

CENTRO AGRONOMICO TROPICAL DE INVESTIGACION Y ENSEÑANZA
PROGRAMA DE ENSEÑANZA
AREA DE POSGRADO

CRIOCONSERVACION DE EMBRIONES CIGOTICOS Y SOMATICOS DE
CACAO (*Theobroma cacao* L)

Tesis sometida a la consideración del comité técnico académico del Programa de Estudios de Posgrado de ciencias Agrícolas y Recursos Naturales del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza, para optar al grado de

Magister Scientiae

Por

José Dolores Cisne Contreras

CATIE

Turrialba, Costa Rica

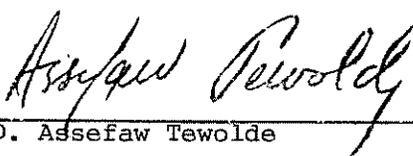
1992

Esta tesis ha sido aceptada, en su presente forma, por la coordinación del Programa de Estudios de Posgrado en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales Renovables del CATIE aprobada por el Comité Asesor del estudiante como requisito parcial para optar al grado de:

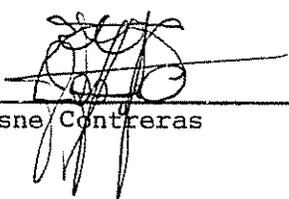
MAGISTER SCIENTIAE

FIRMANTES:


MSc. Ana Abdelnour Esquivel
Profesor Consejero


PhD. Assefaw Tewolde
Jefe, Area de Posgrado


PhD. Ramón Lastra
Director, Programa de Enseñanza


José Dolores Cisne Contreras
Candidato

A María de los Angeles Sandino, por su amor y apoyo.

A Denis y Andrea por la felicidad que me brindan.

A mis padres por el apoyo que con tanto esfuerzo me
brindaron para con mis estudios y preparación.

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar de muy buena voluntad mi agradecimiento a:

Ana Abdelnour Esquivel Mg. Sc., por sus enseñanzas, apoyo y orientación en la realización de este trabajo.

Magali Dufour Ph.D., por su apoyo y valiosa participación como miembro del comité asesor.

Jean Vincent Escalant Ph.D., por su participación como miembro del comité asesor.

Ramón Lastra. Ph.D. por su participación como miembro del comité asesor.

Victor Villalobos M. Ph.D, por su orientación en cuanto al tema de tesis.

A Nelly Vázquez Mg. Sc, por su colaboración en el estudio histológico.

Pedro Ferreira Ph.D., por su apoyo en el análisis estadístico.

Al personal del laboratorio de cultivo de tejidos del CATIE, por su colaboración y amistad.

Al personal de la biblioteca Orton por su colaboración en la obtención y reproducción de información bibliográfica.

A todos aquellos que de una u otra manera colocaron su granito de arena para concluir con este trabajo, que no es de uno sino de todos.

CONTENIDO

	Pg
DEDICATORIA.....	iii
AGRADECIMIENTOS.....	iv
LISTA DE FIGURAS.....	x
LISTA DE CUADROS.....	xiii
RESUMEN.....	xv
SUMMARY.....	xvii
I INTRODUCCION.....	1
II REVISION DE LITERATURA.....	4
2.1 Historia de la crioconservación de células tejidos y órganos vegetales.....	4
2.2 Importancia de la conservación de la diversidad biológica.....	6
2.3 Métodos de conservación de germoplasma.....	10
2.4 Conservación de germoplasma del recurso genético cacao, situación actual.....	12
2.5 Problemática de la conservación de especies tropicales con semilla recalcitrante.....	14
2.5.1 Factores que afectan la conservación de las semillas recalcitrantes a largo plazo...	15
2.5.2 Métodos de almacenamiento alternativos para la preservación de especies con semillas recalcitrantes.....	20

