes del cruce de árboles seleccionados sin control en la polinización y de híbridos de polinización controlada.

---

<sup>1/</sup> Rodríguez, W. 2010. Comportamiento de los clones del CATIE establecidos en APPTA. Talamanca, CR. (comunicación personal).

### 2.5.2 Propagación asexual

Consiste en la reproducción de plantas a partir de una célula, un tejido, un órgano o cualquier parte vegetativa de una planta madre, lo cual da origen a otras plantas de iguales características genéticas, tanto en su aspecto exterior como en sus cualidades y características intrínsecas. Esto se logra debido a que muchas células de los tejidos conservan su capacidad de multiplicarse, de diferenciarse y dar origen a estructuras como tallos y raíces (Rojas *et al.* 2004).

Entre las ventajas que presenta este tipo de propagación de plantas se encuentran la fijación y perpetuación de características deseables, los árboles resultantes son más precoces y la población es más homogénea en su producción debido a que todas las plantas producen (FEDECACAO 2005; Somarriba *et al.* 2010a).

Existen diferentes métodos de reproducir plantas asexualmente, de los cuales los más utilizados son el injerto, las ramillas o estacas, los acodos y el cultivo *in vitro*.

- **Injertos:** es la forma más común y segura de propagación y consiste en la unión de los tejidos de dos plantas que continúan su desarrollo como un solo individuo. Una de las partes es la yema o púa, la cual es tomada de una planta seleccionada y que se transforma en la copa del nuevo árbol, donde se formarán las ramas, las hojas, las flores y los frutos. La otra parte es el patrón o portainjerto, el cual constituye el soporte de la planta al conformar el sistema radical (Echeverri 2006).

A pesar de que la injertación es una técnica ampliamente utilizada en la mayoría de países donde se siembra cacao y es una forma de obtener gran cantidad de plantas, su éxito se ve limitado por la influencia de múltiples factores como la humedad, la precipitación, la temperatura, la habilidad del injertador, las condiciones de asepsia, la edad del portainjerto, la compatibilidad injerto-patrón, entre muchos otros que si no se manejan con sumo cuidado, pueden causar pérdidas importantes en la cantidad de plantas injertadas (Palencia 2000; Rojas *et al.* 2004; Echeverri 2006).

El método que se utiliza actualmente para la propagación de los clones seleccionados por el CATIE es el injerto de parche, cuyos porcentajes de prendimiento es errático y aparentemente influenciado por la combinación de diferentes factores, por lo que en este

momento no representa una vía sostenible para la producción masiva de plantas ni suficiente para cubrir la demanda de germoplasma que existe en la actualidad.

- **Ramillas:** consiste en el uso de ramas con hojas adultas sanas, sin flores y con yemas en buen estado, las cuales son cortadas y tratadas en el extremo con reguladores de crecimiento inductores de raíces, con el objetivo de formar una planta nueva (Enríquez 2004).

El método de ramillas es comúnmente utilizado en países como Brasil y Ecuador, donde los protocolos han sido desarrollados para la producción de variedades resistentes a escoba de bruja en el caso de Brasil (Palacios y Monteiro 2001) y principalmente el genotipo CCN-51 en Ecuador (Enríquez 2004).

Para propagar cacao por este método se requiere contar con cajas propagadoras, infraestructura apropiada y suficiente disponibilidad de agua (Cueto *et al.* 2007). Se requiere también abundante material vegetativo (Palencia 2000), lo cual en algunos casos hace difícil la aplicación de la técnica por parte de pequeños productores.

En estudios realizados en el CATIE se encontró que la técnica, aunque es factible, es muy dependiente del genotipo usado y de condiciones de manejo e infraestructura para asegurar la sobrevivencia de los explantes (Mata 2006).

- **Acodos:** es una técnica poco utilizada en cacao que se basa en el desarrollo de raíces en un tallo que está todavía unido a la planta madre y que una vez enraizado se separa para desarrollarse como una nueva planta que crece sobre sus raíces (Palencia 2000). En los acodos, la formación de raíces es estimulada por un corte en la corteza del tallo que causa una interrupción del traslado de compuestos orgánicos procedentes de las hojas hacia abajo, de manera que éstos se acumulan cerca del punto de tratamiento y produce el enraizado (Hartmann y Kester 1990).

Aunque el acodo es un método sencillo, no se recomienda practicarlo de forma extensiva en fincas productoras grandes sino solamente en casos específicos, ya que no es práctico y requiere de mucho tiempo y trabajo (Enríquez 2004; Somarriba *et al.* 2010a).

- **Cultivo *in vitro*:** es una herramienta de la biotecnología que consiste en el aislamiento de cualquier parte de la planta que puede ser una célula, un tejido o un órgano para cultivarlo

en condiciones asépticas en un medio nutritivo para propiciar la generación de una o varias plantas nuevas (García-González *et al.* 2010).

El cultivo *in vitro* es factible debido a la totipotencia que poseen las células, fenómeno que fue primeramente estudiado por Haberlandt (citado por García-González *et al.* 2010), y que consiste en la capacidad que tiene toda célula vegetal de originar una planta completa a partir de las instrucciones contenidas en la copia del genoma que cada una de ellas tiene (Hartmann y Kester 1990).

Las células vegetales, a diferencia de las animales, se caracterizan por su plasticidad, lo cual les confiere la capacidad de formar individuos nuevos como un mecanismo de sobrevivencia ante factores bióticos y abióticos que le afectan. Esta capacidad de respuesta puede ser inducida por estímulos externos que afecten la célula de manera directa (García-González *et al.* 2010).

En los últimos años, la aplicación de técnicas de cultivo *in vitro* en la agricultura se ha desarrollado de manera creciente con el fin de hacer frente a las demandas de cultivos y alimentos en el mundo. Una de las aplicaciones más importantes del cultivo de tejidos en la agricultura es la propagación masiva de genotipos de interés, incluso de especies que tienen bajas tasas de multiplicación, y en un espacio físico relativamente menor (Thorpe 2007).

Asimismo, técnicas *in vitro* como el rescate de embriones han demostrado ser muy efectivas para la reproducción de especies de pastos, ornamentales y arbóreas que han perdido su capacidad de reproducción sexual debido a factores bióticos y/o abióticos que afectan la germinación de las semillas (Sharma *et al.* 1996; Reed, 2005; Ahmadi *et al.* 2010).

Otra aplicación importante del cultivo *in vitro* es la conservación de germoplasma, principalmente de especies que producen semillas recalcitrantes que no pueden ser almacenadas por mucho tiempo. Para esto pueden conservarse las plantas o partes de ellas en estado vegetativo en condiciones de bajo crecimiento o en crioconservación y en un espacio reducido (Lambardi *et al.* 2002; Halmagyi y Pinker 2006).

Según García-González *et al.* (2010) el cultivo de tejidos vegetales ha hecho contribuciones importantes a la agricultura moderna, haciendo los sistemas productivos más rentables y de esta forma contribuyendo con la seguridad alimentaria y el mejoramiento de la calidad de vida de los consumidores.

En el caso del cultivo de cacao, diversos clones han sido sometidos a estudios en el CATIE usando técnicas como el microinjerto de embriones somáticos (Aguilar *et al.* 1992) y la embriogénesis somática (Palma 1988; Valverde 1989; Chanatásig 2004; Solano 2008).

## **2.6 Embriogénesis somática**

La embriogénesis somática se define como el proceso en el que las células somáticas se transforman para constituir embriones, pasando a través de diferentes estados morfológicos que son característicos de la embriogénesis cigótica pero sin la fusión de células sexuales (Williams y Maheswaran 1986). Según Dodeman *et al.* 1997, a diferencia de la embriogénesis cigótica, la formación de embriones somáticos involucra una fase de inducción que puede ser natural o artificial. Esta es variable entre especies y entre genotipos de la misma especie, es regulado genéticamente e influenciado por la fisiología de la planta y otros factores del desarrollo *in vitro*.

Los embriones somáticos se caracterizan por tener una estructura bipolar, desarrollando de forma temprana y simultánea un meristemo de tallo y otro radical (Margara 1988). Morfológicamente, los embriones somáticos son similares a los de origen cigótico, pues presentan los estados globular, corazón y torpedo, sin embargo los embriones somáticos no presentan el estado de dormancia, sino que continúan su desarrollo hasta la formación de plantas diferenciadas (Zimmerman 1993).

## **2.7 Fases de la embriogénesis somática**

Las etapas del desarrollo de los embriones somáticos tienen mucha similitud a las de los embriones cigóticos. La primera fase reconocible de un embrión somático es el estado globular, el cual generalmente se forma a partir de un pequeño grupo de células. Este continúa su elongación para dar origen a la formación de un embrión oblongo que da paso a la fase de corazón (Zimmerman 1993).

En el caso del cacao, un embrión somático normal presenta en la fase de corazón una notable polaridad y una división celular asimétrica, la cual define los ejes apical y radical y los cotiledones. A diferencia de los embriones sexuales, tienen un tamaño relativamente menor y cotiledones púrpura de menor desarrollo (Alemanno *et al.* 1997). Seguido de esta fase, el

proceso de crecimiento continúa hacia la fase de torpedo y el desarrollo de plántulas, que se caracterizan por la presencia de cotiledones verdes, hipocótilos elongados y el desarrollo de radículas con una clara diferenciación de raíces secundarias.

De acuerdo con Dodeman *et al.* (1997), la última fase del desarrollo se presenta debido a que las células vegetales responden a una serie de señales endógenas y exógenas como hormonas y luz, las cuales tienen un efecto en el control de la división celular, la elongación y la diferenciación celular que conducen a los embriones hacia la fase de maduración, la cual es una de las fases más críticas de la embriogénesis somática de cacao, independientemente del origen de los explantes (Alemanno *et al.* 1997).

## **2.8 Embriogénesis somática de cacao**

Los primeros reportes de embriogénesis somática de cacao fueron hechos por Esan (1977) y Pence *et al.* (1979), quienes consiguieron la formación de embriones somáticos a partir de embriones cigóticos inmaduros. A pesar de lograr la producción de embriones asexuales, éstos no permitieron reproducir el genoma de la planta madre, pues al provenir de embriones obtenidos por polinización cruzada, sus características eran una combinación de las de sus padres.

Para la embriogénesis somática de cacao se ha utilizado como explantes las hojas (Litz 1986), la nucela y el tegumento interno de frutos inmaduros (Chatelet *et al.* 1992; Figueira y Janick 1993; Sondahl *et al.* 1993), así como las flores (López-Baez *et al.* 1993), obteniéndose en todos los casos la formación de callo y embriones somáticos.

De acuerdo con Pence *et al.* (1979), el proceso de embriogénesis somática se puede dar mediante dos vías: a) de forma indirecta en la cual se presenta una desdiferenciación de células previa a la formación de embriones a través de un callo embriogénico intermedio; o b) de forma directa, en que los embriones se forman a partir de tejidos diferenciados mediante el desarrollo de células que son denominadas pre-embriogénicas.

## **2.9 Factores que afectan la embriogénesis somática de cacao**

Existen numerosos factores que determinan el éxito de la embriogénesis somática en cacao, entre los que se pueden citar los siguientes:

### **2.9.1 Genotipo**

El genotipo es uno de los factores más estudiados debido a que se ha observado una gran variación en su capacidad embriogénica. Este factor además interactúa con otros como el tamaño del botón floral (Díaz-López *et al.* 2009), la concentración de azúcares en el medio de cultivo (Aguilar 1990; Chantásig 2004; Velásquez *et al.* 2006; Traore y Guiltinan 2006; Díaz-López *et al.* 2009), el tipo de explante (Maximova *et al.* 2002; Velásquez *et al.* 2006; Traore y Guiltinan 2006; Minyaka *et al.* 2008; Solano 2008), la concentración de diferentes componentes del medio de cultivo (Li *et al.* 1998; Minyaka *et al.* 2008; Chantásig 2004) y las condiciones de luz (Valverde 1989), entre otras, lo cual hace que cada clon produzca respuestas específicas ante una combinación específica de factores.

Solano (2008) evaluó siete clones del CATIE en los medios de cultivo desarrollados por Penn State University y Nestlé utilizando como explantes los estaminoides y los pétalos, encontrando una interacción entre las respuestas embriogénicas de cada clon con los demás factores. Se determinó que los clones UF-273 T1, CC-137, CATIE-R4 y CATIE-R6 presentaron la mayor producción de embriones con el protocolo de Penn State University y con estaminoides como explantes, mientras que los clones EET-183, ICS-95 T1 y CATIE-R7 respondieron mejor en los medios del protocolo de Nestlé y el pétalo como explante.

### **2.9.2 Patrón**

Solano (2008) evaluó el efecto que ejerce el patrón sobre el cual está injertada la planta madre, en la capacidad de los clones para la formación de embriones. Se evaluaron los clones CATIE-R4 y CATIE-R6 injertados sobre los patrones IMC-67 y UF-613.

Se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos evaluados, además de una interacción entre los factores patrón, medio de cultivo y explante, de manera que los mejores resultados se obtuvieron en los tratamientos en que el patrón fue UF-613, tanto para el clon CATIE-R4 como para CATIE-R6 (Solano 2008).

### **2.9.3 Tipo de explante**

Para inducir la formación de embriones somáticos de cacao *in vitro* se pueden utilizar diferentes explantes, tales como embriones sexuales (Palma 1988), cotiledones de semilla (Valverde 1989; Aguilar 1990; Aguilar *et al.* 1992; Velásquez *et al.* 2006) y partes de la flor

como los pétalos y estaminoides (López-Baez *et al.* 1993; Alemanno *et al.* 1997, Chanatásig 2004; Velásquez *et al.* 2006; Traore y Gultinan 2006; Solano 2008; Minyaka *et al.* 2008).

En los experimentos previos mencionados se ha demostrado que la respuesta embriogénica de los diferentes explantes está directamente influenciada por el genotipo y el medio de cultivo utilizado, por lo que las respuestas han sido muy variables.

#### **2.9.4 pH**

Generalmente el pH de los medios de cultivo se ajusta a 5,7 antes de su esterilización en autoclave que es el nivel más adecuado para mantener las sales en forma soluble y móviles, además de favorecer un rápido crecimiento y la diferenciación de los tejidos (Murashige y Skoog 1962).

Valverde (1989) estudió el efecto de diferentes pH del medio de cultivo utilizando explantes cotiledonares de cacao y encontró que un pH de 6,7 favoreció la formación de callo en mayor medida que en los otros tratamientos, promoviendo un mayor aumento en el peso fresco de los explantes. No obstante, se determinó que el mayor número de embriones se dio en el medio con un pH de 5,7 mientras que los valores altos de pH (7,7 y 8,7) fueron limitantes, pues inhibieron la embriogénesis somática.

#### **2.9.5 Fuente de carbono**

La fuente de carbono del medio de cultivo es necesaria para proveer la energía requerida para el proceso de embriogénesis somática. Traore y Gultinan (2006) estudiaron el efecto de diferentes fuentes de carbono en la producción de embriones y en la maduración y su conversión en plantas. Se determinó que glucosa, fructosa y sacarosa son más efectivas en la producción de embriones, contrario al efecto negativo que se observó en los medios con maltosa y sorbitol. Con respecto a la maduración de los embriones formados y la brotación de los mismos, no se encontraron diferencias significativas entre las fuentes de carbono evaluadas. Sí se observaron diferencias significativas con respecto a la formación de plántulas normales, siendo el más efectivo la glucosa (Traore y Gultinan 2006).

Esto confirma lo reportado por Traore *et al.* (2003) años atrás, quienes demostraron que la glucosa y la sacarosa tienen un efecto positivo en la producción de embriones somáticos de cacao a partir de explantes florales.

Respecto a la concentración de azúcares en el medio, Valverde (1989) determinó que una concentración de 5% de sacarosa permite la producción de un mayor número de embriones en comparación con 2, 3 y 4% a los 40 días del cultivo. Además, la concentración de 5% favoreció la formación de un mayor número de embriones por explante, mientras que el número de explantes que formaron embriones fue mayor con 2, 3 y 5% y menor con 4% de sacarosa.

### **2.9.6 Condiciones de luz**

A pesar de que en el cultivo de tejidos la luz no necesariamente es requerida para el proceso de fotosíntesis, ésta sí es indispensable por la influencia que tiene en los procesos de crecimiento, diferenciación y desarrollo de las plantas (Villalobos *et al.* 1985).

De acuerdo con Valverde (1989) la ausencia de luz es necesaria en la primera fase de la embriogénesis somática, donde se induce la formación de embriones. Para el clon CATIE-1000, se obtuvo una mejor respuesta utilizando un período de 21 a 30 días de incubación en oscuridad, mientras que el desarrollo morfológico de los embriones fue similar en condiciones de luz y oscuridad. Asimismo, utilizando explantes del híbrido UF-613 x IMC-67 la mejor respuesta se dio igualmente bajo oscuridad, pero en un período de incubación de ocho a nueve semanas (Valverde 1989).

## **2.10 Comportamiento en campo de plantas de cacao derivadas de embriogénesis somática**

Se ha demostrado que el desarrollo y la arquitectura de las plantas obtenidas por embriogénesis somática, principalmente durante el primer año después de la siembra, son muy similares a las plantas producidas por semilla; aunque en Ecuador se determinó que la altura de planta y diámetro del tronco de árboles obtenidos por embriogénesis somática eran mayores a los obtenidos por semilla y superaron en gran medida a los provenientes de injertación, estacas y ramillas (Garzón y Paulin 2006).

Estos resultados concuerdan con los reportados por Maximova *et al.* (2008), quienes compararon plantas obtenidas por diferentes métodos de propagación y encontraron que la mayoría de los árboles provenientes de embriogénesis somática presentan un crecimiento mayor que es comparable únicamente con plantas obtenidas de semillas. Además, al final del

período de evaluación, no se observaron anomalías o patrones de crecimiento significativamente diferentes entre los tipos de propagación estudiados.

Además de las variables mencionadas, los árboles que provienen de embriogénesis somática tienen una ventaja significativa con respecto a otros métodos de propagación por presentar una fructificación más temprana y una mayor producción, así como una mayor uniformidad en el desarrollo de las plantas (Masseret *et al.*, citado por Solano 2008).

## **2.11 Ventajas de la embriogénesis somática**

La embriogénesis somática ofrece numerosas ventajas para el establecimiento de plantaciones de cacao con genotipos mejorados, entre las que destacan las siguientes:

### ***2.11.1 Adaptación a condiciones adversas***

Garzón y Paulin (2006) compararon diferentes parámetros de crecimiento en plantas provenientes de semilla y vitroplantas y observaron que las plantas producidas por embriogénesis somática poseen un sistema radical pivotante más desarrollado que les facilita la exploración de capas inferiores del suelo, permitiéndoles un mayor crecimiento y vigor, particularmente durante los períodos críticos (Guiltinan y Maximova 2000; Traore *et al.* 2003). Esta condición representa una alternativa para el establecimiento de plantaciones de cacao en condiciones adversas de déficit hídrico (Nestlé 2009), la cual es una situación cada vez más común producto del cambio climático imperante en el planeta en las últimas décadas.

### ***2.11.2 Uniformidad de plantaciones***

Los estudios realizados para comparar el comportamiento de las plantas de cacao obtenidas mediante la embriogénesis somática con plantas producidas mediante otros métodos de propagación, confirman que no existen diferencias importantes entre la arquitectura de éstas y las plantas de semilla, pero sí con las obtenidas mediante injertos o estacas enraizadas (Garzón y Paulin 2006; Maximova *et al.* 2008).

Tal y como se ha observado en algunos experimentos del Programa de Mejoramiento Genético de Cacao del CATIE, el portainjerto ejerce alguna influencia sobre el vigor y la productividad de los árboles. En el caso de las plantas producidas mediante embriogénesis somática, no existe ningún efecto de éste sobre el desarrollo de las mismas en el campo, por lo

que se esperaba que las plantaciones sean más uniformes. Esta ventaja, unido a que su desarrollo es más rápido y por lo tanto presentan mayor precocidad (Garzón y Paulin 2006), hacen de la embriogénesis somática una alternativa prometedora para la cacaocultura moderna.

### ***2.11.3 Facilidad para realizar prácticas agrícolas***

Las técnicas de reproducción vegetativa que actualmente son más utilizadas para la propagación de genotipos de cacao mejorados, el injerto y la estaca enraizada, son derivadas de ramas plagiotrópicas, por lo que las plantas obtenidas tendrán esta forma. A pesar de que las técnicas son muy utilizadas, las plantas requieren de rigurosas podas de formación y mantenimiento, lo cual dificulta las labores del productor e incrementa los costos (Santos *et al.* 2006).

Por el contrario, con la embriogénesis somática se producen plantas con crecimiento ortotrópico, lo que facilita en gran medida el manejo de la plantación, disminuyendo la necesidad de podas rutinarias y facilitando la cosecha de frutos, los cuales se forman generalmente en el tronco principal (Garzón y Paulin 2006).

### ***2.11.4 Criopreservación de germoplasma***

El método más utilizado para la conservación de germoplasma es mediante bancos de semillas, los cuales permiten conservar muchos genotipos en espacios reducidos. No obstante, algunas especies tropicales, entre ellas el cacao, poseen semillas recalcitrantes que no soportan la deshidratación y en condiciones de almacenamiento pierden su capacidad germinativa en corto tiempo (Sánchez-Chiang y Jiménez 2010). Es por esto que la forma más común de conservación de germoplasma de cacao es en colecciones de campo, las cuales son susceptibles a pérdidas por catástrofes climáticas y por el ataque de plagas y enfermedades (Fang *et al.* 2009).