2.6	Principios y fundamentos de la crioconservación...	22
2.7	Embriogénesis somática.....	26
2.8	Cultivo de embriones cigóticos de cacao.....	29
2.9	Crioconservación de embriones cigóticos.....	30
2.10	Crioconservación de embriones somáticos.....	32
III MATERIALES Y METODOS.....		33
3.1	Localización del estudio.....	33
3.2	Origen y preparación del material vegetal estudiado.....	33
3.3	Contenido de agua en los embriones cigóticos inmaduros.....	35
3.4	Germinación <i>in vitro</i> en embriones cigóticos inmaduros en relación al contenido de agua.....	36
3.5	Efecto de la sacarosa y deshidratación sobre la capacidad germinativa <i>in vitro</i> de los embriones cigóticos inmaduros.....	37
3.6	Efecto de pretratamientos físicos y químicos sobre la viabilidad de los embriones cigóticos...	38
3.6.1	Deshidratación.....	38
3.6.2	Efecto del DMSO.....	38
3.6.3	Efecto de la sacarosa y DMSO en embriones cigóticos inmaduros sin congelar y congelados en nitrógeno líquido.....	39

3.6.4	Estudio del efecto de la deshidratación, tiempo de exposición a 5oC, concentración de DMSO y tiempo de incubación sobre la viabilidad de los embriones cigóticos congelados en nitrógeno líquido.....	39
3.7	Crioconservación de embriones cigóticos por inmersión directa en nitrógeno líquido	44
3.8	Efecto del tamaño del embrión en la formación de callo.....	46
3.9	Efecto de la temperatura de incubación.....	47
3.10	Efecto del pH	48
3.11	Congelamiento lento de embriones cigóticos.....	49
3.12	Estudio del efecto de sacarosa y ANA sobre la formación de callos en embriones cigóticos...	51
3.13	Congelamiento de embriones somáticos.....	52
3.14	Análisis Histológico.....	54
IV	RESULTADOS.....	56
4.1	Contenido de agua viabilidad y germinación in vitro en embriones cigóticos inmaduros de cacao...	56
4.2	Efecto de la sacarosa y deshidratación sobre la capacidad germinativa in vitro de los embriones cigóticos inmaduros.....	58
4.3	Efecto de pretratamientos físicos y químicos sobre la viabilidad de los embriones cigóticos sin congelar y congelados en nitrógeno líquido ...	59
4.3.1	Deshidratación.....	59

4.3.2	Efecto del DMSO sobre la viabilidad de embriones cigóticos inmaduros.....	60
4.3.3	Efecto de la combinación DMSO-sacarosa.....	61
4.3.4	Efecto de tiempo de deshidratación, tiempo de exposición a 5oC, concen- tración de DMSO y tiempo de incubación.....	62
4.4	Congelamiento por inmersión directa en NL.....	65
4.5	Tamaño del embrión en la formación de callo.....	68
4.6	Efecto de la temperatura de incubación.....	68
4.7	Efecto del pH del medio de cultivo.....	70
4.8	Congelamiento lento.....	71
4.9	Efecto de la sacarosa y el ácido naftalenacético sobre la formación de callo.....	73
4.10	Congelamiento de embriones somáticos.....	74
4.11	Estudio histológico.....	75
V	DISCUSION.....	77
5.1	Contenido de agua y efecto de la deshidratación en embriones cigóticos inmaduros.....	77
5.2	Efecto del DMSO y sacarosa sobre la viabilidad de los embriones cigóticos inmaduros	81
5.3	Efecto del tiempo de exposición de los embriones a 5oC.....	83

5.4 Crioconservación de embriones cigóticos inmaduros de cacao.....	84
5.5 Factores que afectan el desarrollo de callo a partir de embriones cigóticos congelados por inmersión directa en nitrógeno líquido.....	85
5.5.1 Efecto del tamaño de embrión.....	86
5.5.2 Temperatura de incubación.....	86
5.5.3 pH del medio de cultivo.....	87
5.6 Efecto de la sacarosa y ANA sobre la formación de callo en embriones cigóticos.....	87
5.7 Crioconservación de embriones somáticos.....	88
VI CONCLUSIONES.....	91
VII RECOMENDACIONES.....	93
VIII BIBLIOGRAFIA.....	94
IX APENDICES.....	110