En este sentido, la embriogénesis somática representa una alternativa para la conservación de genotipos de cacao de interés en condiciones de criopreservación por largos períodos. Esto se realiza mediante el tratamiento de embriones somáticos, preferiblemente en estado cotiledonar, con sustancias crioprotectoras que ayudan en el mantenimiento de los

explantes aumentando la tolerancia a las condiciones de desecación y bajas temperaturas a las que son sometidos (Fang *et al.* 2004).

Ejemplo de ello, en la Estación de Cuarentena de Reading se conservan una gran cantidad de genotipos en estas condiciones, utilizando principalmente embriones somáticos secundarios, los cuales, de acuerdo con Fang y Wetten (2011), a pesar de mostrar un menor desarrollo radicular, no presentan variantes genéticas importantes, manteniendo su fidelidad genética.

### ***2.11.5 Obtención de plántulas libres de patógenos***

Al igual que la conservación y la utilización del material contenido en los bancos de germoplasma, la distribución del mismo es de gran importancia para el desarrollo de las investigaciones que se realizan en diferentes países alrededor del mundo. Sin embargo, la transferencia de germoplasma entre países representa un riesgo por la posible introducción de plagas y enfermedades, especialmente de patógenos asintomáticos como es el caso de los virus (End *et al.* 2010).

El cultivo de tejidos también permite la producción de plantas libres de organismos patógenos sistémicos a través del cultivo de meristemos o de tratamientos de desinfección químicos o físicos (Quainoo *et al.* 2008; García-González *et al.* 2010; Chatenet *et al.* 2001). Los meristemos son los puntos de crecimiento localizados en los ápices, los cuales poseen tejidos vasculares poco desarrollados, por lo que la presencia de virus, bacterias y hongos es menor que en los demás tejidos de la planta, permitiendo cultivarlos en medios nutritivos estériles para originar un alto número de plantas libres de patógenos (Rzepka-Plevnes *et al.* 2009).

Estas técnicas conllevan múltiples ventajas para el movimiento de germoplasma y la disminución de las barreras cuarentenarias que en muchos casos imposibilitan la transferencia de materiales de interés entre los países.

### ***2.11.6 Alto volumen de producción de plantas***

A pesar de que existe una clara influencia del genotipo sobre la respuesta exitosa a la metodología, ésta ha sido optimizada para varios materiales y se han producido embriones somáticos en diversos laboratorios alrededor del mundo. Según Maximova *et al.* (2005), la

producción de embriones de algunos genotipos se ve limitada en la fase de embriogénesis primaria, sin embargo, la producción se incrementa de manera significativa durante el proceso de embriogénesis secundaria, razón por la que consideran el método con gran potencial para la producción masiva de plantas de cacao. De acuerdo con sus estimaciones, a partir de una flor se pueden producir alrededor de 800.000 plantas en un período de dos años.

Un ejemplo del potencial de producción masiva es el caso de Indonesia, donde como parte de un proyecto para la rehabilitación de plantaciones viejas, se produjeron 74 millones de plantas de cacao en un período de tres años; la más alta producción mediante embriogénesis somática reportada a nivel mundial, con las cuales se establecieron un millón de hectáreas (Pardomuan y Taylor 2012).

Por su parte, Solano (2008), proyectó la cantidad de embriones por cada 100 flores de seis clones de cacao en dos protocolos y con dos tipos de explante, siendo las combinaciones más exitosas el CATIE-R6 y el CATIE-R4 injertados sobre UF-613, usando estaminoides en el protocolo PSU para un total de 1782 y 972 embriones proyectados, respectivamente.

### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1 Localización del experimento**

El estudio se desarrolló en el Laboratorio de Biotecnología del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE), ubicado en Turrialba, Costa Rica.

#### **3.2 Material vegetal**

Se utilizaron botones florales cerrados de los clones de cacao seleccionados por el Programa de Mejoramiento Genético de Cacao del CATIE: CATIE-R1, CATIE-R4, CATIE-R6, CC-137, ICS-95 T1, PMCT-58 y UF-273 T1 (Figura 2A).

El material vegetal se obtuvo del Jardín Clonal (T11) y el Ensayo de Calidad (T7) ubicados en la Finca Experimental La Montaña, en Turrialba, localizada entre los 9°53' latitud norte y 83°38' longitud oeste, a una altitud de 602 msnm. El lugar tiene una temperatura promedio anual de 22,5 °C, la precipitación media anual es de 2.645 mm, la humedad relativa de 87,7% y la radiación solar de 18,8 horas.

#### **3.3 Colecta del material**

Los botones florales se colectaron en las primeras horas de la mañana, entre las 7:00 y las 8:30 para evitar la apertura de los mismos y seguidamente se colocaron en un recipiente con agua fría (4 °C) dentro de una hielera para trasladarlos de manera inmediata al laboratorio (Figura 2B). Las colectas se realizaron entre los meses de abril y julio del 2012, debido a que es el período en que los árboles mostraron una producción de flores suficiente para la obtención de los botones florales. Es importante resaltar que en el período de diciembre a marzo se observó una escasa floración, situación que se repite todos los años en la zona de Turrialba.

#### **3.4 Desinfección del material**

Se realizó un lavado suave de los botones florales con agua no estéril. Luego, los botones fueron colocados dentro de una bolsa de malla plástica y se sumergieron por 20

minutos en una solución de hipoclorito de sodio al 5% (v/v), según la metodología utilizada por Solano (2008) (Figura 2C). Posteriormente, dentro de la cámara de flujo laminar se realizaron 3 lavados con agua destilada estéril (Figura 2D) y con la ayuda de pinzas estériles se colocaron en un beaker estéril para proceder con la disección de los mismos.

### 3.5 Disección de botones florales

Utilizando pinzas y bisturí estériles, se tomaron los botones florales desinfectados y se realizó un corte transversal a 1/3 de la base para extraer los 5 estaminoides y los 5 pétalos de cada flor (Figura 2E,F), los cuales se colocaron en platos Petri con 24 ml del medio de cultivo de inducción según el protocolo respectivo.



**Figura 2.** Metodología de introducción de explantes en el medio de cultivo. A. Botones florales. B. Botones florales en agua fría para su transporte al laboratorio. C. Desinfección con una solución de hipoclorito de sodio al 5% (v/v). D. Lavado con agua destilada estéril. E. Disección de los botones florales. F. Pétalos y estaminoides obtenidos para el cultivo en el medio de inducción.

### 3.6 Descripción de los protocolos

Los clones se evaluaron usando los dos protocolos de embriogénesis somática más exitosos en cacao: el de Nestlé (Fontanel *et al.*, citado por Solano 2008) y el de Pennsylvania State University (2000), los cuales se describen a continuación.

#### 3.6.1 Protocolo Nestlé

- **Inducción:** Los explantes se colocaron en platos Petri de 90 x 15 mm con 24 ml del medio de cultivo NT1, constituido por las sales DKW (Driver y Kuniyuki 1984), suplementado con 2,4-D (1 mg/l), kinetina (0,25 mg/l), los aminoácidos: L-lisina (0,46 mg/l), L-leucina (0,33 mg/l), L-arginina (0,44 mg/l), L-triptófano (0,51 mg/l), glicina (0,19 mg/l), glucosa (30 g/l), y el gelificante Gellan Gum® (2,8 g/l), con un pH de 5,8. Los cultivos se conservaron durante tres semanas en condiciones de oscuridad a una temperatura de  $27 \pm 3$  °C y a una humedad relativa de  $87 \pm 3\%$ .

- **Expresión de la embriogénesis:** Después de tres semanas, los explantes provenientes del medio de cultivo NT1 se colocaron en platos Petri de 90 x 15 mm con 24 ml del medio NT2, constituido por los macroelementos M&S (Murashige y Skoog 1962), los microelementos y vitaminas DKW, suplementado con adenina (0,025 mg/l), los aminoácidos: L-lisina (0,46 mg/l), L-leucina (0,33 mg/l), L-arginina (0,44 mg/l), L-triptófano (0,51 mg/l), glicina (0,19 mg/l), glucosa (30 g/l) y el gelificante Gellan Gum® (2,8 g/l), con un pH de 5,6. Los cultivos se conservaron en condiciones de oscuridad a una temperatura de  $27 \pm 3$  °C y a una humedad relativa de  $87 \pm 3\%$ , haciendo subcultivos cada tres semanas hasta la aparición de embriones somáticos.

#### 3.6.2 Protocolo Penn State University

- **Inducción I:** Los explantes se colocaron en platos Petri de 90 x 15 mm con 24 ml del medio de cultivo PCG, constituido por las sales DKW, suplementado con glutamina (250 mg/l), myo-Inositol (100 mg/l), 2,4-D (2 mg/l), TDZ ( $5 \times 10^{-5}$  mg/l), glucosa (20 g/l) y el gelificante Gellan Gum® (2,8 g/l), con un pH de 5,8. Los cultivos se conservaron durante dos semanas en condiciones de oscuridad a una temperatura de  $27 \pm 3$  °C y a una humedad relativa de  $87 \pm 3\%$ .

- **Inducción II:** A las dos semanas, los explantes provenientes del medio de cultivo PCG se colocaron en platos Petri de 90 x 15 mm con 24 ml del medio SCG-1, constituido por las sales de McCown's (2,3 g/l) (Lloyd y McCown's 1981), las vitaminas: myo-Inositol (100 mg/l), ácido nicotínico (1 mg/l), piridoxina (1 mg/l) y tiamina-HCl (10 mg/l), agua de coco (50 ml/l), 2,4-D (2 mg/l), kinetina ( $3 \times 10^{-4}$  mg/l), glucosa (20 g/l) y el gelificante Gellan Gum® (2,8 g/l), con un pH de 5,7. Los cultivos se conservaron durante dos semanas en condiciones de oscuridad a una temperatura de  $27 \pm 3$  °C y a una humedad relativa de  $87 \pm 3\%$ .
- **Expresión de la embriogénesis:** Luego de dos semanas, los explantes cultivados en el medio de cultivo SCG-1 se colocaron en platos Petri de 90 x 15 con 24 ml del medio ED constituido por las sales DKW con sacarosa (30 g/l), glucosa (1 g/l) y el gelificante Gellan Gum® (2,8 g/l), con un pH de 5,7. Los cultivos se conservaron en condiciones de oscuridad a una temperatura de  $27 \pm 3$  °C y a una humedad relativa de  $87 \pm 3\%$ , haciendo subcultivos cada dos semanas hasta la aparición de embriones somáticos.

### 3.7 Efecto genotípico sobre la capacidad embriogénica

Para evaluar la capacidad embriogénica por genotipo, se colectaron botones florales de los siete genotipos seleccionados, establecidos en el Jardín Clonal Madre (T11).

Siguiendo la metodología descrita anteriormente, se extrajeron los cinco pétalos y cinco estaminoides de cada botón floral y se cultivaron en platos Petri con los medios NT1 y PCG. En cada plato Petri se cultivaron 15 pétalos y 15 estaminoides y se colocaron en condiciones de oscuridad por tres semanas (protocolo NT) y dos semanas (protocolo PSU).

Los explantes contaminados se eliminaron en cada cambio de medio según el protocolo correspondiente.

A los dos meses se determinó la reactividad de cada explante, es decir el porcentaje de explantes con capacidad de formar callo de cicatrización.

A partir de la aparición de los embriones somáticos, alrededor de los tres meses de la introducción en el medio de inducción, se evaluó la capacidad embriogénica, es decir el número de explantes con la capacidad de formar embriones, y a los cuatro meses el número de embriones producidos por cada explante.

En el Cuadro 2 se detallan los tratamientos evaluados.

**Cuadro 2.** Tratamientos evaluados para determinar la capacidad embriogénica de siete clones de cacao seleccionados por el CATIE, utilizando dos tipos de explantes en dos protocolos distintos.

<b>Clon</b>	<b>Protocolo<sup>1/</sup></b>	<b>Explante</b>
CATIE-R1	NT	Pétalo Estaminoide
	PSU	Pétalo Estaminoide
CATIE-R4	NT	Pétalo Estaminoide
	PSU	Pétalo Estaminoide
CATIE-R6	NT	Pétalo Estaminoide
	PSU	Pétalo Estaminoide
CC-137	NT	Pétalo Estaminoide
	PSU	Pétalo Estaminoide
ICS-95 T1	NT	Pétalo Estaminoide
	PSU	Pétalo Estaminoide
PMCT-58	NT	Pétalo Estaminoide
	PSU	Pétalo Estaminoide
UF-273 T1	NT	Pétalo Estaminoide
	PSU	Pétalo Estaminoide
		Estaminoide

<sup>1/</sup> NT: Nestlé; PSU: Penn State University.

### **3.8 Efecto del portainjerto sobre la respuesta embriogénica**

Para determinar el efecto del patrón o portainjerto sobre la capacidad embriogénica, se colectaron en el Ensayo de Calidad (T7), botones florales de los clones CATIE-R4 y CATIE-R6 injertados sobre cinco portainjertos diferentes: EET-400, IMC-67, PA-121, SPA-9 y UF-613.

Con base en los protocolos descritos anteriormente, se extrajeron los cinco pétalos y cinco estaminoides de cada botón para cultivarlos en platos Petri con los medios de cultivo

NT1 y PCG. En cada plato se cultivaron 15 pétalos y 15 estaminoides. Los platos se colocaron en condiciones de oscuridad por tres y dos semanas, respectivamente.

Los explantes contaminados se eliminaron en cada cambio de medio según el protocolo correspondiente.

A los dos meses de la introducción de los explantes se determinó la reactividad. A partir de la aparición de los embriones somáticos, se determinó el número de explantes con la capacidad de formar embriones y a los cuatro meses el número de embriones producidos por cada explante.

Los tratamientos evaluados se detallan en el Cuadro 3.

### **3.9 Embriogénesis somática secundaria**

Los embriones obtenidos a partir de los explantes introducidos para la evaluación del efecto genotípico fueron utilizados para la inducción de la embriogénesis secundaria siguiendo los protocolos de Nestlé, descrito por Solano (2008) y de Penn State University (Maximova *et al.* 2002).

En el protocolo de Nestlé se utilizó el medio de cultivo M21, compuesto por los macroelementos M&S, los microelementos y vitaminas DKW; 2,4,5-T (1 mg/l), adenina (0,25 mg/l), los aminoácidos: L-lisina (0,46 mg/l), L-leucina (0,33 mg/l), L-arginina (0,44 mg/l), L-triptófano (0,51 mg/l), glucosa (30 g/l) y el gelificante Gellan Gum® (2,8 g/l), con un pH de 5,6.

Asimismo, el medio de cultivo SCG-2, utilizado en el protocolo de Penn State University, está constituido por las sales de McCown's (2,3 g/l), las vitaminas: myo-Inositol (100 mg/l), ácido nicotínico (1 mg/l), piridoxina (1 mg/l) y tiamina-HCl (10 mg/l), 2,4-D (2 mg/l), 6-BA ( $5 \times 10^{-5}$  mg/l), glucosa (20 g/l) y el gelificante Gellan Gum® (2,8 g/l), con un pH de 5,7.

**Cuadro 3.** Tratamientos evaluados para determinar la capacidad embriogénica de dos clones de cacao seleccionados por el CATIE injertados sobre cinco portainjertos, utilizando dos tipos de explantes en dos protocolos distintos.

<b>Clon</b>	<b>Portainjerto</b>	<b>Protocolo<sup>1/</sup></b>	<b>Explante</b>	
CATIE-R4	EET-400	NT	Pétalo Estaminoide	
		PSU	Pétalo Estaminoide	
	IMC-67	NT	Pétalo Estaminoide	
		PSU	Pétalo Estaminoide	
	PA-121	NT	Pétalo Estaminoide	
		PSU	Pétalo Estaminoide	
	SPA-9	NT	Pétalo Estaminoide	
		PSU	Pétalo Estaminoide	
	UF-613	NT	Pétalo Estaminoide	
		PSU	Pétalo Estaminoide	
	CATIE-R6	EET-400	NT	Pétalo Estaminoide
			PSU	Pétalo Estaminoide
		IMC-67	NT	Pétalo Estaminoide
			PSU	Pétalo Estaminoide
		PA-121	NT	Pétalo Estaminoide
			PSU	Pétalo Estaminoide
		SPA-9	NT	Pétalo Estaminoide
			PSU	Pétalo Estaminoide
UF-613		NT	Pétalo Estaminoide	
		PSU	Pétalo Estaminoide	

<sup>1/</sup> NT: Nestlé; PSU: Penn State University.

Se tomaron todos los embriones somáticos formados en los medios de expresión de la embriogénesis y se clasificaron por tamaño y estado de desarrollo en tres categorías: **1) Embriones pequeños:** embriones en estado torpedo sin cotiledones desarrollados; **2) Embriones medianos:** embriones que presentan elongación del hipocótilo y diferenciación de cotiledones; **3) Embriones grandes:** embriones de mayor tamaño, con ejes apical y radical diferenciados y cotiledones muy desarrollados (Figura 3).



**Figura 3.** Clasificación de embriones somáticos de acuerdo a su tamaño y estado de desarrollo para ser cultivados en el medio de cultivo de embriogénesis somática secundaria. A. Embriones pequeños (1-2 mm). B. Embriones medianos (3-4 mm). C. Embriones grandes (>4 mm).

Se tomaron los embriones formados y se separaron en placas Petri estériles según la categoría. En esta fase no se diferenciaron los embriones formados en los dos tipos de explante, de manera que se mezclaron los que se formaron a partir de pétalos y de estaminoides.

Con la ayuda de pinzas y un bisturí estériles, los embriones se cortaron en piezas de entre 1 y 2 mm. La masa de embriones picados de cada categoría se dividió en dos partes iguales y se cultivaron en platos Petri de 60 x 15 mm con 8 ml de los medios de cultivo M21 y SCG-2.

El material cultivado en el medio de cultivo SCG-2 se transfirió a los dos meses a platos Petri de 60 x 15 mm con 8 ml del medio ED y se hizo cambio de medio cada dos semanas hasta la formación de embriones secundarios. Mientras tanto, los explantes cultivados en el medio M21 se transfirieron a los dos meses a platos Petri con el mismo medio y se hicieron cambios mensuales a medio fresco hasta la aparición de los embriones secundarios.

Los tratamientos evaluados se detallan en el Cuadro 4.

**Cuadro 4.** Tratamientos evaluados para la inducción de embriogénesis somática secundaria de clones de cacao seleccionados por el CATIE utilizando dos protocolos distintos.

Clon	Protocolo <sup>1/</sup>	Categoría
CATIE-R1	NT	Emb. pequeños Emb. medianos Emb. grandes
	PSU	Emb. pequeños Emb. medianos Emb. grandes
CATIE-R4	NT	Emb. pequeños Emb. medianos Emb. grandes
	PSU	Emb. pequeños Emb. medianos Emb. grandes
CATIE-R6	NT	Emb. pequeños Emb. medianos Emb. grandes
	PSU	Emb. pequeños Emb. medianos Emb. grandes
CC-137	NT	Emb. pequeños Emb. medianos Emb. grandes
	PSU	Emb. pequeños Emb. medianos Emb. grandes
PMCT-58	NT	Emb. pequeños Emb. medianos Emb. grandes
	PSU	Emb. pequeños Emb. medianos Emb. grandes
UF-273 T1	NT	Emb. pequeños Emb. medianos Emb. grandes
	PSU	Emb. pequeños Emb. medianos Emb. grandes

<sup>1/</sup> NT: Nestlé; PSU: Penn State University.

### 3.10 Diseño experimental

Se utilizó un diseño completamente aleatorizado, en el que el número de repeticiones varió entre los tratamientos debido a la eliminación de los explantes contaminados antes de la evaluación respectiva. Se siguió el siguiente modelo lineal:

$$Y_{ijkl} = \mu + C_i + E_j + C_i E_j + P_k + C_i P_k + E_j P_k + C_i E_j P_k + \varepsilon_{ijkl}$$

Donde:

$Y_{ijkl}$  = variable de respuesta

$\mu$  = media poblacional

$C_i$  = efecto del i-ésimo clon

$E_j$  = efecto j-ésimo tipo de explante

$C_i E_j$  = término de interacción clon x tipo de explante

$P_k$  = efecto del k-ésimo protocolo

$C_i P_k$  = término de interacción clon x protocolo

$E_j P_k$  = término de interacción tipo de explante x protocolo

$C_i E_j P_k$  = término de interacción clon x tipo de explante x protocolo

$\varepsilon_{ijkl}$  = término de error aleatorio  $\sim N(0, \sigma^2)$

### 3.11 Variables evaluadas

#### 3.11.1 Reactividad

A los dos meses después de la introducción de explantes del campo, se determinó el porcentaje de explantes reactivos, es decir, con la capacidad de formar callo de cicatrización.

#### 3.11.2 Capacidad embriogénica

A partir de la aparición de embriones somáticos, alrededor de tres meses después de la introducción y hasta los cuatro meses, se determinó el porcentaje de explantes embriogénicos, es decir, que dieron origen a la formación de embriones somáticos.

### ***3.11.3 Número de embriones somáticos producidos***

Cuatro meses después de la introducción, se determinó el número de embriones somáticos producidos por cada explante.

### **3.12 Análisis de datos**

El análisis de las variables cualitativas reactividad y capacidad embriogénica se llevó a cabo mediante la descripción de los resultados, mientras que la variable número de embriones producidos se evaluó mediante un análisis de modelos lineales generalizados y mixtos. Debido a que esta variable es de tipo conteo, sigue una distribución estadística Poisson, cuyos datos fueron procesados y analizados utilizando el Software InfoStat versión 2012.

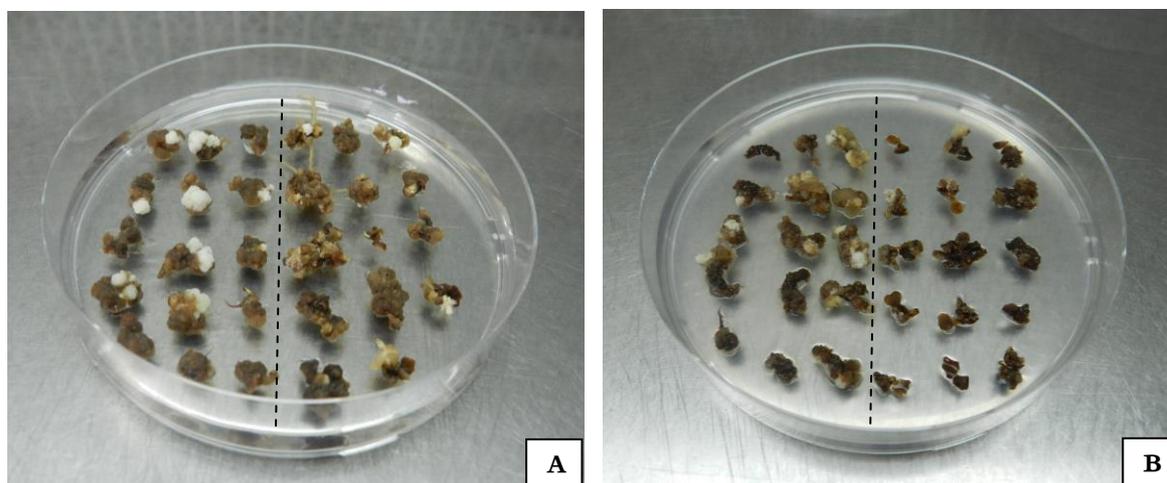
## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Observaciones generales

A continuación se describen los principales cambios observados durante la primera fase del procedimiento, ya que independientemente de los factores evaluados, las reacciones de los explantes en los primeros días fueron normalmente muy similares.

A partir de la segunda semana de la introducción de los explantes en los medios de cultivo de inducción, se empezaron a notar cambios en los mismos, ya que se observó la formación de agregados celulares sobre éstos. En el caso de los pétalos, estos agregados iniciaron su crecimiento en la parte cóncava, mientras que en los estaminoides la formación inició en el extremo del corte de los mismos.

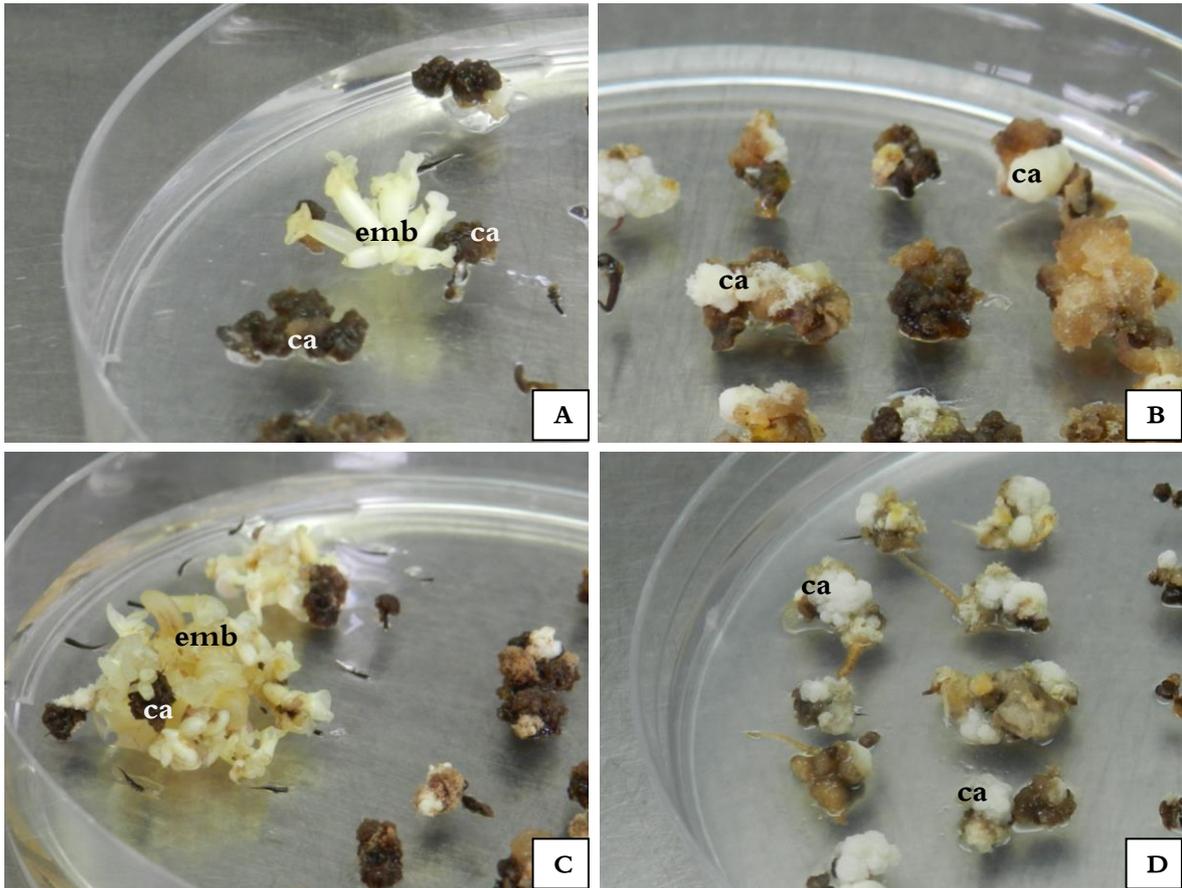
Después de dos meses, la reactividad de los explantes produjo la formación de un callo de cicatrización, que en la mayoría de los casos se tornó de un color café oscuro y una consistencia suave, aunque también en algunos explantes se formó un callo blanco y de una consistencia más sólida (Figura 4).



**Figura 4.** Formación de callo en explantes de CATIE-R4 dos meses después de la introducción al medio de inducción de los protocolos: A. NT y B. PSU. En ambos platos Petri se observan los estaminoides a la izquierda y los pétalos a la derecha.

Entre los tres y cuatro meses después de la introducción al medio de inducción, dio inicio la formación de embriones somáticos a partir del callo de cicatrización desarrollado. En la totalidad de los explantes, la formación de embriones se dio

principalmente en los callos café oscuro, mientras que sobre los callos blancos y de mayor dureza no se observó respuesta embriogénica (Figura 5).



**Figura 5.** Formación de callo (ca) y embriones somáticos (emb) a los cuatro meses de cultivo. A. Explantes de CATIE-R4 en el medio de cultivo NT2. B. Explantes de CATIE-R6 en el medio NT2. C. Explantes de PMCT-58 en el medio NT2. D. Explantes de CATIE-R6 en el medio ED.

Este comportamiento observado en la mayoría de los explantes está estrechamente relacionado con la condición de recalcitrancia del cacao, es decir, la inhabilidad de las células, órganos y tejidos de responder eficientemente a las condiciones del cultivo de tejidos, lo cual limita en algún grado la producción comercial de las especies recalcitrantes (Benson 2000). Según Alemanno *et al.* (2003), uno de los factores que induce esta característica en las especies, es el alto contenido fenólico y la oxidación de estos compuestos, lo cual ha sido demostrado en cacao.

Adicionalmente a que, de forma natural, se han encontrado muchos polifenoles en las diferentes estructuras de la flor de cacao, durante el proceso de embriogénesis somática se da la síntesis de algunos otros. Alemanno *et al.* (2003) encontraron en callos *in vitro* una

composición fenólica alta, más semejante a la de las semillas de cacao, que a la de los estaminoides que les dieron origen.

A pesar de que no se ha demostrado una relación clara entre la síntesis y concentración de polifenoles durante la callogénesis con la respuesta embriogénica, su naturaleza antioxidante ha sido asociada con las condiciones de estrés a que los explantes se encuentran sometidos, pues se presume que estas moléculas cumplen una función de protección de los tejidos contra las condiciones propias del cultivo *in vitro* (Alemanno *et al.* 2003). Por esta razón, Alemanno *et al.* (2003) asociaron la alta concentración de compuestos fenólicos en los callos, con la respuesta no embriogénica de los explantes, ya que el aumento en la síntesis de éstas es una respuesta a las condiciones de estrés *in vitro*, lo cual limita la expresión de la embriogénesis somática, por lo que es necesario que haya un equilibrio en la síntesis de estos compuestos.

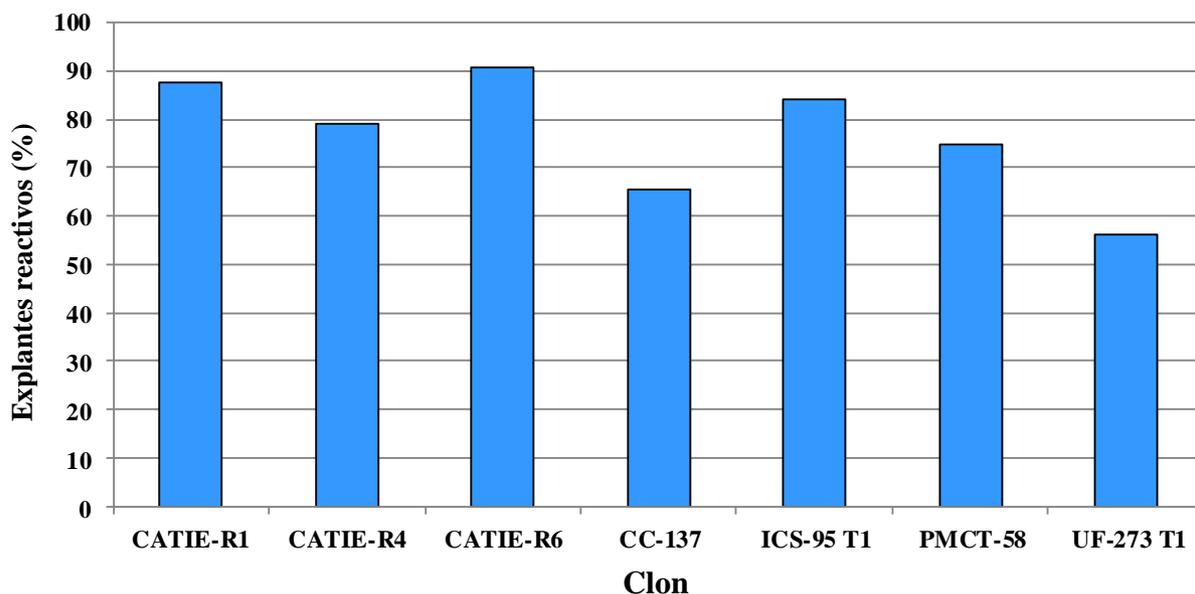
Asimismo, Omokolo *et al.* (1997), consideran que la actividad de algunas enzimas como la peroxidasa y la AIA oxidasa está envuelta en muchos mecanismos fisiológicos, por lo que podría ser un marcador del potencial embriogénico en varias especies; por lo tanto, la alta concentración de compuestos fenólicos en los callos y que modifican la actividad enzimática, podrían reducir la respuesta embriogénica.

## **4.2 Evaluación del efecto genotípico sobre la capacidad embriogénica**

### **4.2.1 Reactividad**

La reactividad de los explantes (formación de callo de cicatrización) se empezó a mostrar desde las primeras dos semanas después del cultivo, cuando se pudieron observar cambios en la estructura de los mismos, mediante la multiplicación de células que dieron origen a los callos, los cuales a los dos meses mostraron un crecimiento importante, por lo que fue el momento en que se midió esta variable.

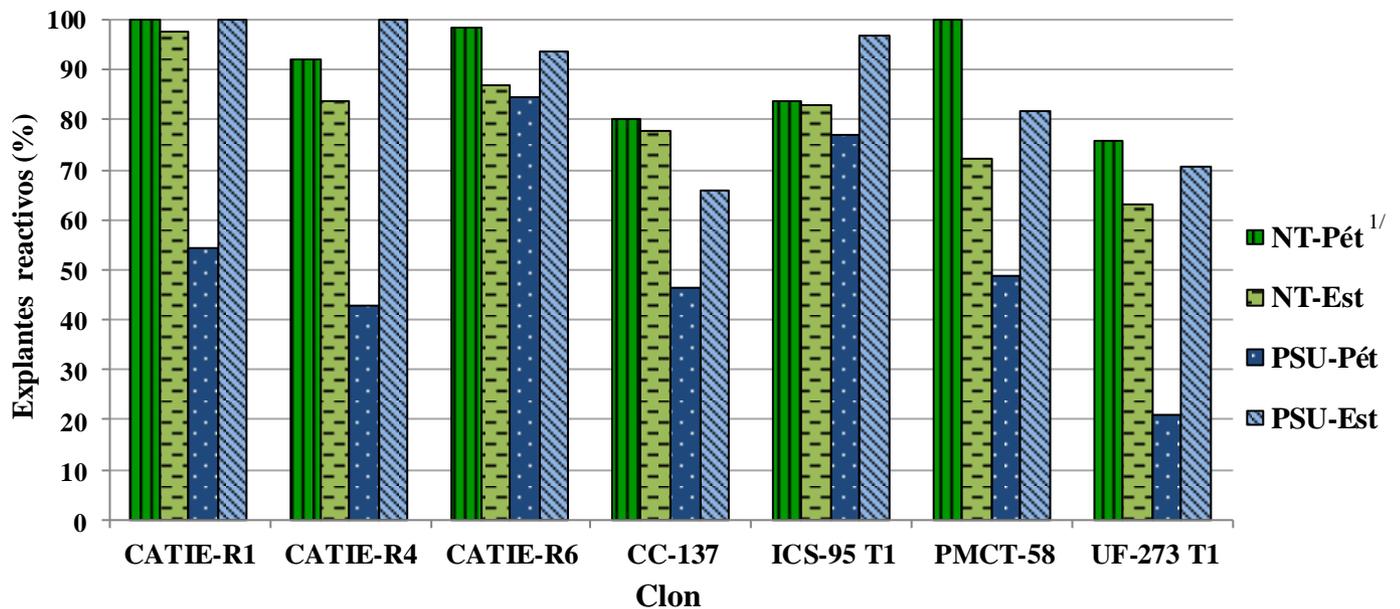
Según el genotipo, el mayor porcentaje de explantes con reactividad a los dos meses se presentó en el clon CATIE-R6 con un 90,7%, seguido del CATIE-R1 (87,6%) y el ICS-95 T1 con un 84,1%. En el CATIE-R4 se presentó una reactividad en el 79,0% de los explantes y 74,8% en el PMCT-58; mientras que en el CC-137 y el UF-273 T1 se observó la menor reactividad, con un 65,6% y 56,1%, respectivamente (Figura 6).



**Figura 6.** Porcentaje de explantes reactivos de siete clones de cacao a los dos meses de cultivo.

Los porcentajes de explantes con reactividad variaron entre los diferentes tratamientos, desde un 100% hasta un 20,9%. Los tratamientos cuyos explantes presentaron un 100% de reactividad fueron los clones CATIE-R1 y PMCT-58 en el protocolo NT y tipo de explante pétalo, al igual que los clones CATIE-R1 y CATIE-R4 en el protocolo PSU y tipo de explante estaminoide. Mientras tanto, cuatro tratamientos registraron menos de la mitad de los explantes con reactividad, que fueron los clones UF-273 T1, CATIE-R4, CC-137 y PMCT-58, todos con el protocolo PSU y explante pétalo, con 20,9%, 42,4%, 46,3% y 48,5%, respectivamente (Figura 7).

Se observó una clara tendencia en la respuesta, ya que para todos los clones evaluados, en el protocolo NT, la mayor proporción de explantes con reactividad se presentó con los pétalos, mientras que en el protocolo PSU fue con los estaminoides (Figura 7). Solano (2008) encontró que la mejor respuesta callogénica en ambos protocolos se dio con el cultivo de estaminoides, lo cual no concuerda con lo encontrado en este trabajo en el protocolo NT. Esto indica que la respuesta a la formación de callo en condiciones *in vitro* es el resultado del efecto de la combinación de factores como el medio de cultivo, el tipo de explante y el genotipo, los cuales interactúan entre sí (Chanatásig 2004).



<sup>1/</sup>NT: Nestlé, PSU: Penn State University, Pét: pétalo; Est: estaminoide.

**Figura 7.** Porcentaje de explantes reactivos de siete clones de cacao a los dos meses, utilizando dos tipos explantes y dos protocolos.

La formación de callo en condiciones de cultivo *in vitro* es afectado por muchos factores, entre los que destaca el efecto de los reguladores de crecimiento. Las auxinas son consideradas las hormonas más importantes en la regulación de la embriogénesis somática *in vitro*, ya que mediante el establecimiento de un gradiente de éstas durante la fase de inducción, se origina la simetría bilateral de los embriones (Liu *et al.* 1993; Fischer y Neuhaus 1996). Jiménez (2005) reporta que la adición de la auxina 2,4-D al medio de cultivo (como el caso de los medios PCG, SCG-1 y NT1) incrementa los niveles endógenos de auxinas en los explantes, lo cual desencadena una serie de señales que son cruciales para la determinación de la respuesta embriogénica (Pasternak *et al.* 2002).

Por otra parte, Benega *et al.* (2000) y Lakshmanan y Taji (2000) indican que las citoquininas tienen participación principalmente en la embriogénesis somática indirecta, mediante la inducción de la dediferenciación y la proliferación extensiva de células hasta la formación de los embriones. En el caso del medio PCG, esta función la cumple el TDZ, el cual ha mostrado su efecto con el incremento del tamaño y peso fresco de explantes de diferentes genotipos de cacao (Li *et al.* 1998), mientras que en el medio NT1, la kinetina cumple este efecto.

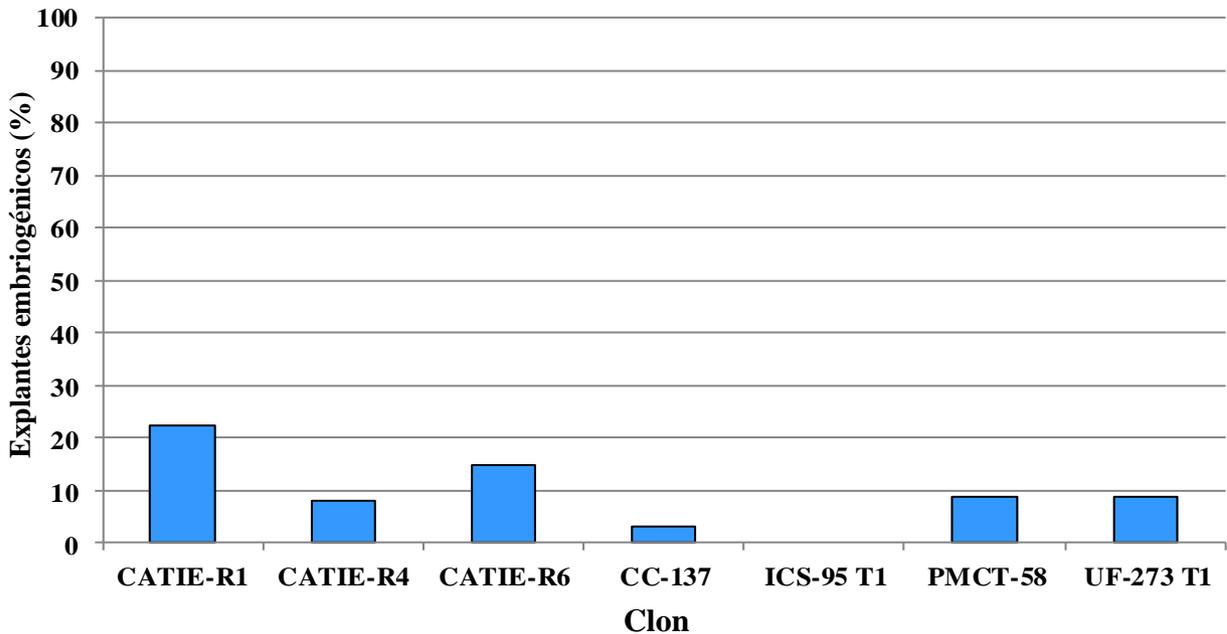
A pesar de que la proliferación de callo se debe principalmente a la acción de los reguladores de crecimiento, éstos no actúan de manera independiente, sino que tienen una alta interacción con otros factores como los demás componentes del medio de cultivo, el genotipo y el tipo de explante que se utilice (Chanatásig 2004). Esto explica las diferencias encontradas en la respuesta de reactividad entre los diferentes tratamientos que se evaluaron.