LISTA DE FIGURAS

	Pg
Figura 1. Porcentaje de agua, germinación y viabilidad en embriones cigóticos inmaduros deshidratados en la cámara de transferencia.....	57
Figura 2. Porcentaje de germinación en embriones cigóticos inmaduros de cacao cultivados en cuatro concentraciones de sacarosa y cuatro períodos de deshidratación.....	58
Figura 3. Efecto de tres concentraciones de DMSO sobre la viabilidad de embriones cigóticos inmaduros de cacao.....	60
Figura 4. Efecto de la combinación sacarosa-DMSO sobre la viabilidad de embriones cigóticos inmaduros: a) viabilidad de embriones sin congelar; b) viabilidad de embriones congelados por inmersión directa en NL.....	61
Figura 5. Efectos principales e interacciones del DMSO, tiempo de incubación, deshidratación y tiempo de exposición a 50C.....	64
Figura 6. Efecto de la concentración de DMSO y tiempo de exposición a 50C sobre la viabilidad de embriones cigóticos inmaduros, e incubados por 1 hora.....	64
Figura 7. Viabilidad de embriones cigóticos en función de la concentración y tiempo de incubación en DMSO, con un tiempo de exposición a 50C por 30 minutos.....	65
Figura 8. Formación de callo en embriones cigóticos inmaduros subcultivados con altas concentraciones de sacarosas (3% a 21%) a intervalos de 2, 4 y 6 días.....	66

Figura 9. Relación entre el tamaño de embriones cigóticos inmaduros de cacao congelados en nitrógeno líquido y la formación de callo.....	69
Figura 10. Efecto de la temperatura de incubación sobre la formación de callo en embriones cigóticos inmaduros de cacao.....	69
Figura 11. Efecto del pH sobre la formación de callo en embriones cigóticos inmaduros de cacao congelados por inmersión directa en NL.....	70
Figura 12. Efecto de la sacarosa y el ácido naftalenoacético en la formación de callo en embriones cigóticos inmaduros criopreservados en NL.....	73
Figura 1D. Tamaño de embriones cigóticos inmaduros de cacao utilizados en los diferentes ensayos de criopreservación (8mm, 4mm y 2 mm).....	118
Figura 2D. Formación de callo en embriones cigóticos inmaduros de cacao criopreservados en nitrógeno líquido.....	118
Figura 3D. Formación de raíces en callos de embriones cigóticos inmaduros de cacao criopreservados en nitrógeno líquido.....	119
Figura 4D. Embriones somáticos de cacao obtenidos a partir de embriones cigóticos inmaduros de cacao criopreservados en nitrógeno líquido.....	119
Figura 5D. Embriones somáticos de cacao recuperados a través de germinación directa después de haber permanecido almacenados en nitrógeno líquido.....	120

Figura 6D. Corte longitudinal de un embrión cigóticos de 4mm precultivado por 3 días en un MS con 3% de sacarosa (4X).....	120
Figura 7D. Formación y desarrollo de los tejidos vasculares en un embrión inmaduro precultivado en altas concentraciones de sacarosa y sin congelar (20X).....	121
Figura 8D. Células de un embrión cigótico inmaduros precultivados en altas concentraciones de sacarosa y congelado en nitrógeno líquido, en el cual se puede observar que las células están turgentes sin ningún daños ocasionado por las ultrabajas temperaturas (40X).....	121
Figura 9D. Formación de callo a partir de las células de un embrión cigótico precultivado en altas concentraciones de sacarosa después de 2 semanas de haber sido descongelados (20X).....	122
Figura 10D. Corte longitudinal de un embrión cigótico inmaduro deshidratado en la cámara de transferencia por 12 horas (20X).....	122

LISTA DE CUADROS

	Pg
Cuadro 1.- Diseño experimental de superficie de respuesta "Face Centered Cube" con las variables independientes evaluadas.....	41
Cuadro 2.- Diseño experimental central compuesto y las variables independientes evaluadas.....	52
Cuadro 3.- Porcentaje de agua, germinación y viabilidad <i>in vitro</i> de embriones cigóticos inmaduros deshidratados en la cámara de transferencia.....	57
Cuadro 4.- Viabilidad de los embriones cigóticos inmaduros deshidratados al flujo de aire estéril.....	59
Cuadro 5.- Recuperación de embriones cigóticos inmaduros de cacao congelados por inmersión directa en NL.....	67
Cuadro 6.- Recuperación de embriones cigóticos inmaduros de cacao criopreservados por congelamiento lento.....	72
Cuadro 7.- Recuperación de embriones somáticos de cacao congelados por inmersión directa en NL y por congelamiento lento.....	75
Cuadro 1A. Análisis de varianza para la sobrevivencia, en forma de callo, de embriones precultivados en tres temperaturas de incubación y congelados por inmersión directa en NL.....	111
Cuadro 2A. Análisis de varianza para el porcentaje de embriones viables tratados con DMSO, tiempo de incubación, tiempo de exposición a 50C y deshidratación.....	111

Cuadro 3A. Análisis de varianza para la sobrevivencia de embriones, en forma de callo, precultivados en varias concentraciones de sacarosa y varios niveles de ANA en el medio de recuperación.....	112
Cuadro 4A. Análisis de varianza para la sobrevivencia de tres tamaños de embriones cigóticos inmaduros de cacao congelados por inmersión directa en NL.....	112
Cuadro 1B. Método de deshidratación e infiltración en parafina utilizado en el estudio histológico de los embriones cigóticos inmaduros.....	114
Cuadro 2B. Técnica de tinción utilizada para el análisis histológicos de los embriones cigóticos.....	115

Cisne, C. J. 1992. Crioconservación de embriones cigóticos y somáticos de cacao (*Theobroma cacao* L.). Tesis de Mg. Sc., Turrialba, Costa Rica, CATIE, 123 p.

Palabras claves: *Theobroma cacao* L., Crioconservación, precultivo, crioprotector, criotubos, embriogénesis somática, embriones cigóticos, dimetilsulfóxido (DMSO), callo, tasas de congelamiento, tasa de recuperación, conservación de germoplasma.

RESUMEN

El presente trabajo de investigación se llevó a cabo en el laboratorio de cultivo de tejidos vegetales de la Unidad de Biotecnología del Programa de Agricultura Sostenible, Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE), Turrialba, Costa Rica.

La crioconservación de los embriones cigóticos inmaduros y de los embriones somáticos de cacao (*Theobroma cacao* L.) en nitrógeno líquido se realizó a través de congelamiento rápido y congelamiento lento. El congelamiento lento, en el cual fueron evaluadas tasas de congelamiento entre 0.4°C/min y 1.0°C/min, se llevó a cabo en un congelador programable en el cual se inició el proceso de congelamiento de 5°C hasta -40°C, seguido por el almacenamiento de los embriones en nitrógeno líquido, en donde permanecieron 48 horas.

Para proteger los embriones contra el daño ocasionado por las ultrabajas temperaturas se estudio el efecto de una serie de factores físicos y químicos: Concentraciones de sacarosa en los medios de precultivo, niveles de prolina, efecto del ácido abscisico y deshidratación de los embriones en la cámara de transferencia.

El descongelamiento de los embriones se realizó mediante la inmersión de las muestras en agua a 40°C por 90 segundos, y posteriormente se colocaron en el medio de recuperación.

La respuesta de sobrevivencia de los embriones vario en dependencia del procedimiento de congelamiento utilizado. Sin embargo, las mayores tasas de recuperación se obtuvieron a través de la formación de callo.

La mayor formación de callo se obtuvo con embriones cigóticos inmaduros incubados y precultivados en medios nutritivos con altas concentraciones de sacarosa en congelamiento rápido.

La obtención de embriones somáticos a partir de los embriones cigóticos inmaduros congelados en nitrógeno líquido únicamente fue posible cuando éstos fueron incubados en un MS líquido con 1.0M de sacarosa y congelados a una tasa de 0.5°C/min y cuando fueron incubados en un MS líquido con 0.5M de sacarosa y congelados por inmersión directa en nitrógeno líquido.