A pesar de que se ha demostrado que con la técnica de embriogénesis somática es posible la producción masiva de plantas de cacao, Miller (2009), afirma que la eficiencia no es aún la óptima para la regeneración de algunos genotipos, por lo que es necesario realizar los ajustes de los protocolos para cada genotipo en particular, pues se ha demostrado que el genotipo tiene un efecto importante en el resultado desde las primeras etapas del cultivo *in vitro*, es decir, desde la fase de callogénesis (Li *et al.* 1998).

#### **4.2.2 Capacidad embriogénica**

La capacidad embriogénica se determinó a los cuatro meses después de iniciado el cultivo, pues a pesar de que se empezó a observar la formación de los primeros embriones somáticos desde el tercer mes, la cantidad y el estado de desarrollo de éstos fue más estable a partir del cuarto mes. La proporción de explantes que formaron embriones somáticos varió entre los clones, siendo los más exitosos los clones CATIE-R1 y CATIE-R6 con un 22,5% y 14,9%; respectivamente y los menos exitosos los clones CC-137 con 3,2% e ICS-95 T1, el cual no presentó formación de embriones (Figura 8).

Con base en estos resultados, se pudo determinar que los clones ICS-95 T1 y CC-137 son genotipos con bajo potencial para ser reproducidos mediante esta técnica bajo las condiciones evaluadas, pues al igual que en esta investigación, fueron los clones con menor capacidad embriogénica reportados por Solano (2008), pues en la mayoría de combinaciones de factores utilizadas con estos genotipos, la cantidad de explantes que produjeron embriones fue menor al 1%.



**Figura 8.** Porcentaje de explantes de siete clones de cacao que presentaron formación de embriones somáticos a los cuatro meses de cultivo.

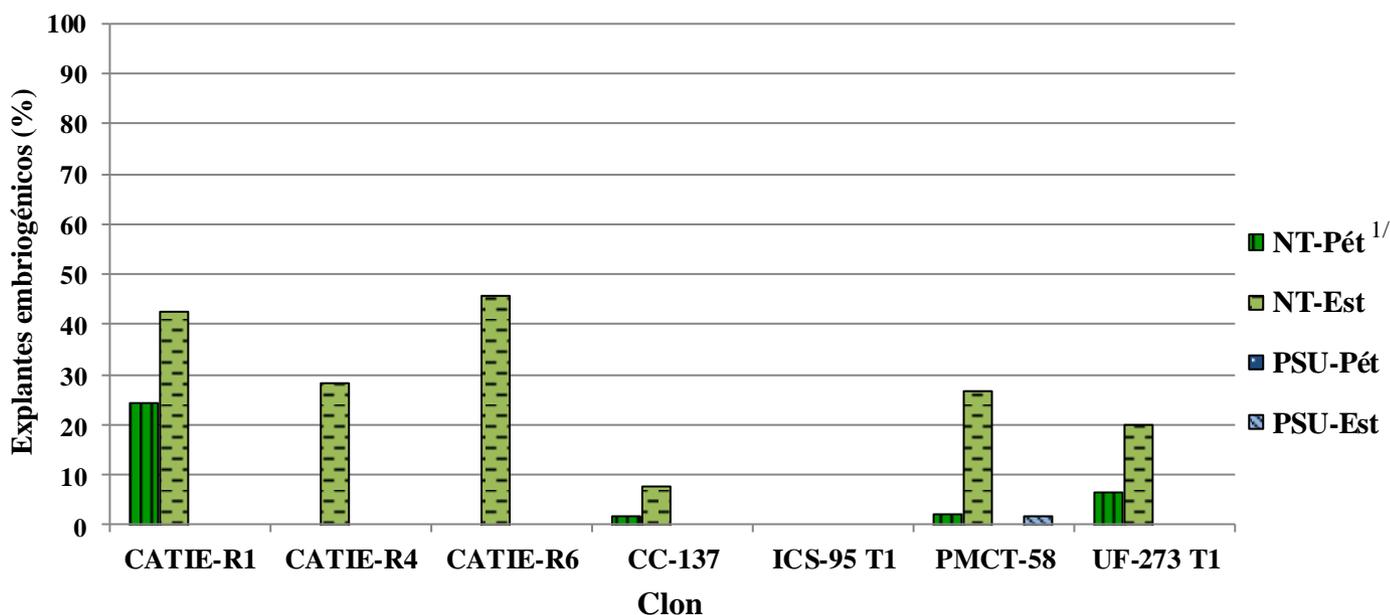
La respuesta de los explantes a las combinaciones de factores varió entre los tratamientos evaluados, de la misma forma como ha sido reportado en investigaciones previas realizadas en el CATIE utilizando estos protocolos (Chanatásig 2004; Solano 2008). Para todos los clones, la combinación que presentó un mayor porcentaje de explantes con capacidad embriogénica fue el protocolo NT utilizando el explante estaminoide, siendo los más exitosos los clones CATIE-R6 (46,0%) y el CATIE-R1 con 42,6% de explantes con embriones (Figura 9).

El cultivo de pétalos en el protocolo NT dio respuesta sólo en cuatro de los siete clones evaluados. A los cuatro meses se observó un 24,3% de estos explantes del genotipo CATIE-R1 con embriones, seguido del UF-273 T1 con 6,5% y los clones PMCT-58 y CC-137 con 2,1% y 2,0%, respectivamente. En esta combinación no se obtuvo respuesta para los clones CATIE-R4, CATIE-R6 e ICS-95 T1 (Figura 9).

Es importante mencionar que el clon ICS-95 T1, además de ser el clon que presentó los mayores índices de contaminación al momento de la introducción, fue el que menor respuesta embriogénica dio, ya que no se obtuvieron embriones somáticos en ninguno de los tratamientos. Este resultado confirma el bajo potencial del clon para ser reproducido por medio de embriogénesis somática, lo cual concuerda con lo encontrado por Solano (2008),

quien obtuvo porcentajes de explantes con embriones menores al 1,31% en los mismos tratamientos, comparado con un 59,2% en el UF-273 y 26,6% en el clon EET-183.

Asimismo, el protocolo PSU dio resultados de muy bajo éxito, ya que solamente se encontró un 2,0% de estaminoides de PMCT-58 con capacidad embriogénica, mientras que no hubo respuesta en ninguno de los demás clones con ninguno de los explantes cultivados (Figura 9).



<sup>1/</sup>NT: Nestlé, PSU: Penn State University, Pét: pétalo; Est: estaminoide.

**Figura 9.** Porcentaje de explantes de siete clones de cacao con capacidad embriogénica a los cuatro meses, utilizando dos tipos de explante y dos protocolos.

Tal y como se ha comprobado, la respuesta a la embriogénesis somática es favorecida por los diferentes componentes del medio de cultivo, al igual que el factor genético que tiene un efecto importante sobre ésta. Durante las diferentes fases de la embriogénesis, en las células ocurren una serie de modificaciones bioquímicas y morfológicas que están estrechamente ligadas a alteraciones en la expresión de ciertos genes (Zimmerman 1993). Entre los genes que se han descrito por su papel en la inducción de embriogénesis somática, el gen *SERK* (*somatic embryogenesis receptor kinase*) es uno de los más importantes (Oliveira *et al.* 2005).

Oliveira *et al.* (2005) determinaron que el gen *SERK* se encuentra además en otras especies como *Arabidopsis thaliana*, *Dactylis glomerata*, *Hieracium*, zanahoria y maíz, en las

cuales también está ligado a las diferentes etapas de la formación de embriones somáticos. Además, mencionan que la alta expresión del gen en algunas especies es inducida mediante la adición de auxinas al medio de cultivo, mientras que para otras, entre las que se encuentra el cacao, con la adición tanto de auxinas como de citoquininas (Oliveira *et al.* 2005), ambos componentes de los medios de los protocolos evaluados.

Las diferencias en las respuestas embriogénicas obtenidas confirman el efecto de la interacción del genotipo con el medio de cultivo reportado por López-Baez *et al.* (2001), quienes evaluaron la capacidad embriogénica de doce genotipos mexicanos de interés comercial, encontrando que a pesar de que se dio la formación de callo en todos los clones, la formación de embriones varió entre un 41,0% del clon RIM-48 y un 5,5% del H-16. Las variantes en las respuestas, permitió concluir en la factibilidad de la técnica de embriogénesis somática de cacao para la producción comercial de esos materiales, no obstante, con la necesidad de optimizarla para su aplicación (López-Baez *et al.* 2001)

Asimismo, las variaciones en los niveles de hormonas endógenas, principalmente citoquininas que se pueden presentar entre genotipos, pueden tener influencia en la respuesta de los tejidos a la embriogénesis somática (Deo *et al.* 2010).

### **4.2.3 Número de embriones somáticos producidos**

Con respecto al promedio de embriones producidos por explante, no se encontraron diferencias significativas entre las combinaciones clon-protocolo-explante, pero sí se evidenció una interacción entre clon-protocolo y clon-tipo de explante; por lo tanto no es posible concluir para cada factor por separado.

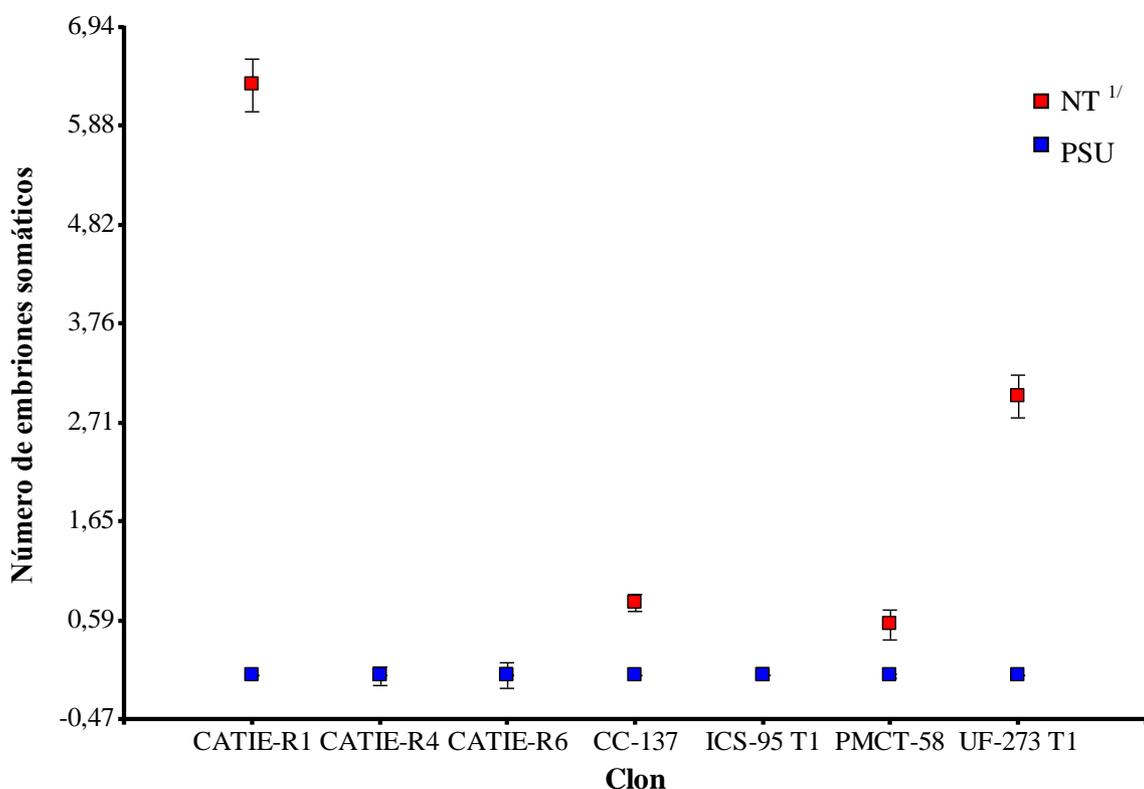
Aunque Chantásig (2004) no encontró alguna correlación entre la formación de callo y la capacidad embriogénica de los explantes, el comportamiento de las respuestas entre callogénesis y embriogénesis mostraron el mismo patrón de comportamiento, es decir, que el orden los genotipos según el porcentaje de formación de callo y embriones somáticos fue el mismo. Por otra parte, a pesar de que la presencia de callo no garantiza que se dé la formación de embriones, se determinó que la obtención de embriones es dependiente de la formación de callo, lo cual permite suponer que pueda existir algún grado de relación entre ambas fases.

De hecho, Chantásig (2004) no descarta que exista alguna relación entre estas variables, ya que sus mediciones fueron realizadas al mes y medio de cultivo, cuando todavía

no se expresaba la embriogénesis somática, por lo que considera que la respuesta no pudo considerarse concluyente.

Se comprobó la existencia de un efecto del protocolo sobre cada genotipo ( $p < 0,0001$ ) con un nivel de significancia del 5%, siendo la mejor combinación el clon CATIE-R1 con el protocolo NT y el UF-273 T1 en el mismo protocolo, cuyos explantes produjeron en promedio 6,32 y 3,00 embriones somáticos, respectivamente. Las diferencias significativas encontradas, principalmente se debieron a la baja eficiencia del protocolo PSU, pues únicamente hubo una reacción leve en el clon PMCT-58, mientras que no dio respuesta para ninguno de los otros seis clones (Figura 10).

A pesar de que no se logró determinar una causa de la baja efectividad mostrada por el protocolo PSU, se presume que esta se dio por una fuerte correlación con los demás factores en estudio, por lo que es necesario estudiar a profundidad la influencia de factores como la época del año y la fenología, las cuales tienen un importante efecto sobre la respuesta embriogénica (Issali *et al.* 2010).



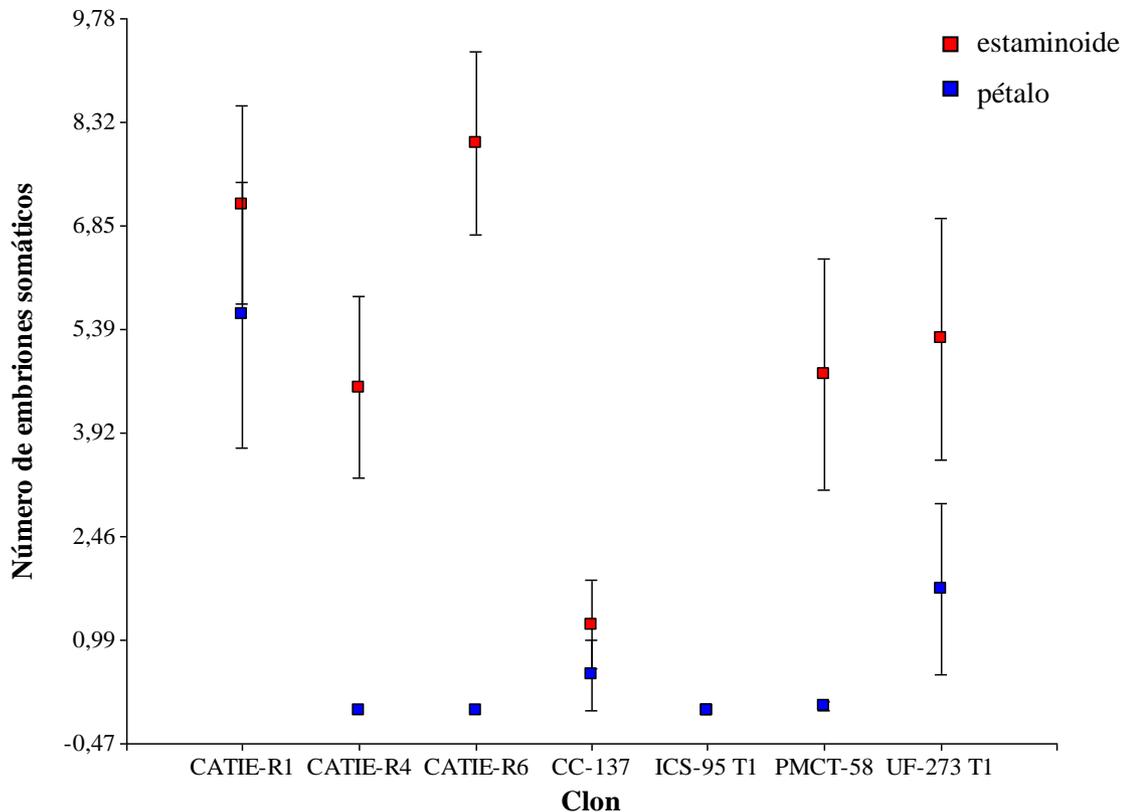
<sup>1/</sup>NT: Nestlé, PSU: Penn State University

**Figura 10.** Número promedio de embriones somáticos obtenidos por explante de acuerdo con la combinación clon-protocolo.

A pesar de que los resultados mostraron claras diferencias entre la efectividad de ambos protocolos, esta respuesta difiere de los resultados obtenidos por Solano (2008) y Chanatásig (2004), quienes reportan la obtención de embriones somáticos con el protocolo PSU. Estas diferencias podrían estar relacionadas con factores tanto climáticos como fenológicos del árbol de cacao de donde se tomaron los explantes, los cuales tienen una influencia importante en la respuesta embriogénica de los mismos, pues Issali *et al.* (2008) e Issali *et al.* (2010) demostraron que los explantes respondieron de manera distinta a las diferentes concentraciones de 2,4-D y TDZ en dos años consecutivos, con lo que demostraron el efecto de la concentración hormonal sobre la respuesta embriogénica.

Debido a que se obtuvo una respuesta muy baja con el protocolo PSU, la interacción clon-tipo de explante se analizó únicamente con los datos obtenidos en el protocolo NT. Se encontraron diferencias significativas entre las combinaciones estudiadas, siendo en los clones CATIE-R6, UF-273 T1, PMCT-58 y CATIE-R4 más efectivo el cultivo de estaminoides que el de los pétalos, con un promedio de 8,02; 5,25; 4,75 y 4,57 embriones por explante, respectivamente; mientras que con el cultivo de pétalos se obtuvieron 0,00 (CATIE-R6); 1,71 (UF-273 T1); 0,06 (PMCT-58) y 0,00 (CATIE-R4) embriones por explante (Figura 11).

Por otra parte, no se encontraron diferencias significativas entre los dos tipos de explante para los clones CATIE-R1 y CC-137, de manera que podría utilizarse tanto los pétalos como los estaminoides para la obtención de una mayor cantidad de embriones por explante (Figura 11).



**Figura 11.** Número promedio de embriones somáticos producidos por explante de acuerdo con la combinación clon-tipo de explante utilizando el protocolo NT.

Buah (2010), menciona que el cultivo de estaminoides es preferible con respecto al de pétalos, pues en éstos últimos, la respuesta embriogénica ha sido menor que en estaminoides (Alemanno et al. 1996; Li *et al.* 1998, Tan y Furtek 2003). Por su parte, Solano (2008) encontró una mejor respuesta para los clones CATIE-R4, CATIE-R6, CC-137 y UF-273 T1 con el cultivo de estaminoides en el protocolo PSU, mientras que para clones como el EET-183, CATIE-R7 e ICS-95, la mejor respuesta se observó en el protocolo NT con el cultivo de pétalos.

De acuerdo con los resultados obtenidos, la combinación de factores que permite un mayor número de embriones por explante y que por lo tanto, sería la más adecuada para la producción masiva de estos genotipos de cacao es el uso de estaminoides en el protocolo NT.

### 4.3 Evaluación del efecto del portainjerto sobre la respuesta embriogénica

#### 4.3.1 Reactividad

Al igual que lo que se observó en la evaluación del efecto genotípico, los mayores porcentajes de explantes reactivos se observaron en las combinaciones NT-pétalo y PSU-estaminoide. En ocho de las diez combinaciones clon-portainjerto que se evaluaron en el protocolo NT, los pétalos fueron más reactivos que los estaminoides pues únicamente en las combinaciones CATIE-R4 injertado sobre PA-121 y CATIE-R6 injertado sobre EET-400, los estaminoides presentaron más reactividad que los pétalos, mientras que en el protocolo PSU, para todas las combinaciones clon-portainjerto el 100% de los estaminoides presentaron reactividad (Cuadro 5).

**Cuadro 5.** Porcentaje de explantes de dos clones de cacao injertados sobre cinco portainjertos, con reactividad a los dos meses utilizando dos tipos de explantes y dos protocolos.

Clon	Portainjerto	NT <sup>1/</sup>		PSU <sup>1/</sup>	
		Pétalo	Estaminoide	Pétalo	Estaminoide
CATIE-R4	IMC-67	90,6	63,3	--	--
	EET-400	95,1	83,3	86,7	100,0
	PA-121	80,0	93,3	80,0	100,0
	SPA-9	96,0	52,0	73,3	100,0
	UF-613	90,0	73,3	86,7	100,0
CATIE-R6	IMC-67	83,3	36,7	--	--
	EET-400	86,7	100,0	90,9	100,0
	PA-121	100,0	100,0	66,7	100,0
	SPA-9	100,0	55,9	--	--
	UF-613	100,0	43,3	66,7	100,0

<sup>1/</sup> NT: Nestlé; PSU: Penn State University.

Debido a pérdidas de explantes por contaminación durante el proceso, no fue posible realizar la evaluación de las combinaciones CATIE-R4 – IMC-67; CATIE-R6 – IMC-67 y CATIE-R6 – SPA-9 en el protocolo PSU.

### 4.3.2 Capacidad embriogénica

Los mayores porcentajes de explantes embriogénicos se determinaron en los tratamientos CATIE-R6 injertado sobre EET-400, protocolo NT, tipo de explante estaminoide y CATIE-R6 sobre PA-121, protocolo PSU, tipo de explante estaminoide, los cuales fueron 53,9% y 40,0% respectivamente. Por su parte, para el clon CATIE-R4, el mayor porcentaje de explantes con embriones se observó con el portainjerto PA-121, protocolo NT y tipo de explante estaminoide, con un 16,7% y en el portainjerto SPA-9, protocolo PSU tipo de explante estaminoide con 8,3%. En ninguno de los dos clones hubo formación de embriones cuando se cultivó el tipo de explante pétalo (Cuadro 6).

**Cuadro 6.** Porcentaje de explantes de dos clones de cacao injertados sobre cinco portainjertos, que presentaron capacidad embriogénica a los cuatro meses utilizando dos tipos de explantes y dos protocolos.

Clon	Portainjerto	NT <sup>1/</sup>		PSU <sup>1/</sup>	
		Pétalo	Estaminoide	Pétalo	Estaminoide
CATIE-R4	IMC-67	0,0	0,0	--	--
	EET-400	0,0	0,0	--	--
	PA-121	0,0	16,7	0,0	0,0
	SPA-9	0,0	0,0	0,0	8,3
	UF-613	0,0	4,6	0,0	0,0
CATIE-R6	IMC-67	0,0	0,0	--	--
	EET-400	0,0	53,9	0,0	20,0
	PA-121	--	--	0,0	40,0
	SPA-9	0,0	3,2	--	--
	UF-613	0,0	0,0	0,0	20,0

<sup>1/</sup>NT: Nestlé; PSU: Penn State University.

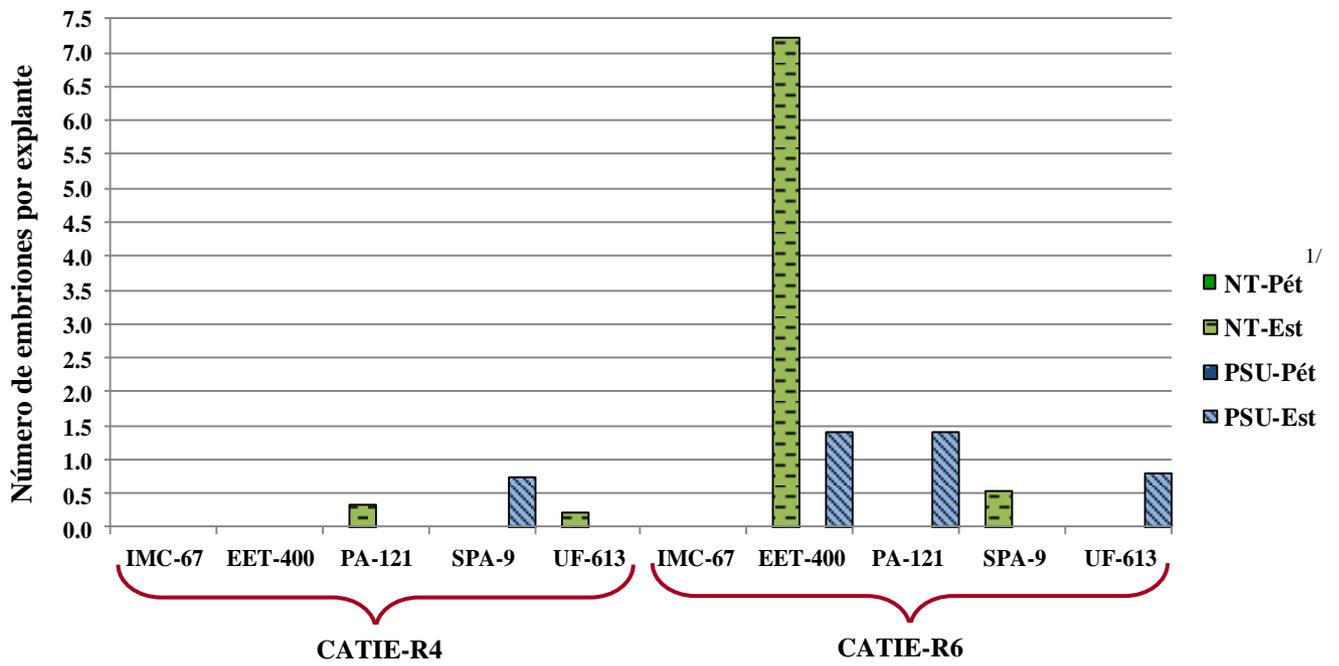
Solano (2008) evaluó la combinación de los clones CATIE-R4 y CATIE-R6 injertado sobre los portainjertos IMC-67 y UF-613 y determinó que la combinación PSU-estaminoide presentó la mayor proporción de explantes con formación de embriones somáticos, los cuales variaron entre 72,9% y 30,5% en los clones CATIE-R6 injertado sobre UF-613 y CATIE-R4 injertado sobre IMC-67, respectivamente. Los porcentajes de formación de embriones en los demás combinaciones evaluadas fluctuaron entre 0,0% (CATIE-R4 injertado sobre IMC-67, protocolo NT, explante estaminoide) y 7,9% (CATIE-R6 sobre UF-613, protocolo PSU, explante pétalo) (Solano 2008).

### ***4.3.3 Número de embriones somáticos producidos***

El número promedio de embriones somáticos producidos por explante fue mayor en los tratamientos que presentaron un mayor porcentaje de explantes con capacidad embriogénica. La mayor cantidad de embriones somáticos formados por explante se presentó en el clon CATIE-R6 injertado sobre EET-400, protocolo NT, explante estaminoide (7,23 embriones); seguido del CATIE-R6 injertado sobre PA-121 y sobre EET-400, protocolo PSU, explante estaminoide, ambos con 1,4 embriones por explante.

Entre los explantes que presentaron capacidad embriogénica, la menor cantidad de embriones somáticos formados se observó en el clon CATIE-R4 injertado sobre UF-613, protocolo NT, explante estaminoide con un promedio de 0,23 embriones (Figura 12).

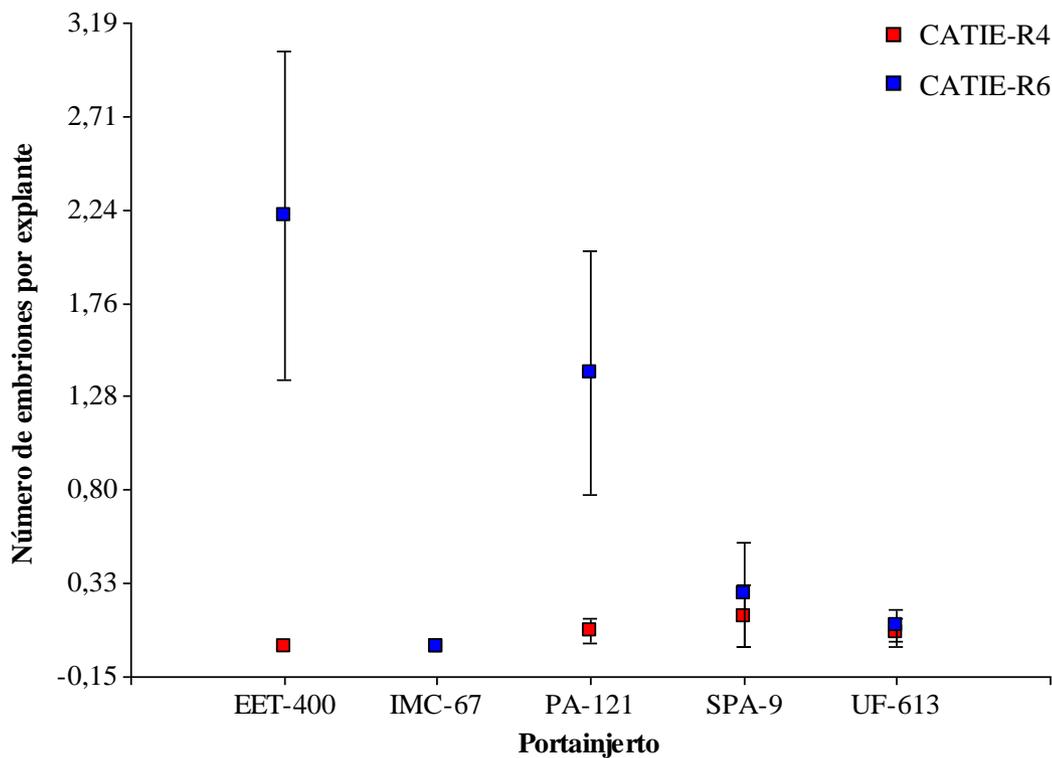
Se determinó que existe una interacción altamente significativa entre los clones y los portainjertos ( $p < 0,0001$ ) y entre los portainjertos y los protocolos ( $p = 0,0034$ ) con un nivel de significancia del 5%, por lo que se determinó como la mejor opción el clon CATIE-R6 injertado sobre EET-400 y sobre PA-121, en las que se registró un promedio de embriones por explante de 2,20 y 1,40 en comparación con el uso de pétalos en que el promedio fue de 0,0 y 0,1, respectivamente. No hubo diferencias significativas entre los tipos de explante para el CATIE-R4 (Figura 13).



### Clon / Portainjerto

<sup>1/</sup>NT: Nestlé, PSU: Penn State University, Pét: pétalo; Est: estaminoide.

**Figura 12.** Número promedio de embriones somáticos formados por explante en dos clones de cacao injertados sobre cinco portainjertos, utilizando dos tipos de explantes y dos protocolos.

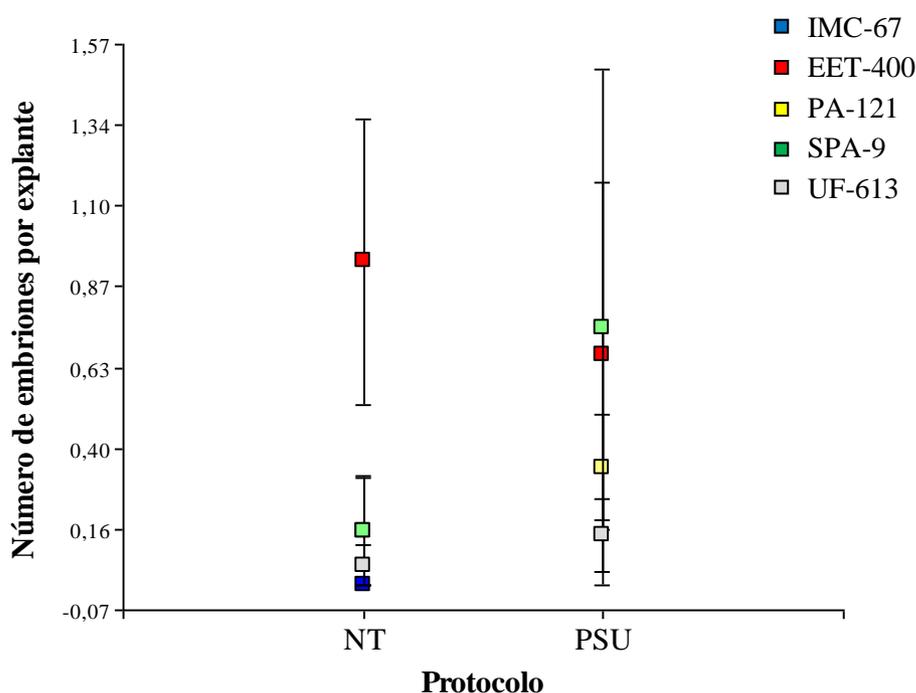


**Figura 13.** Número promedio de embriones somáticos formados por explante de acuerdo con la combinación clon-portainjerto.

Se determinó un efecto significativo del protocolo sobre el portainjerto, siendo la mejor opción para la obtención de un mayor número de embriones somáticos en el protocolo NT el portainjerto EET-400, mientras que con el protocolo PSU no se observaron diferencias significativas entre los diferentes portainjertos (Figura 14).

A pesar de que existe poca evidencia del efecto del patrón sobre la respuesta embriónica, Solano (2008) encontró que este factor tiene una interacción altamente significativa con factores como el medio de cultivo y el tipo de explante, encontrando que la combinación que dio mejor resultado para los clones CATIE-R4 y CATIE-R6 fue el portainjerto UF-613, protocolo PSU y explante estaminoide.

Este es el único reporte previo sobre la influencia del patrón en la embriogénesis somática de cacao, no obstante, se ha comprobado en otras especies que el patrón o portainjerto tiene algún efecto sobre algunas características de las frutas de aguacate, así como en el vigor de algunas variedades en combinación con otras, y cuyo efecto depende en conjunto de factores adicionales como el sitio, suelo, riego, fertilización y prácticas de manejo en general (Ayala-Arreola *et al.* 2010).



**Figura 14.** Número promedio de embriones somáticos formados por explante de acuerdo con la combinación portainjerto-protocolo.

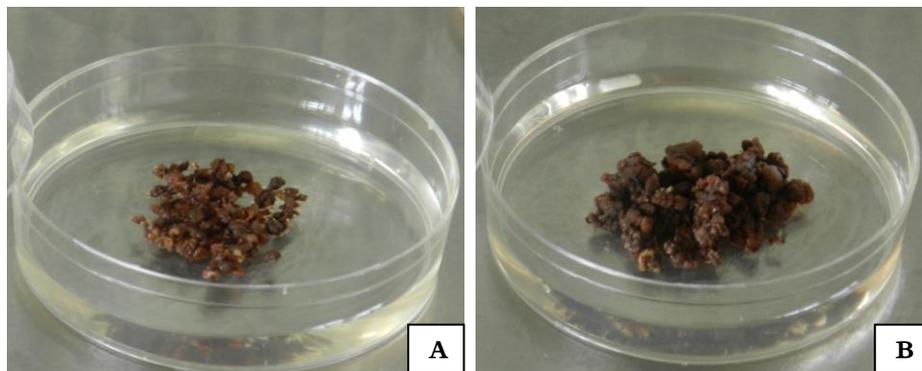
De igual forma, algunos estudios realizados en el CATIE sobre el efecto del patrón de cacao en la compatibilidad con los clones, se ha determinado que existen algunas

combinaciones patrón-injerto que favorecen más que otras la tasa de prendimiento de los injertos. Además, se ha observado que el patrón también tiene influencia sobre el vigor de los árboles y la producción, lo cual demuestra que el patrón tiene un efecto sobre la planta injertada, que va más allá de brindarle anclaje y adaptación a las condiciones del suelo (Pang 2004).

#### 4.4 Embriogénesis somática secundaria

Este procedimiento permite aumentar de manera significativa la cantidad de embriones somáticos, pues Maximova *et al.* (2002), aseguran que tiene el potencial de incrementar la producción de embriones hasta 30 veces con respecto a la embriogénesis primaria y además de reducir significativamente los costos. Otra de las ventajas que ofrece la embriogénesis somática secundaria es la uniformidad en la producción de embriones, así como la reducción del tiempo en el desarrollo de los mismos y el mejoramiento de la morfología de los embriones (Maximova *et al.* 2002; Solano 2008).

Un mes después del cultivo, se observaron cambios en la coloración del material colocado en el medio, pues éste tomó un color café oscuro. La coloración se tornó cada vez más oscura y a los dos meses, al momento del cambio de medio, se notó el crecimiento en tamaño de los fragmentos de embriones, así como la formación de callo (Figura 15). Estos cambios se observaron principalmente en los cultivos de embriones medianos y grandes, pues en los embriones pequeños, únicamente se presentó oxidación del material pero no hubo formación de callo ni crecimiento de los fragmentos de embrión.



**Figura 15.** Fragmentos de embriones somáticos dos meses después del cultivo para la embriogénesis secundaria. A. Cultivo de CATIE-R1 en el medio de cultivo SCG-2. B. Cultivo de UF-273 T1 en el medio M21.

A pesar de que la embriogénesis somática secundaria se considera un procedimiento más rápido para la obtención de embriones, en este experimento, cuatro meses después del cultivo, no se han logrado obtener embriones en ninguno de los protocolos evaluados y con ninguno de los clones, sin embargo se espera que en poco tiempo se inicie la producción de embriones, ya que Maximova *et al.* (2002) reportan la obtención de embriones somáticos secundarios a partir de las 12,5 semanas después del iniciado el cultivo, mientras que Solano (2008) obtuvo embriones somáticos entre 105 y 111 días (15-16 semanas) después.

Debido a la lentitud de la respuesta y a los problemas de contaminación que se presentaron al inicio de la investigación, no fue posible desarrollar los experimentos utilizando medios líquidos como se planteó en el objetivo n°4, ni la aclimatación de plántulas planteada en el objetivo n°5, por lo que estos objetivos no se lograron cumplir.

La tasa de contaminación fue una de las mayores limitantes enfrentadas principalmente durante la fase de introducción de material vegetal del campo. De acuerdo con Leifert *et al.* (1991), cuando la esterilización de la superficie del explante no es adecuada, junto con el material, se pueden introducir en el medio de cultivo hongos, levaduras y bacterias.

En los casos en que se presentó contaminación de explantes y del medio de cultivo, fue posible identificar principalmente la presencia de hongos con micelios de rápido crecimiento, lo cual dificultó el rescate de explantes aparentemente asépticos al momento del primer cambio de medio, pues a pesar de su apariencia, al ser cultivados en un medio de cultivo nuevo, muchos de éstos igualmente se contaminaban.

A pesar de que con el mismo procedimiento de desinfección utilizado, Solano (2008) obtuvo en algunos casos, porcentajes de asepsia cercanos al 90%, también se presentó en algunos ensayos, porcentajes de entre un 62 y un 41%, lo cual atribuye a la procedencia del material y a las condiciones agroambientales al momento de la colecta de los botones florales.

La alta tasa de contaminación pudo ser favorecida por las condiciones propias del Jardín Clonal (T11), el cual está compuesto en su mayoría por árboles de gran vigor y con una gran cantidad de follaje, que unido a la alta densidad de siembra (2,5 m x 2,5 m), proveen condiciones de alta humedad y temperatura y poca entrada de luz solar, propicias para el desarrollo de microorganismos como hongos y bacterias, los cuales encuentran en las diferentes estructuras de las plantas, los hospederos ideales para su desarrollo. Al mismo tiempo, los explantes tomados de plantas sembradas en el campo en condiciones tropicales

como las del sitio de colecta, presentan mayor dificultad para ser esterilizadas e incluso en algunos casos, se tornan imposibles de obtener un cultivo aséptico (Leifert *et al.* 1991).

Por su parte, Chantásig (2004), reporta niveles de asepsia cercanos al 100% haciendo un lavado de los botones con agua no estéril, seguido de la inmersión en una solución de hipoclorito de sodio al 25% (v/v) durante 10 minutos y por último tres enjuagues con agua destilada estéril. Según sus resultados, este procedimiento resultó eficaz para la esterilización de explantes, a diferencia del utilizado en la presente investigación, el cual demostró no ser suficiente para las condiciones locales, por lo que es necesario aplicar una concentración mayor para aumentar el porcentaje de éxito.

## 5. CONCLUSIONES

1. Debido a altos índices de contaminación de los medios de cultivo y a que el procedimiento de desinfección utilizado probablemente no fue suficiente para lograr eliminar los contaminantes presentes en los explantes bajo estas condiciones ambientales, los niveles de asepsia en las condiciones *in vitro* no permitieron mayores tasas de éxito de la técnica.
2. La reactividad de los explantes se puede observar desde la segunda semana de cultivo. La formación de callo es indispensable para la formación de embriones somáticos, no obstante, la callogénesis no garantiza la obtención de embriones, pues muchos de los explantes con callo de cicatrización no presentaron capacidad embriogénica.
3. A pesar de que se puede dar la formación de diferentes tipos de callos, los callos blancos y de una consistencia dura no dieron origen a embriones somáticos, ya que estos se formaron a partir de callos color café y de consistencia más suave.
4. En todos los clones se dio la formación de callo, aunque se presentaron diferencias entre las combinaciones de factores, lo cual indica que existe algún grado de interacción entre los diferentes factores, pues para esta variable, en el protocolo NT reaccionó mejor el explante pétalo, mientras que en el PSU el estaminoide dio mejor resultado.
5. Existen diferencias en la capacidad embriogénica de los diferentes genotipos, siendo los más exitosos los clones CATIE-R1 y CATIE-R6, mientras que los clones CC-137 e ICS-95 T1 fueron los menos exitosos. No se obtuvieron embriones del clon ICS-95 T1, lo cual sugiere un bajo potencial para ser reproducido por medio de esta técnica.
6. Para todos los genotipos, la mayor cantidad de explantes con capacidad embriogénica se dio con el cultivo de estaminoides en el protocolo NT, mientras que con el protocolo PSU se presentó una tasa de éxito muy baja. No se obtuvo respuesta embriogénica de ningún genotipo utilizando pétalos en el protocolo PSU.