La recuperación de los embriones somáticos congelados por inmersión directa en nitrógeno líquido y por congelamiento lento, a través de su germinación directa en el medio de recuperación, fue posible mediante la incubación de embriones somáticos de los genotipos EET-183 y POUND-12 en un medio MS líquido con altas concentraciones de sacarosa.

Cisne, C. J. 1992. Crioconservation of zygotic embryos and somatic embryos of cacao (*Theobroma cacao* L.). Mg. Sc. Thesis, Turrialba, Costa Rica, CATIE, 123 p.

KEY-WORDS: *Theobroma cacao* L., Crioconservation, pretreatment, crioprotector, cryotubes, somatic embryogenesis, zygotic embryos, dimethylsulfoxide (DMSO), callus, cooling rate, recovery rate, germplasm storage.

SUMMARY

The present study was carried out at the Tissue Culture Laboratory, Biotechnology Unit of The Sustaining Agriculture Program of CATIE at Turrialba, Costa Rica.

Cryoconservation of immature zygotic embryos of cacao (*Theobroma cacao* L.) in liquid nitrogen were experimented by the use of rapid freezing and programmed cooling from 5 °C to -40.0°C with cooling rates between 0.4°C/min and 1.0°C/min followed by immersion of samples in liquid nitrogen by 48 hours.

To protect the embryos against damage caused by the ultra-low temperatures, physical and chemical factors were investigated: increased sucrose concentrations proline and abscisic acid additions in the preculture medium and dehydration on the laminar flow hood.

Recovery varied according with the freezing procedure utilized. However, survival was through callus formation. Higher recovery values were obtained when zygotic embryos were pretreated with high sucrose concentration and frozen rapidly.

Formation of somatic embryos was observed on zygotic embryos pretreatment in a liquid medium MS with 1.0M of sucrose and freezing to slow rate (0.5°C/min). The germination of somatic embryos of the genotype EET-183 AND POUND-12 incubated in a liquid medium MS with sucrose and frozen by means rapid freezing and slow freezing was also observed.

I INTRODUCCION

El cacao (*Theobroma cacao* L.) es uno de los cultivos más importantes del trópico húmedo. Es fuente de materia prima para la industria mundial de chocolates y fuente de divisas para más de 40 países, los cuales en el ciclo 91-92 exportaron 2,504,000 toneladas de cacao en grano (Cubillos, 1990; ICCO, 1992).

En la actualidad, la superficie mundial que ocupa el cultivo de cacao alcanza los 4,728,000 hectáreas y es uno de los tres cultivos entre los cincuenta de mayor importancia a nivel mundial, que no es cultivado en los países desarrollados (FAO, 1990; Querol, 1988).

A pesar del papel que juega el cacao entre los pequeños y medianos productores y su importancia en la generación de divisas para los países en vía de desarrollo, son muy poco los logros alcanzados en la mejora del cultivo (IBPGR, 1979).

Esto debido a la estrecha base genética del cacao cultivado, la cual deriva de unos pocos materiales colectados en los años 40 y 50 (Withers, 1988).

Ante este problema, notables esfuerzos se han venido realizando para desarrollar métodos que den seguridad al germoplasma colectado y preservado (Lockwood, 1985; Allen y Lass, 1983). Sin embargo hasta ahora la colecta y conservación de cacao es un problema que no se ha resuelto satisfactoriamente.

La conservación de germoplasma de cacao a largo plazo únicamente es posible por medio de la formación de bancos vivos (IBPGR, 1983). Debido a que la semilla de cacao es

recalcitrante y no puede ser preservada en bancos de semillas mediante la utilización de los métodos convencionales (Roberts et al., 1984).

Los objetivos operacionales y de investigación de la conservación del recurso genético de cacao están dirigidos al desarrollo de una técnica que permita la conservación a largo plazo. Dos vías de conservación *in vitro* han sido propuestas: conservación a tasa mínima de crecimiento, para conservar el recurso genéticos a corto plazo y crioconservación, para conservarlo a largo plazo.