7. El promedio de embriones somáticos obtenidos de cada explante varió de manera significativa entre genotipos. Se obtuvo un promedio mayor en el clon CATIE-R1, seguido de los clones CATIE-R6 y UF-273 T1. Los clones con menor promedio de embriones por explante fueron el CATIE-R4 y el CC-137.
8. Aunque se encontraron diferencias significativas entre las interacciones clon-protocolo y clon-explante, la baja respuesta del protocolo PSU permite concluir que el protocolo más apropiado para reproducir estos genotipos mediante embriogénesis somática es el NT utilizando el explante estaminoide. Para los clones CATIE-R1 y CC-137, no se presentaron diferencias entre el cultivo de estaminoides y el de pétalos.
9. El portainjerto sobre el que está injertado un genotipo, interactúa de forma significativa con el clon y el protocolo en la respuesta embriogénica, siendo las combinaciones con mayor éxito el CATIE-R6 injertado sobre EET-400 y PA-121, mientras que no hubo diferencias entre los portainjertos para el CATIE-R4.
10. Los fragmentos de embriones somáticos que se utilizaron en la embriogénesis secundaria se tornaron de una coloración café oscuro. Los embriones grandes y medianos dieron origen a la formación de callo y crecimiento de los fragmentos, mientras tanto, no se observó ningún crecimiento en los fragmentos de embriones pequeños.
11. Debido a los problemas de contaminación y a la baja cantidad de embriones obtenidos, no fue posible evaluar el desarrollo de embriones en medios líquidos ni el comportamiento de plantas en condiciones de aclimatación como se había planteado.

## **6. RECOMENDACIONES**

1. Evaluar diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio y tiempos de exposición para incrementar la eficiencia de la desinfección de los explantes.
2. Estudiar el efecto de la época del año y de la fenología de la planta de cacao sobre la respuesta embriónica de los diferentes genotipos.
3. Evaluar la influencia del gelificante del medio de cultivo sobre la respuesta, con el fin de determinar la efectividad del utilizado en la presente investigación.
4. Aumentar el número de introducciones, para evitar el desbalance en el número de repeticiones de cada tratamiento y alcanzar mayor sustento estadístico de los resultados.
5. Continuar con los esfuerzos para evaluar el desarrollo de embriones y su conversión en plántulas en medios líquidos e inmersión temporal a partir de los embriones que se esperan obtener del proceso de embriogénesis somática secundaria que se encuentra en curso.
6. Aclimatar la mayor cantidad de plántulas posible, con el objetivo de contar con plantas de los genotipos de interés con crecimiento ortotrópico, las cuales podrían ser propagadas por medio de injertos y ramillas para reproducir esta condición y aprovechar las ventajas que esto significa.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar, M. 1990. Obtención de plantas de cacao (*Theobroma cacao* L.) a partir del microinjerto de embriones somáticos. Tesis M.Sc. Turrialba, CR. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. 131 p.
- \_\_\_\_\_; Villalobos, V; Vásquez, N. 1992. Production of cocoa plants (*Theobroma cacao* L.) via micrografting of somatic embryos. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 28:15-19.
- Ahmadi, A; Azadfar, D; Mofidabadi, A. 2010. Study of inter-generic hybridization possibility between *Salix aegyptica* and *Populus caspica* to achieve new hybrids. *International Journal of Plant Production* 4(2):143-147.
- Alemanno, L; Berthouly, M; Michaux-Ferriere, N. 1996. Histology of somatic embryogenesis from floral tissues cocoa. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* 46:187-194.
- \_\_\_\_\_; Berthouly, M; Michaux-Ferriere, N. 1997. A comparison between *Theobroma cacao* L. zygotic embryogenesis and somatic embryogenesis from floral explants. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 33:163-172.
- \_\_\_\_\_; Ramos, T; Gargadene, A; Andary, C; Ferriere, N. 2003. Localization and identification of phenolic compounds in *Theobroma cacao* L. somatic embryogenesis. *Annals of Botany* 92:613-623.
- Ayala-Arreola, J; Barrientos-Priego, AF; Colinas-León, MT; Sahagún-Castellanos, J; Reyes-Alemán, JC. 2010. Relaciones injerto-interinjerto y características anatómicas y fisiológicas de la hoja de cuatro genotipos de aguacate. *Revista Chapingo Serie Horticultura.* 16(2):147-154.
- Bartley, B.G.D. 2005. The genetic diversity of cacao and its utilization. London, UK. CABI Publishing. 341 p.
- Benega, R; Martínez, J; Daquinta, M; Arias, E; Hidalgo, M; González, MC; Isidró, M. 2000. Efecto del Thidiazurón sobre la formación de embriones y regeneración de plántulas en callos recalcitrantes de anteras en piña. *Cultivos Tropicales.* 21(3):47-50.
- Benson, EE. 2000. *In vitro* plant recalcitrance: an introduction. *In Vitro Cellular and Developmental Biology.* 36:141-148.
- Buah, JN. 2010. Callus induction and somatic embryogenesis in five cacao (*Theobroma cacao* L.) genotypes in Ghana. *Biotechnology.* 9(3):355-361.

- Canacacao 2008. Estadísticas Nacionales. Cacao de Costa Rica. (en línea) . San José, CR. Consultado 10 oct. 2011. Disponible en: <http://www.canacacao.org/estadisticas/nacionales/>
- CATIE (Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza, CR). 2011. Proyecto Cacao Centroamérica. Taller de Planificación, Monitoreo y Evaluación. Informe para las cooperativas y asociaciones de productores. (en línea). Consultado 7 ene. 2012. Disponible en: <http://orton.catie.ac.cr/repdoc/A6039E/A6039E.PDF>
- Chanatásig, C. 2004. Inducción de la embriogénesis somática en clones superiores de cacao (*Theobroma cacao* L.), con resistencia a enfermedades fungosas. Tesis M.Sc. Turrialba, CR. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. 86 p.
- Chatelet, P; Michaux-Ferriere, N; Dublin, P. 1992. Potentialities embryogenes du nacelle et du tegument interne de grains inmetures de cacaoyer (*Theobroma cacao* L.) C.R. Acad. Sci. París, FR. t. 315. Serie III. p. 55-62.
- Chatenet, M; Delage, C; Ripolles, M; Irely, M; Lockhart, B; Rott, P. 2001. Detection of sugarcane yellow leaf virus in quarantine and production of virus-free sugarcane by apical meristem culture. Plant Disease. 85(11):1177-1180.
- Cueto, J; Aguirre, J; Iracheta, L; Zamarripa, A; Oliveira, A; Grajales, M. 2007. El mejoramiento del cultivo de cacao (*Theobroma cacao* L.) en México. Tuxtla Chico, Chiapas. MX. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. 167 p. (Libro Técnico N°4).
- Deo, P; Tyagi, A; Taylos, M; Harding, R; Becker, D. 2010. Factors affecting somatic embryogenesis and transformation in modern plant breeding. The South Pacific Journal of Natural and Applied Sciences, 28:27-40.
- Díaz-López, A; Velásquez, R; Chirinos, M. 2009. Efecto del tamaño del botón floral sobre la inducción de embriones somáticos en cacao. Agronomía Trop. 59(4):481-489.
- Dodeman, V; Ducreux, G; Kreis, M. 1997. Zigotic embryogenesis versus somatic embryogenesis. Journal of Experimental Botany 48(313):1493-1509.
- Driver, JA; Kuniyuki, AH. 1984. *In vitro* propagation of Paradox walnut rootstock. HortScience 19: 507-509.
- Echeverri, J. 2006. El injerto en la producción de cacao orgánico. Manejo Integrado de Plagas y Agroecología. 78:101-105.

- End, MJ; Daymond, AJ; Hadley, P. 2010. Introduction. *In* Technical guidelines for the safe movement of cacao germplasm (Revised from the FAO/IPGRI Technical Guidelines No. 20). Montpellier, FR. Global Cacao Genetic Resources Network (CacaoNet) and Bioversity International. 75 p.
- Enríquez, G. 2004. Cacao orgánico. Guía para productores ecuatorianos. Quito, EC. Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias. 360 p. (Manual N°54).
- Esan, E. 1977. Tissue culture studies on cocoa (*Theobroma cacao* L.) A supplementation of current research. *In*: Proceedings of the 5<sup>th</sup> International Cocoa Research Conference, COPAL. Ibadan, NG. p. 116-125.
- Falconí, C; Yáñez, V; Oleas, A; Peralvo, D; Saavedra, L. 2007. Validación de biopesticidas para el control de la moniliasis y manejo sustentable del cacao fino y de aroma en el Ecuador. Escuela Politécnica del Ejército. Sangolquí, EC. 69 p.
- Fang, JY; Wetten A; Hadley, P. 2004. Cryopreservation of cocoa (*Theobroma cacao* L.) somatic embryos for long-term germplasm storage. *Plant Science*. 166:669-675.
- \_\_\_\_\_; Wetten, A; Adu-Gyamfi, R; Wilkinson, M; Rodríguez-Lopez, C. 2009. Use of secondary somatic embryos promotes genetic fidelity in cryopreservation of cocoa (*Theobroma cacao* L.). *Agricultural and Food Science*. 18:152-159.
- \_\_\_\_\_; Wetten, A. 2011. Importance of structural integrity of somatic embryos for long-term cryopreservation of cocoa (*Theobroma cacao* L.) germplasm. *African Journal of Agricultural Research*. 6(17):3954-3961.
- FEDECACAO (Federación Nacional de Cacaoteros) 2005. Fundamentos para la injertación del cacao. Federación Nacional de Cacaoteros. Gobernación de Cundinamarca. Bogotá, CO. 19 p.
- Figueira, A; Janick, J. 1993. Development of nucellar somatic embryo of *Theobroma cacao*. *Acta Hortic*. 336:231-236.
- Fischer, C; Neuhaus, G. 1996. Influence of auxin on the establishment of bilateral symmetry in monocots. *Plant J*. 9:659-669.
- García-González, R; Quiroz, K; Carrasco, B; Caligari, P. 2010. Plant tissue culture: Current status, opportunities and challenges. *Cien. Inv. Agr*. 37(3):5-30.
- Garzón, A; Paulin D. 2006. El desarrollo vegetativo de clones de cacao procedentes de embriogénesis somática. Resultados obtenidos en el Ecuador. *In*: Proceedings of the

15<sup>th</sup> International Cocoa Research Conference, COPAL; 9-10<sup>th</sup> Oct 2006, San José, CR. p. 59-65.

Gultinan, M; Maximova, S. 2000. Recent advances in the tissue culture of cocoa from somatic embryos to bent Wood gardens. *In: Proceedings of the International Workshop on New Technologies and Cacao Breeding*. Kota Kinabalu, MY. p. 157-162.

Halmagyi, A; Pinker, I. 2006. Plant regeneration from Rosa shoot tips cryopreserved by a combined droplet vitrification method. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 84:145–153.

Hartmann, H; Kester, D. 1990. Propagación de plantas. Principios y prácticas. Trad. A. Marino. 4 reimpression. México. Editorial CECSA. 693 p.

Issali, A; Traoré, A; Kohi, J; Koffi, E; Sangaré, A. 2008. Relationship between some Phenological Parameters and Somatic Embryogenesis in *Theobroma cacao* L. *J. Crop Sci. Biotech.* 11(1):23-30.

\_\_\_\_\_; Traoré, A; Konan, J; Mpika, J; Minyaka, E; Kohi, J; Sangaré, A. 2010. Relationship between five climatic parameters and somatic embryogenesis from sporophytic floral explants of *Theobroma cacao* L. *African Journal of Biotechnology* 9(40):6614-6625.

ICCO, 2012. August 2012. Quarterly Bulletin of Cocoa Statistics. (en línea). London, UK. Consultado 01 oct. 2012. Disponible en: <http://www.icco.org/about-us/icco-news/202-august-2012-quarterly-bulletin-of-cocoa-statistics.html>

Jiménez, V. 2005. Involvement of plant hormones and plant growth regulators on *in vitro* somatic embryogenesis. *Plant Growth Regulation* 47:91–110

Lambardi, M; Benelli, C; Carlo, A de; Fabbri, S; Grassi, S; Lynch, P. 2002. Medium- and long-term *in vitro* conservation of olive germplasm (*Olea europaea* L.). *Acta Horticulturae* 586:109-112.

Lakshmanan, P; Taji, A. 2000. Somatic embryogenesis in leguminous plants. *Plant Biol.* 2:136–148.

Leifert, C; Ritchie, J; Waites, W. 1991. Contaminants of Plant Tissue and Cell Culture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology.* 7:452-469.

León, J. 2000. Botánica de los cultivos tropicales. 3 ed. San José, CR. Editorial Agroamérica del IICA. 522 p.

- Li, Z; Traore, A; Maximova, S; Gultinan, M. 1998. Somatic embryogenesis and plant regeneration from floral explants of cacao (*Theobroma cacao* L.) using thidiazuron. In *Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant.* 34:293-299.
- Litz, R. 1986. Tissue culture with *Theobroma cacao*. In: Dimick, P. ed. Cacao Biotechnology Symposium Proceedings. Pennsylvania State University. Pennsylvania, US. P. 111-120.
- Lloyd, G; McCown's, B. 1981. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel *Kalmia latifolia* by use of shoot tip culture. *Proc. Int. Plant Prop. Soc.* 30:421-427.
- López-Baez, O; Bollon, H; Eskes, A; Pétiard, V. 1993. Embryogenese Somatique de cacaoyer (*Theobroma cacao*) a partir de pièces florales. *Compte-Rendus de L'Académie de Sciences.* 316:579-584.
- \_\_\_\_\_; Moreno-Martínez, J; Pacheco-Rodas, S. 2001. Avanzos en Propagación de Cacao - *Theobroma cacao* – por embriogénesis somática en México. In: Proceedings of the International Workshop on New Technologies and Cocoa Breeding. Kota Kinabalu, MY. p. 169-183.
- Liu, CM; Xu, ZH; Chua NH. 1993. Auxin polar transport is essential for the establishment of bilateral symmetry during early plant embryogenesis. *Plant Cell* 5: 621–630.
- Margara, J. 1988. Multiplicación vegetativo y cultivo *in vitro*. Los meristemos y la organogénesis. Trad. J. Mateo; P. Urbano. Madrid, ES. Ediciones Mundi-Prensa. 232 p
- Mata, A. 2006. Establecimiento de un sistema de propagación vegetativa de genotipos superiores de cacao (*Theobroma cacao* L.) por medio de ramillas en el CATIE. Informe de Trabajo Final de Graduación. Escuela de Biología. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Cartago, CR. 104 p.
- Maximova, S; Alemanno, L; Young, A; Ferreiere, N; Traore, A; Gultinan, M. 2002. Efficiency, genotypic variability and cellular origin of primary and secondary somatic embryogenesis of *Theobroma cacao* L. *In Vitro Cell. Dev. Biol.—Plant* 38:252–259.
- \_\_\_\_\_; Young, A; Pishak, S; Gultinan, M. 2008. Field performance of *Theobroma cacao* L. plants propagated via somatic embryogenesis. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant.* 44:487-493.
- \_\_\_\_\_; Young, A; Pishak, S; Miller, C; Traore A; Gultinan, M. 2005. Integrated system for propagation of *Theobroma cacao* L. In: Protocol for Somatic Embryogenesis in

- Woody Plants, Series: Forestry Sciences, Vol. 77, Jain, S. Mohan; Gupta, Pramod K. (Eds.) Springer, Dordrecht, The Netherlands, ISBN: 1-4020-2984-5.
- Mejía, L; Palencia, G. 2000. La poda del árbol de cacao. *In*: Mejía, L; Argüello, O. comps. Tecnología para el Mejoramiento del Sistema de Producción de Cacao. CORPOICA. Bucaramanga, CO. p. 92-95.
- Miller, C. 2009. An integrated *in vitro* and greenhouse orthotropic clonal propagation system for *Theobroma cacao* L. Ph.D. Thesis. Pennsylvania, US. The Pennsylvania State University. 136 p.
- Minyaka, E; Niemenak, N; Fotso; Sangare, A; Ndoumou, D. 2008. Effect of MgSO<sub>4</sub> and K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> on somatic embryo differentiation in *Theobroma cacao* L. Plant. Cell. Tiss. Organ. Cult. 94:149–160.
- Murashige, T; Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum. 15:473-497.
- Nestlé, 2009. Implementation of somatic embryogenesis as a propagation technique for cacao. (en línea). Tours, FR. Consultado 19 set 2011. Disponible en <http://www.docstoc.com/docs/49835985/Implementation-of-somatic-embryogenesis-as-a-propagation-technique-for>
- Oliveira, M de; Romano, E; Clemente, K; Penha, M; Andrade, B; Lima, F. 2005. Characterisation of the cacao *somatic embryogenesis receptor-like kinase (SERK)* gene expressed during somatic embryogenesis. Plant Science. 168:723-729.
- Omokolo, D; Tsala, G; Niemenak, N. 1997. Phenol content, acidic peroxidase and IAA-oxidase during somatic embryogenesis in *Theobroma cacao* L. Biologia Plantarum 39(3):337-347.
- Palacios, J; Monteiro, W. 2001. Mass multiplication on a semi-industrial scale of cocoa clones by rooted cuttings in Brazil. *In*: Proceedings of the International Workshop on New Technologies and Cocoa Breeding. INGENIC. Kota Kinabalu, MY. p. 178-184.
- Palencia, G. 2000. Propagación del árbol de cacao. *In*: Mejía, L; Argüello, O. comps. Tecnología para el Mejoramiento del Sistema de Producción de Cacao. CORPOICA. Bucaramanga, CO. p. 65-72.
- Palma, T. 1988. Estudio morfogenético de cacao (*Theobroma cacao* L.) empleando embriones haploides. Tesis Mag. Sc. Turrialba, CR. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. 110 p.

- Pang, J. 2004. Rootstock effects on cocoa in Sabah, Malaysia. *Expl. Agric.* 40:445-452.
- Pardomuan, L; Taylor, M. 2012. Indonesia's "Frankentrees" turn cocoa dream into nightmare. (en línea). Jakarta, ID. Consultado 22 dic. 2012. Disponible en <http://www.reuters.com/article/2012/10/15/us-cocoa-indonesia-idUSBRE89E1DA20121015>
- Pasternak, TP; Prinsen, E; Ayaydin, F; Miskolczi, P; Potters, G; Asard, H; Van Onckelen, HA; Dudits, D; Fehér, A. 2002. The role of auxin, pH, and stress in the activation of embryogenic cell division in leaf protoplast-derived cells of alfalfa. *Plant Physiol.* 129:1807–1819.
- Pence, V; Hasegawa, P; Janick, J. 1979. Asexual embryogenesis in *Theobroma cacao* L. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 104:145-148.
- Phillips-Mora, W; Arciniegas-Leal, A; Mata-Quirós, A; Motamayor-Arias, JC. 2012a. Catálogo de clones de cacao seleccionados por el CATIE para siembras comerciales. Turrialba, CR. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. 68 p. (Serie Técnica. Manual Técnico N°105).
- \_\_\_\_\_; Sánchez, A; Mata, A; Arciniegas, A; Castillo, J. 2012b. Strategy of multiplication and distribution of improved CATIE's varieties in Central America. (poster). 17<sup>th</sup> International Cocoa Research Conference, Lagos, NG.
- \_\_\_\_\_; Castillo, J; Arciniegas, A; Mata, A; Sánchez, A; Leandro, M; Astorga, C; Motamayor, J; Guyton, B; Seguine, E; Schnell, R. 2009. Overcoming the main limiting factors of cacao production in Central America through the use of improved clones developed at CATIE. *In: Proceedings of the 16<sup>th</sup> International Cocoa Research Conference, COPAL; 16-21<sup>th</sup> Nov 2009, Bali, ID.* p. 93-99.
- \_\_\_\_\_; Cerda, R. 2009. Catálogo Enfermedades del cacao en Centroamérica. Turrialba, CR. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. 24 p. (Serie Técnica. Manual técnico n°93).
- \_\_\_\_\_; Ortiz, C; Aime, C. 2006. Fifty years of frosty pod rot in Central America: Chronology of its spread and impact from Panama to Mexico. *In: Proceedings of the 15<sup>th</sup> International Cocoa Research Conference, COPAL; 9-10<sup>th</sup> Oct 2006, San José, CR.* p. 1039-1047.
- PSU (Pennsylvania State University, US). 2000. Cacao Tissue Culture. Protocol Book. (en línea). Pennsylvania, US. Consultado 1 set. 2011. Disponible en: [http://teca.fao.org/sites/default/files/technology\\_files/17\\_Cacao\\_Somatic\\_Embryo\\_Protocol.pdf](http://teca.fao.org/sites/default/files/technology_files/17_Cacao_Somatic_Embryo_Protocol.pdf)

- Quainoo, AK; Wetten, AC; Allainguillaume, J. 2008. The effectiveness of somatic embryogenesis in eliminating the cocoa swollen shoot virus from infected cocoa trees. *Journal of Virological Methods*. 149:91-96
- Reed, S. 2005. Embryo rescue. (en línea). *In: Plant Development and Biotechnology*. CRC Press LLC. p. 235-239. Consultado 21 feb. 2012. Disponible en: <http://ddr.nal.usda.gov/bitstream/10113/42085/1/IND44376954.pdf>
- Rojas, S; García, J; Alarcón, M. 2004. Propagación asexual de plantas. Conceptos básicos y experiencias con especies amazónicas. (en línea). Bogotá, CO. CORPOICA. Consultado 6 ene. 2012. Disponible en: <http://www.corpoica.org.co/SitioWeb/Archivos/Publicaciones/Propagacinasexualdeplantas.pdf>
- Rzepka-Plevnes, D; Kulpa, D; Wajda, A. 2009. Initiation of *in vitro* cultures of *Lycopersicon peruvianum* var. *humifusum*. *Journal of Food Agriculture & Environment*. 7:576-580.
- Sánchez, A. 2012. Renovación de cacaotales con materiales élite de cacao (*Theobroma cacao* L.) mediante injertación en campo para fortalecer sistemas agroforestales sostenibles. Tesis Lic. Turrialba, CR. Universidad Estatal a Distancia. 92 p.
- Sánchez-Chiang, N; Jiménez, V. 2010. Técnicas de conservación *in vitro* para el establecimiento de bancos de germoplasma en cultivos tropicales. *Agronomía Mesoamericana*. 21(1):193-205.
- Santos, L; Carvalho, E; Oliveira, D de; Machado, R; Aitken, M. 2006. Somatic embryogenesis: A promising alternative to accelerate cocoa breeding? *In: Proceedings of the 15<sup>th</sup> International Cocoa Research Conference, COPAL; 9-10<sup>th</sup> Oct 2006, San José, CR*. p. 635-639.
- Sharma, D; Kaur, R; Kumar, K. 1996. Embryo rescue in plants: a review. *Euphytica* 89(3):325-337.
- Solano, W. 2008. Embriogénesis somática de clones superiores de cacao (*Theobroma cacao* L.) obtenidos en el Programa de Mejoramiento Genético del CATIE. Tesis M.Sc. Turrialba, CR. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. 92 p.
- Somarriba, E; Astorga, C; Vásquez, N; Cerda, R; Orozco, L; Quesada, F. 2010a. Injertos y otras técnicas de propagación del cacao. Turrialba, CR. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. 47 p. (Serie Técnica. Materiales de Extensión N°4).
- \_\_\_\_\_; Cerda, R; Astorga, C; Quesada, F; Vásquez, N. 2010b. Reproducción sexual del Cacao. Turrialba, CR. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. 47 p. (Serie Técnica. Materiales de Extensión N°1).

- Sondahl, M; Lui, S; Bellato, C. 1993. Cacao somatic embryogenesis. *Acta Hort.* 336:245-248.
- Tan, CL; Furtek, DB. 2003. Development of an *in vitro* regeneration system for *Theobroma cacao* from mature tissues. *Plant Science* 164:407-412
- Thorpe, T. 2007. History of plant tissue culture. *Molecular Biotechnology* 37:169-180.
- Traore, A; Gultinan, M. 2006. Effects of carbon source and explant type on somatic embryogenesis of four cacao genotypes. *HortScience* 41(3):753-758.
- \_\_\_\_\_; Maximova, SN; Gultinan, M. 2003. Micropropagation of *Theobroma cacao* L, using somatic embryo-derived plants. *In vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 39:332-337.
- Valverde, M. 1989. Efecto del pH, la luz, la condición del medio y la concentración de sacarosa en la embriogénesis somática de cacao (*Theobroma cacao*) *in vitro*. Tesis Lic. Turrialba, CR. Universidad de Costa Rica. 102 p.
- Velásquez, R; Sandrea, Y; Betancourt, C; Mata, J; García, F. 2006. Embriogénesis somática en cultivares de cacao venezolanos. *Agronomía Trop.* 56(1): 61-74.
- Villalobos, V; Oliver, M; Thorpe, T; Yeung, E. 1985. Cytokinin-induced switch in development in excised cotyledons of *Pinus radiata* cultured *in vitro*. *Physiologia Plantarum* 61:483-489.
- WCF (World Cocoa Foundation, US). 2011. Economic Profile of the U.S. Chocolate Industry (en línea) Washington DC, US. Consultado 4 ene. 2012. Disponible en: [http://www.worldcocoafoundation.org/learn-about-cocoa/documents/Economic\\_Profile\\_of\\_the\\_US\\_Chocolate\\_Industry\\_2011.pdf](http://www.worldcocoafoundation.org/learn-about-cocoa/documents/Economic_Profile_of_the_US_Chocolate_Industry_2011.pdf)
- Williams, E; Maheswaran, G. 1986. Somatic embryogenesis: factors influencing coordinated behavior of cells as an embryogenic group. A review article. *Annals of Botany* 57:443-462.
- Zimmerman, J. 1993. Somatic Embryogenesis: A Model for Early Development in Higher Plants. *The Plant Cell* 5:1411-1423.

## 8. ANEXOS

**Anexo 1.** Formulación de los medios de cultivo de los protocolos Nestlé y Penn State University.

### NESTLÉ

- **MEDIO NT1**

	<b>1 Litro</b>
Macro A DKW (10X)	100,0 ml
Macro B DKW (10X)	100,0 ml
Micro DKW (100X)	10,0 ml
Vitaminas DKW (200X)	5,0 ml
Aminoácidos (1000X)	1,0 ml
2,4-D (1 mg/ml)	1,0 ml
Kinetina (1 mg/ml)	0,25 ml
Glucosa	30,0 g
pH 5,8	
Gellan Gum®	2,8 g

- **MEDIO NT2**

	<b>1 Litro</b>
Macro MS (20X)	50,0 ml
Micro DKW (100X)	10,0 ml
Vitaminas DKW (200X)	5,0 ml
Aminoácidos (1000X)	1,0 ml
Adenina (1 mg/ml)	0,25 ml
Glucosa	30,0 g
pH 5,6	
Gellan Gum®	2,8 g

- **MEDIO M21**

	<b>1 Litro</b>
Macro MS (20X)	50,0 ml
Micro DKW (100X)	10,0 ml
Vitaminas DKW (200X)	5,0 ml
Aminoácidos (1000X)	1,0 ml
2,4,5-T (1 mg/ml)	1,0 ml
Adenina (1 mg/ml)	0,25 ml
Glucosa	30,0 g
pH 5,6	
Gellan Gum®	2,8 g

## PENN STATE UNIVERSITY

- **MEDIO PCG (Primary Callus Growth Medium)**

	<b>1 Litro</b>
Macro A DKW (10X)	100,0 ml
Macro B DKW (10X)	100,0 ml
Micro DKW (10X)	10,0 ml
Vitaminas DKW (1000X)	1,0 ml
Glucosa	20,0 g
Glutamina	250,0 mg
myo-Inositol	100,0 mg
2,4-D (1 mg/ml)	2,0 ml
TDZ (0,2 mg/ml)	25,0 µl
pH 5,8	
Gellan Gum®	2,8 g

- **MEDIO SCG-1 (Secondary Callus Growth Medium)**

	<b>1 Litro</b>
Sales de Mc Cown's	2,3 g
Vitaminas B5 (1000X)	1,0 ml
Glucosa	20,0 g
Agua de coco	50,0 ml
2,4-D (1 mg/ml)	2,0 ml
Kinetina (1 mg/ml)	300,0 µl
pH 5,7	
Gellan Gum®	2,8 g

- **MEDIO ED (Embryo Development Medium)**

	<b>1 Litro</b>
Macro A DKW (10X)	100,0 ml
Macro B DKW (10X)	100,0 ml
Micro DKW (10X)	10,0 ml
Vitaminas DKW (1000X)	1,0 ml
Glucosa	1,0 g
Sacarosa	30,0 g
pH 5,7	
Gellan Gum®	2,8 g

- **MEDIO SCG-2 (Secondary Callus Growth Medium)**

	<b>1 Litro</b>
Sales de Mc Cown's	2,3 g
Vitaminas B5 (1000X)	1,0 ml
Glucosa	20,0 g
2,4-D (1 mg/ml)	2,0 ml
6-BA (1 mg/ml)	50,0 µl
pH 5,7	
Gellan Gum®	2,8 g

## Anexo 2.

Salida de InfoStat.

### Modelos lineales generalizados mixtos

#### Especificación del modelo en R

```
modelo.g12_Embriones_ML<-  
glm(Embriones~1+clon+protocolo+explante+clon:protocolo+clon:explante+protoc  
olo:explante+clon:protocolo:explante  
,family=myFamily  
,na.action=na.omit  
,offset=  
,data=R.data12)
```

#### Resultados para el modelo: modelo.g12\_Embriones\_ML

Variable dependiente: Embriones

#### General

Familia	Enlace	Convergencia	Escala
poisson	log	Alcanzada	1,00

#### Medidas de ajuste del modelo

N	AIC	BIC	logLik	Deviance
1000	5782,75	5920,17	-2863,37	5254,80

AIC y BIC menores implica mejor

#### Pruebas de hipótesis secuenciales para los efectos fijos

	Df	Deviance	Resid. Df	Resid. Dev	Pr(>Chi)
NULL			999	9157,72	
clon	6	789,06	993	8368,66	<0,0001
protocolo	1	1899,98	992	6468,68	<0,0001
explante	1	706,53	991	5762,15	<0,0001
clon:protocolo	6	31,16	985	5730,99	<0,0001
clon:explante	6	475,99	979	5255,00	<0,0001
protocolo:explante	1	0,20	978	5254,80	0,6564
clon:protocolo:explante	6	6,5E-08	972	5254,80	>0,9999

## Efectos fijos

	Estimate	Std. Error	z value	Pr(> z )
(Intercept)	1,97	0,05	36,06	<0,0001
clonCATIE-R4	-0,45	0,09	-5,10	<0,0001
clonCATIE-R6	0,11	0,07	1,63	0,1040
clonCC-137	-1,78	0,14	-12,93	<0,0001
clonICS-95 T1	-19,27	895,40	-0,02	0,9828
clonPMCT-58	-0,41	0,08	-4,98	<0,0001
clonUF-273 T1	-0,31	0,09	-3,51	0,0004
protocoloPSU	-19,27	817,38	-0,02	0,9812
explantepet	-0,25	0,09	-2,77	0,0055
clonCATIE-R4:protocoloPSU	0,45	950,75	4,7E-04	0,9996
clonCATIE-R6:protocoloPSU	-0,11	935,66	-1,2E-04	0,9999
clonCC-137:protocoloPSU	1,78	992,26	1,8E-03	0,9986
clonICS-95 T1:protocoloPSU..	19,27	1507,18	0,01	0,9898
clonPMCT-58:protocoloPSU	16,02	817,38	0,02	0,9844
clonUF-273 T1:protocoloPSU..	0,31	1091,32	2,8E-04	0,9998
clonCATIE-R4:explantepet	-18,58	522,80	-0,04	0,9717
clonCATIE-R6:explantepet	-19,14	541,59	-0,04	0,9718
clonCC-137:explantepet	-0,64	0,25	-2,54	0,0112
clonICS-95 T1:explantepet	0,25	1314,08	1,9E-04	0,9999
clonPMCT-58:explantepet	-4,06	0,59	-6,92	<0,0001
clonUF-273 T1:explantepet	-0,88	0,18	-4,94	<0,0001
protocoloPSU:explantepet	0,25	1055,24	2,3E-04	0,9998
clonCATIE-R4:protocoloPSU:..	18,58	1501,86	0,01	0,9901
clonCATIE-R6:protocoloPSU:..	19,14	1410,67	0,01	0,9892
clonCC-137:protocoloPSU:ex..	0,64	1512,94	4,2E-04	0,9997
clonICS-95 T1:protocoloPSU:..	-0,25	2137,09	-1,1E-04	0,9999
clonPMCT-58:protocoloPSU:e..	-11,54	1186,10	-0,01	0,9922
clonUF-273 T1:protocoloPSU:..	0,88	1495,89	5,9E-04	0,9995

## Medias ajustadas y errores estándares para clon

Inversa de la función de enlace con efecto aleatorio=0

LSD Fisher (Alfa=0.05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

clon	PredLin	E.E.	Media	E.E.	
PMCT-58	-5,05	135,40	0,01	0,87	A
CATIE-R1	-7,73	263,81	4,4E-04	0,12	A
UF-273 T1	-8,10	265,07	3,0E-04	0,08	A
CC-137	-8,78	271,05	1,5E-04	0,04	A
CATIE-R6	-12,46	234,05	3,9E-06	9,1E-04	A
CATIE-R4	-12,60	267,17	3,4E-06	9,0E-04	A
ICS-95 T1	-17,30	464,60	3,1E-08	1,4E-05	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p \leq 0.05$ )

## Medias ajustadas y errores estándares para protocolo

Inversa de la función de enlace con efecto aleatorio=0

LSD Fisher (Alfa=0.05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

protocolo	PredLin	E.E.	Media	E.E.	
NT	-4,39	108,17	0,01	1,35	A
PSU	-16,19	187,43	9,3E-08	1,7E-05	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p \leq 0.05$ )

### Medias ajustadas y errores estándares para explante

Inversa de la función de enlace con efecto aleatorio=0

LSD Fisher (Alfa=0.05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

explante	PredLin	E.E.	Media	E.E.	
est	-8,13	134,66	2,9E-04	0,04	A
pet	-12,44	169,40	3,9E-06	6,7E-04	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p \leq 0.05$ )

### Medias ajustadas y errores estándares para clon\*protocolo

Inversa de la función de enlace con efecto aleatorio=0

LSD Fisher (Alfa=0.05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

clon	protocolo	PredLin	E.E.	Media	E.E.	
CATIE-R1	NT	1,84	0,04	6,32	0,28	A
UF-273 T1	NT	1,10	0,08	3,00	0,23	A
CC-137	NT	-0,25	0,12	0,78	0,09	A
PMCT-58	NT	-0,60	0,29	0,55	0,16	A
CATIE-R6	NT	-7,61	270,79	5,0E-04	0,13	A
CATIE-R4	NT	-7,89	261,40	3,7E-04	0,10	A
PMCT-58	PSU	-9,50	270,79	7,5E-05	0,02	A
ICS-95 T1	NT	-17,30	657,04	3,1E-08	2,0E-05	A
CATIE-R4	PSU	-17,30	466,03	3,1E-08	1,4E-05	A
ICS-95 T1	PSU	-17,30	657,04	3,1E-08	2,0E-05	A
UF-273 T1	PSU	-17,30	530,14	3,1E-08	1,6E-05	A
CATIE-R6	PSU	-17,30	381,82	3,1E-08	1,2E-05	A
CC-137	PSU	-17,30	542,10	3,1E-08	1,7E-05	A
CATIE-R1	PSU	-17,30	527,62	3,1E-08	1,6E-05	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p \leq 0.05$ )

### Medias ajustadas y errores estándares para clon\*explante

Inversa de la función de enlace con efecto aleatorio=0

LSD Fisher (Alfa=0.05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

clon	explante	PredLin	E.E.	Media	E.E.	
PMCT-58	est	-0,07	0,17	0,93	0,16	A
CATIE-R6	est	-7,61	227,68	5,0E-04	0,11	A
CATIE-R1	est	-7,67	408,69	4,7E-04	0,19	A
CATIE-R1	pet	-7,79	333,69	4,1E-04	0,14	A
UF-273 T1	est	-7,82	361,55	4,0E-04	0,14	A
CATIE-R4	est	-7,89	242,80	3,7E-04	0,09	A
UF-273 T1	pet	-8,38	387,72	2,3E-04	0,09	A
CC-137	est	-8,56	281,28	1,9E-04	0,05	A
CC-137	pet	-9,00	463,41	1,2E-04	0,06	A
PMCT-58	pet	-10,03	270,79	4,4E-05	0,01	A
ICS-95 T1	pet	-17,30	680,10	3,1E-08	2,1E-05	A
ICS-95 T1	est	-17,30	633,14	3,1E-08	1,9E-05	A
CATIE-R6	pet	-17,30	409,00	3,1E-08	1,3E-05	A
CATIE-R4	pet	-17,30	475,99	3,1E-08	1,5E-05	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p \leq 0.05$ )

**Medias ajustadas y errores estándares para protocolo\*explante**

*Inversa de la función de enlace con efecto aleatorio=0*

*LSD Fisher (Alfa=0.05)*

*Procedimiento de corrección de p-valores: No*

protocolo	explante	PredLin	E.E.	Media	E.E.	
NT	est	-1,19	127,91	0,30	38,93	A
NT	pet	-7,58	174,48	5,1E-04	0,09	A
PSU	est	-15,07	237,00	2,8E-07	6,7E-05	A
PSU	pet	-17,30	290,42	3,1E-08	8,9E-06	A

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p<= 0.05)*

**Medias ajustadas y errores estándares para clon\*protocolo\*explante**

*Inversa de la función de enlace con efecto aleatorio=0*

*LSD Fisher (Alfa=0.05)*

*Procedimiento de corrección de p-valores: No*

clon	protocolo	explante	PredLin	E.E.	Media	E.E.	
CATIE-R6	NT	est	2,08	0,04	8,02	0,36	A
CATIE-R1	NT	est	1,97	0,05	7,15	0,39	A
CATIE-R1	NT	pet	1,72	0,07	5,59	0,39	A
UF-273 T1	NT	est	1,66	0,07	5,25	0,36	A
PMCT-58	NT	est	1,56	0,06	4,75	0,29	A
CATIE-R4	NT	est	1,52	0,07	4,57	0,32	A
UF-273 T1	NT	pet	0,54	0,14	1,71	0,23	A
CC-137	NT	est	0,19	0,13	1,21	0,15	A
CC-137	NT	pet	-0,69	0,20	0,50	0,10	A
PMCT-58	PSU	est	-1,69	0,33	0,18	0,06	A
PMCT-58	NT	pet	-2,75	0,58	0,06	0,04	A
CATIE-R1	PSU	pet	-17,30	667,39	3,1E-08	2,0E-05	A
ICS-95 T1	NT	pet	-17,30	961,81	3,1E-08	2,9E-05	A
ICS-95 T1	PSU	est	-17,30	895,40	3,1E-08	2,7E-05	A
UF-273 T1	PSU	est	-17,30	723,10	3,1E-08	2,2E-05	A
CC-137	PSU	est	-17,30	562,56	3,1E-08	1,7E-05	A
CATIE-R6	PSU	pet	-17,30	613,04	3,1E-08	1,9E-05	A
CATIE-R4	PSU	est	-17,30	485,60	3,1E-08	1,5E-05	A
PMCT-58	PSU	pet	-17,30	541,59	3,1E-08	1,7E-05	A
CATIE-R4	NT	pet	-17,30	522,80	3,1E-08	1,6E-05	A
CATIE-R4	PSU	pet	-17,30	795,58	3,1E-08	2,4E-05	A
CATIE-R6	NT	pet	-17,30	541,59	3,1E-08	1,7E-05	A
ICS-95 T1	NT	est	-17,30	895,40	3,1E-08	2,7E-05	A
UF-273 T1	PSU	pet	-17,30	775,44	3,1E-08	2,4E-05	A
CATIE-R6	PSU	est	-17,30	455,35	3,1E-08	1,4E-05	A
CC-137	PSU	pet	-17,30	926,82	3,1E-08	2,8E-05	A
ICS-95 T1	PSU	pet	-17,30	961,81	3,1E-08	2,9E-05	A
CATIE-R1	PSU	est	-17,30	817,38	3,1E-08	2,5E-05	A

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p<= 0.05)*

## Modelos lineales generalizados mixtos

### Especificación del modelo en R

```
modelo.g14_Embriones_ML<-glm(Embriones~1+clon+explante+clon:explante  
,family=myFamily  
,na.action=na.omit  
,offset=  
,data=R.data14)
```

### Resultados para el modelo: modelo.g14\_Embriones\_ML

Variable dependiente: Embriones

#### General

Familia	Enlace	Convergencia	Escala
poisson	log	Alcanzada	1,00

#### Medidas de ajuste del modelo

N	AIC	BIC	logLik	Deviance
582	5680,64	5741,77	-2826,32	5184,75

AIC y BIC menores implica mejor

#### Pruebas de hipótesis secuenciales para los efectos fijos

	Df	Deviance	Resid. Df	Resid. Dev	Pr(>Chi)
NULL			581	7114,49	
clon	6	757,77	575	6356,72	<0,0001
explante	1	698,96	574	5657,76	<0,0001
clon:explante	6	473,01	568	5184,75	<0,0001

#### Efectos fijos

	Estimate	Std. Error	z value	Pr(> z )
(Intercept)	1,97	0,05	36,06	<0,0001
clonCATIE-R4	-0,45	0,09	-5,10	<0,0001
clonCATIE-R6	0,11	0,07	1,63	0,1040
clonCC-137	-1,78	0,14	-12,93	<0,0001
clonICS-95 T1	-18,27	543,09	-0,03	0,9732
clonPMCT-58	-0,41	0,08	-4,98	<0,0001
clonUF-273 T1	-0,31	0,09	-3,51	0,0004
explantepet	-0,25	0,09	-2,77	0,0055
clonCATIE-R4:explantepet	-17,58	317,09	-0,06	0,9558
clonCATIE-R6:explantepet	-18,14	328,49	-0,06	0,9560
clonCC-137:explantepet	-0,64	0,25	-2,54	0,0112
clonICS-95 T1:explantepet	0,25	797,03	3,1E-04	0,9998
clonPMCT-58:explantepet	-4,06	0,59	-6,92	<0,0001
clonUF-273 T1:explantepet	-0,88	0,18	-4,94	<0,0001

### Medias ajustadas y errores estándares para clon

Inversa de la función de enlace con efecto aleatorio=0

LSD Fisher (Alfa=0.05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

clon	PredLin	E.E.	Media	E.E.	
CATIE-R1	1,84	0,04	6,32	0,28	A
UF-273 T1	1,10	0,08	3,00	0,23	A
CC-137	-0,25	0,12	0,78	0,09	A
PMCT-58	-0,60	0,29	0,55	0,16	A
CATIE-R6	-7,11	164,25	8,2E-04	0,13	A
CATIE-R4	-7,39	158,55	6,2E-04	0,10	A
ICS-95 T1	-16,30	398,52	8,3E-08	3,3E-05	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p \leq 0.05$ )

### Medias ajustadas y errores estándares para explante

Inversa de la función de enlace con efecto aleatorio=0

LSD Fisher (Alfa=0.05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

explante	PredLin	E.E.	Media	E.E.	
est	-1,05	77,58	0,35	27,24	A
pet	-7,16	105,83	7,8E-04	0,08	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p \leq 0.05$ )

### Medias ajustadas y errores estándares para clon\*explante

Inversa de la función de enlace con efecto aleatorio=0

LSD Fisher (Alfa=0.05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

clon	explante	PredLin	E.E.	Media	E.E.	
CATIE-R6	est	2,08	0,04	8,02	0,36	A
CATIE-R1	est	1,97	0,05	7,15	0,39	A
CATIE-R1	pet	1,72	0,07	5,59	0,39	A
UF-273 T1	est	1,66	0,07	5,25	0,36	A
PMCT-58	est	1,56	0,06	4,75	0,29	A
CATIE-R4	est	1,52	0,07	4,57	0,32	A
UF-273 T1	pet	0,54	0,14	1,71	0,23	A
CC-137	est	0,19	0,13	1,21	0,15	A
CC-137	pet	-0,69	0,20	0,50	0,10	A
PMCT-58	pet	-2,75	0,58	0,06	0,04	A
CATIE-R4	pet	-16,30	317,09	8,3E-08	2,6E-05	A
CATIE-R6	pet	-16,30	328,49	8,3E-08	2,7E-05	A
ICS-95 T1	pet	-16,30	583,37	8,3E-08	4,9E-05	A
ICS-95 T1	est	-16,30	543,09	8,3E-08	4,5E-05	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p \leq 0.05$ )

## Modelos lineales generalizados mixtos

### Especificación del modelo en R

```
modelo.g00_Embriones_ML<-
glm(Embriones~1+Clon+Portainjerto+Protocolo+Explante+Clon:Portainjerto+Clon:Protocolo+Clon:Explante+Portainjerto:Protocolo+Portainjerto:Explante+Protocolo:Explante+Clon:Portainjerto:Protocolo+Clon:Portainjerto:Explante+Clon:Protocolo:Explante+Portainjerto:Protocolo:Explante+Clon:Portainjerto:Protocolo:Explante
, family=myFamily
, na.action=na.omit
, offset=
, data=R.data00)
```

### Resultados para el modelo: modelo.g00\_Embriones\_ML

Variable dependiente: Embriones

#### General

Familia	Enlace	Convergencia	Escala
poisson	log	Alcanzada	1,00

#### Medidas de ajuste del modelo

N	AIC	BIC	logLik	Deviance
529	644,66	759,98	-295,33	511,98

AIC y BIC menores implica mejor

#### Pruebas de hipótesis secuenciales para los efectos fijos

	Df	Deviance	Resid. Df	Resid. Dev	Pr(>Chi)
NULL			528	1228,04	
Clon	1	141,54	527	1086,50	<0,0001
Portainjerto	4	206,05	523	880,46	<0,0001
Protocolo	1	10,68	522	869,78	0,0011
Explante	1	225,30	521	644,48	<0,0001
Clon:Portainjerto	4	60,96	517	583,53	<0,0001
Clon:Protocolo	1	8,55	516	574,97	0,0034
Clon:Explante	1	5,5E-07	515	574,97	0,9994
Portainjerto:Protocolo	3	62,99	512	511,98	<0,0001
Portainjerto:Explante	4	0,00	508	511,98	>0,9999
Protocolo:Explante	1	4,3E-09	507	511,98	0,9999
Clon:Portainjerto:Protocolo	0	0,00	507	511,98	
Clon:Portainjerto:Explante	2	8,3E-07	505	511,98	>0,9999
Clon:Protocolo:Explante	1	2,8E-07	504	511,98	0,9996
Portainj:Protocolo:Explante	2	2,7E-07	502	511,98	>0,9999
Clon:Portainj:Protoc:Explante	0	0,00	502	511,98	

#### Medias ajustadas y errores estándares para Clon

Inversa de la función de enlace con efecto aleatorio=0

LSD Fisher (Alfa=0,05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

Clon	PredLin	E.E.	Media	E.E.	
CATIE-R6	-14,97	1241,07	3,2E-07	3,9E-04	A
CATIE-R4	-19,76	1882,27	2,6E-09	5,0E-06	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p \leq 0,05$ )

### Medias ajustadas y errores estándares para Portainjerto

Inversa de la función de enlace con efecto aleatorio=0

LSD Fisher (Alfa=0,05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

Portainjerto	PredLin	E.E.	Media	E.E.	
SPA-9	9,63	2966,02	15190,81	45056313,44	A
UF-613	-15,44	1152,26	2,0E-07	2,3E-04	A
EET-400	-20,01	1881,36	2,1E-09	3,9E-06	A
PA-121	-29,84	2865,25	0,00	3,1E-10	A
IMC-67	-31,15	3347,25	0,00	1,0E-10	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p < 0,05$ )

### Medias ajustadas y errores estándares para Protocolo

Inversa de la función de enlace con efecto aleatorio=0

LSD Fisher (Alfa=0,05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

Protocolo	PredLin	E.E.	Media	E.E.	
PSU	-13,52	1979,31	1,3E-06	2,6E-03	A
NT	-21,20	1243,23	6,2E-10	7,7E-07	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p < 0,05$ )

### Medias ajustadas y errores estándares para Explante

Inversa de la función de enlace con efecto aleatorio=0

LSD Fisher (Alfa=0,05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

Explante	PredLin	E.E.	Media	E.E.	
est	-14,62	1363,33	4,5E-07	6,1E-04	A
pet	-20,10	1941,89	1,9E-09	3,6E-06	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p < 0,05$ )

### Medias ajustadas y errores estándares para Clon\*Portainjerto

Inversa de la función de enlace con efecto aleatorio=0

LSD Fisher (Alfa=0,05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

Clon	Portainjerto	PredLin	E.E.	Media	E.E.	
CATIE-R6	SPA-9	19,42	3699,13	270680949,59	1001283871125,12	A
CATIE-R4	SPA-9	-0,16	3194,67	0,85	2723,51	A
CATIE-R6	EET-400	-9,57	1542,37	7,0E-05	0,11	A
CATIE-R4	PA-121	-11,00	1328,60	1,7E-05	0,02	A
CATIE-R6	UF-613	-15,28	1534,40	2,3E-07	3,5E-04	A
CATIE-R4	UF-613	-15,60	1719,44	1,7E-07	2,9E-04	A
CATIE-R6	IMC-67	-20,71	2853,62	1,0E-09	2,9E-06	A
CATIE-R4	EET-400	-30,44	3323,73	0,00	2,0E-10	A
CATIE-R4	IMC-67	-41,58	5949,13	0,00	0,00	A
CATIE-R6	PA-121	-48,68	5248,16	0,00	0,00	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p < 0,05$ )

### Medias ajustadas y errores estándares para Clon\*Protocolo

Inversa de la función de enlace con efecto aleatorio=0

LSD Fisher (Alfa=0,05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

Clon	Protocolo	PredLin	E.E.	Media	E.E.	
CATIE-R6	PSU	-6,27	2113,59	1,9E-03	4,01	A
CATIE-R4	NT	-18,73	1395,86	7,4E-09	1,0E-05	A
CATIE-R4	PSU	-20,78	3366,33	9,4E-10	3,2E-06	A
CATIE-R6	NT	-23,66	1713,26	5,3E-11	9,0E-08	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p<= 0,05)

### Medias ajustadas y errores estándares para Clon\*Explante

Inversa de la función de enlace con efecto aleatorio=0

LSD Fisher (Alfa=0,05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

Clon	Explante	PredLin	E.E.	Media	E.E.	
CATIE-R6	est	-3,98	835,92	0,02	15,67	A
CATIE-R4	pet	-14,25	3342,38	6,5E-07	2,2E-03	A
CATIE-R4	est	-25,26	2365,83	1,1E-11	2,5E-08	A
CATIE-R6	pet	-25,96	2242,97	5,3E-12	1,2E-08	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p<= 0,05)

### Medias ajustadas y errores estándares para Portainjerto\*Protocolo

Inversa de la función de enlace con efecto aleatorio=0

LSD Fisher (Alfa=0,05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

Portainjerto	Protocolo	PredLin	E.E.	Media	E.E.	
SPA-9	PSU	34,63	5956,62	1099931060078870,00	6,55186595268025E18	A
EET-400	NT	-14,73	1358,61	4,0E-07	5,4E-04	A
UF-613	PSU	-15,28	1737,63	2,3E-07	4,0E-04	A
SPA-9	NT	-15,38	1348,97	2,1E-07	2,8E-04	A
UF-613	NT	-15,60	1513,77	1,7E-07	2,5E-04	A
EET-400	PSU	-25,28	3556,18	1,1E-11	3,7E-08	A
PA-121	PSU	-25,28	3093,89	1,1E-11	3,3E-08	A
IMC-67	NT	-25,87	3083,89	5,8E-12	1,8E-08	A
PA-121	NT	-34,40	3610,12	0,00	4,1E-12	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p<= 0,05)

### Medias ajustadas y errores estándares para Portainjerto\*Explante

Inversa de la función de enlace con efecto aleatorio=0

LSD Fisher (Alfa=0,05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

Portainjerto	Explante	PredLin	E.E.	Media	E.E.	
SPA-9	pet	9,98	5197,28	21504,43	111764593,49	A
SPA-9	est	9,28	1278,86	10730,84	13723284,81	A
PA-121	est	-10,11	1278,86	4,1E-05	0,05	A
UF-613	est	-10,58	1278,86	2,5E-05	0,03	A
EET-400	est	-19,71	1807,65	2,8E-09	5,0E-06	A
EET-400	pet	-20,30	3300,07	1,5E-09	5,0E-06	A
IMC-67	pet	-20,30	4536,63	1,5E-09	6,9E-06	A
UF-613	pet	-20,30	1917,12	1,5E-09	2,9E-06	A
IMC-67	est	-41,99	5337,26	0,00	0,00	A
PA-121	pet	-49,57	4966,01	0,00	0,00	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p<= 0,05)

**Medias ajustadas y errores estándares para Protocolo\*Explante**

Inversa de la función de enlace con efecto aleatorio=0

LSD Fisher (Alfa=0,05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

Protocolo	Explante	PredLin	E.E.	Media	E.E.	
PSU	est	-13,00	1459,34	2,3E-06	3,3E-03	A
PSU	pet	-14,05	3847,25	7,9E-07	3,1E-03	A
NT	est	-16,24	1395,89	8,9E-08	1,2E-04	A
NT	pet	-26,16	1565,90	4,4E-12	6,8E-09	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p<= 0,05)

**Medias ajustadas y errores estándares para Clon\*Portainjerto\*Protocolo**

Inversa de la función de enlace con efecto aleatorio=0

LSD Fisher (Alfa=0,05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

Clon	Portainjerto	Protocolo	PredLin	E.E.	Media	E.E.	
CATIE-R4	SPA-9	PSU	19,98	6012,55	477209219,75	2869243459008,67	A
CATIE-R6	EET-400	NT	-9,16	2006,45	1,0E-04	0,21	A
CATIE-R6	EET-400	PSU	-9,98	2343,02	4,6E-05	0,11	A
CATIE-R6	UF-613	PSU	-10,26	2006,45	3,5E-05	0,07	A
CATIE-R6	SPA-9	NT	-10,45	1373,72	2,9E-05	0,04	A
CATIE-R4	PA-121	NT	-10,70	2155,27	2,3E-05	0,05	A
CATIE-R4	UF-613	NT	-10,89	1942,73	1,9E-05	0,04	A
CATIE-R4	PA-121	PSU	-11,30	1554,19	1,2E-05	0,02	A
CATIE-R6	IMC-67	NT	-20,30	2400,89	1,5E-09	3,7E-06	A
CATIE-R4	UF-613	PSU	-20,30	2837,54	1,5E-09	4,3E-06	A
CATIE-R4	SPA-9	NT	-20,30	2322,01	1,5E-09	3,5E-06	A
CATIE-R6	UF-613	NT	-20,30	2322,01	1,5E-09	3,5E-06	A
CATIE-R4	EET-400	NT	-20,30	1832,33	1,5E-09	2,8E-06	A
CATIE-R4	IMC-67	NT	-31,44	5632,78	0,00	1,2E-10	A
CATIE-R6	PA-121	PSU	-39,25	5571,55	0,00	0,00	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p<= 0,05)

**Medias ajustadas y errores estándares para Clon\*Portainjerto\*Explante**

Inversa de la función de enlace con efecto aleatorio=0

LSD Fisher (Alfa=0,05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

Clon	Portainjerto	Explante	PredLin	E.E.	Media	E.E.	
CATIE-R6	SPA-9	est	28,86	3068,80	3407120753407,64	10455784776068600,00	A
CATIE-R6	SPA-9	pet	9,98	5146,02	21504,43	110662299,71	A
CATIE-R4	SPA-9	pet	9,98	6610,53	21504,43	142155738,85	A
CATIE-R6	EET-400	est	1,16	0,14	3,18	0,46	A
CATIE-R4	PA-121	est	-1,70	0,38	0,18	0,07	A
CATIE-R6	UF-613	est	-10,26	1586,23	3,5E-05	0,06	A
CATIE-R4	SPA-9	est	-10,30	1695,76	3,4E-05	0,06	A
CATIE-R4	UF-613	est	-10,89	2006,45	1,9E-05	0,04	A
CATIE-R6	PA-121	est	-18,51	2557,73	9,1E-09	2,3E-05	A
CATIE-R4	EET-400	pet	-20,30	5578,39	1,5E-09	8,5E-06	A
CATIE-R4	IMC-67	pet	-20,30	6542,00	1,5E-09	1,0E-05	A
CATIE-R6	IMC-67	pet	-20,30	4527,15	1,5E-09	6,9E-06	A
CATIE-R4	PA-121	pet	-20,30	2657,19	1,5E-09	4,0E-06	A
CATIE-R4	UF-613	pet	-20,30	2792,85	1,5E-09	4,3E-06	A
CATIE-R6	EET-400	pet	-20,30	3084,73	1,5E-09	4,7E-06	A
CATIE-R6	UF-613	pet	-20,30	2627,05	1,5E-09	4,0E-06	A
CATIE-R6	IMC-67	est	-21,12	3475,27	6,7E-10	2,3E-06	A
CATIE-R4	EET-400	est	-40,57	3615,29	0,00	0,00	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p<= 0,05)

**Medias ajustadas y errores estándares para Clon\*Protocolo\*Explante**

Inversa de la función de enlace con efecto aleatorio=0

LSD Fisher (Alfa=0,05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

Clon	Protocolo	Explante	PredLin	E.E.	Media	E.E.	
CATIE-R6	PSU	est	7,36	1410,64	1578,10	2226136,83	A
CATIE-R4	PSU	pet	-8,19	6534,26	2,8E-04	1,81	A
CATIE-R6	NT	est	-15,32	1654,56	2,2E-07	3,7E-04	A
CATIE-R4	NT	est	-17,15	2022,46	3,5E-08	7,2E-05	A
CATIE-R6	PSU	pet	-19,90	3867,67	2,3E-09	8,8E-06	A
CATIE-R4	NT	pet	-20,30	1664,02	1,5E-09	2,5E-06	A
CATIE-R6	NT	pet	-32,01	2470,80	0,00	3,1E-11	A
CATIE-R4	PSU	est	-33,37	3322,31	0,00	1,1E-11	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p<= 0,05)

**Medias ajustadas y errores estándares para Portainjerto\*Protocolo\*Explante**

Inversa de la función de enlace con efecto aleatorio=0

LSD Fisher (Alfa=0,05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

Portainjerto	Protocolo	Explante	PredLin	E.E.	Media	E.E.	
SPA-9	PSU	est	29,01	3068,80	3984506538256,88	12227668434682100,00	A
PA-121	PSU	est	-0,98	0,31	0,37	0,12	A
EET-400	NT	est	-9,16	1277,53	1,0E-04	0,13	A
UF-613	PSU	est	-10,26	2006,45	3,5E-05	0,07	A
SPA-9	NT	est	-10,45	1695,76	2,9E-05	0,05	A
UF-613	NT	est	-10,89	1586,23	1,9E-05	0,03	A
PA-121	NT	est	-19,23	2557,73	4,5E-09	1,1E-05	A
EET-400	PSU	pet	-20,30	6512,42	1,5E-09	9,9E-06	A
EET-400	NT	pet	-20,30	2398,16	1,5E-09	3,7E-06	A
IMC-67	NT	pet	-20,30	2718,47	1,5E-09	4,1E-06	A
SPA-9	NT	pet	-20,30	2098,39	1,5E-09	3,2E-06	A
UF-613	NT	pet	-20,30	2578,72	1,5E-09	3,9E-06	A
UF-613	PSU	pet	-20,30	2837,54	1,5E-09	4,3E-06	A
EET-400	PSU	est	-30,25	2859,03	0,00	2,1E-10	A
IMC-67	NT	est	-31,44	5181,78	0,00	1,1E-10	A
PA-121	NT	pet	-49,57	5701,40	0,00	0,00	A
PA-121	PSU	pet	-49,57	6187,78	0,00	0,00	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p<= 0,05)

**Medias ajustadas y errores estándares para Clon\*Portainjerto\*Protocolo\*Explante**

*Inversa de la función de enlace con efecto aleatorio=0*

*LSD Fisher (Alfa=0,05)*

*Procedimiento de corrección de p-valores: No*

Clon	Portainjerto	Protocolo	Explante	PredLin	E.E.	Media	E.E.
CATIE-R6	EET-400	NT	est	1,98	0,10	7,23	0,75 A
CATIE-R6	PA-121	PSU	est	0,34	0,22	1,40	0,31 A
CATIE-R6	EET-400	PSU	est	0,34	0,27	1,40	0,37 A
CATIE-R6	UF-613	PSU	est	-0,22	0,35	0,80	0,28 A
CATIE-R4	SPA-9	PSU	est	-0,29	0,33	0,75	0,25 A
CATIE-R6	SPA-9	NT	est	-0,60	0,24	0,55	0,13 A
CATIE-R4	PA-121	NT	est	-1,10	0,50	0,33	0,17 A
CATIE-R4	UF-613	NT	est	-1,48	0,45	0,23	0,10 A
CATIE-R4	PA-121	PSU	est	-2,30	0,58	0,10	0,06 A
CATIE-R4	EET-400	NT	pet	-20,30	2627,05	1,5E-09	4,0E-06 A
CATIE-R6	IMC-67	NT	est	-20,30	3475,27	1,5E-09	5,3E-06 A
CATIE-R4	IMC-67	NT	pet	-20,30	4310,54	1,5E-09	6,6E-06 A
CATIE-R4	UF-613	PSU	est	-20,30	4012,89	1,5E-09	6,1E-06 A
CATIE-R4	SPA-9	NT	est	-20,30	3391,51	1,5E-09	5,2E-06 A
CATIE-R6	UF-613	NT	est	-20,30	3172,47	1,5E-09	4,8E-06 A
CATIE-R6	IMC-67	NT	pet	-20,30	3313,54	1,5E-09	5,0E-06 A
CATIE-R6	SPA-9	NT	pet	-20,30	2747,44	1,5E-09	4,2E-06 A
CATIE-R4	PA-121	NT	pet	-20,30	4310,54	1,5E-09	6,6E-06 A
CATIE-R4	PA-121	PSU	pet	-20,30	3108,37	1,5E-09	4,7E-06 A
CATIE-R6	EET-400	PSU	pet	-20,30	4686,05	1,5E-09	7,1E-06 A
CATIE-R4	SPA-9	NT	pet	-20,30	3172,47	1,5E-09	4,8E-06 A
CATIE-R4	UF-613	PSU	pet	-20,30	4012,89	1,5E-09	6,1E-06 A
CATIE-R6	UF-613	NT	pet	-20,30	3391,51	1,5E-09	5,2E-06 A
CATIE-R4	UF-613	NT	pet	-20,30	3885,47	1,5E-09	5,9E-06 A
CATIE-R6	UF-613	PSU	pet	-20,30	4012,89	1,5E-09	6,1E-06 A
CATIE-R6	EET-400	NT	pet	-20,30	4012,89	1,5E-09	6,1E-06 A
CATIE-R4	EET-400	NT	est	-20,30	2555,07	1,5E-09	3,9E-06 A

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p<= 0,05)*