Existe alguna información sobre la crioconservación de embriones cigóticos de especies con semillas ortodoxas, y un número menor de trabajos realizados con semillas recalcitrantes y embriones somáticos (Bajaj, 1976).

Basado en los resultados obtenidos exitosamente en especies con semillas ortodoxas y algunas semillas recalcitrantes, se desarrollaron una serie de estudios sobre aspectos inherentes al material vegetal, así como estudios sobre factores físicos y químicos que afectan la viabilidad y recuperación de los embriones cigóticos y somáticos de cacao congelados en nitrógeno líquido.

En el presente trabajo se reporta los resultados de la crioconservación de embriones cigóticos y somáticos de cacao como un método para la conservación de germoplasma a largo plazo, en el que se estudió el contenido de agua de los embriones cigóticos inmaduros, los efectos de la deshidratación, del DMSO, de la sacarosa, del pH del medio de cultivo, de la temperatura de incubación y del tamaño y estado de desarrollo de los embriones crioconservados.

Finalmente es interesante apuntar que los resultados obtenidos mediante los estudios realizados demostraron el

potencial de la crioconservación tanto para los embriones cigóticos inmaduros, como para los embriones somáticos como una poderosa alternativa para la preservación a largo plazo del germoplasma de cacao , así como para otras especies tropicales que se caracterizan por poseer semilla recalcitrante.

II REVISION DE LITERATURA

2.1 HISTORIA DE LA CRIOCONSERVACION DE CELULAS TEJIDOS Y ORGANOS VEGETALES

La búsqueda de fundamentos científicos que explicasen el fenómeno por el cual muchos de los organismos biológicos sobreviven a temperaturas de congelamiento y los intentos por encontrar un aprovechamiento de éste, se remontan a más de dos siglos.

Meryman (1966), da cuenta de investigaciones al respecto a finales del siglo XII y comienzos del siglo XIII. No obstante, progresos significativos no se obtuvieron sino hasta mediado del presente siglo, cuando se descubrió el efecto protector de una serie de sustancias químicas como el glicerol, el DMSO (dimetilsulfóxido), el manitol, el sorbitol y la sacarosa contra los daños ocasionados por las bajas temperaturas (Polge *et al.*, 1949; Scherer y Hoogasian, 1954; Lovelock, 1954; Lovelock y Bishop, 1959; Quatrano, 1968).

La criopreservación de células, tejidos y órganos vegetales tienen sus raíces históricas en estudios realizados en la sobrevivencia de especies vegetales en condiciones de temperaturas bajo cero grado centígrado, en las zonas templadas, y en la búsqueda de materiales resistentes a las heladas.

La habilidad de recuperar tejidos vegetales después de exponerlos a ultrabajas temperaturas (-196°C , temperatura del nitrógeno líquido) fue reconocida por Sun (1958).

Estudios posteriores hechos por Sakai y colaboradores en la década de los 60 establecieron las relaciones entre el congelamiento y el descongelamiento.

En 1968, el estudio de la crioconservación de tejidos vegetales se orientó al sistema *in vitro* cuando Quatrano recuperó exitosamente una suspensión celular de Linum usitatissimum, después de exponerla a -58°C .

En 1971 Latta, reportó un comportamiento similar con células de Ipomoea sp.

Sin embargo no es hasta 1973 que se logró una verdadera crioconservación en nitrógeno líquido; la cual fue realizada por Nag y Street en células de zanahoria (Daucus carota). Ese mismo año Sakai y Sugawara lograron recuperar exitosamente callos de Populus euramericana almacenados en nitrógeno líquido.

Sakai y Noshira (1975) fueron los primeros en proponer la conservación de semillas recalcitrantes con un alto contenido de humedad a ultrabajas temperaturas.

Es así, que en estos últimos años las investigaciones en el área de crioconservación han estado centradas en el incremento de protocolos que ofrezcan altas tasas de sobrevivencia, y más recientemente se ha tomado mucho interés en el estudio bioquímico y fisiológico de los tejidos almacenados en nitrógeno líquido.

Estos aspectos son importantes para que la crioconservación tenga una amplia aceptación como herramienta de la biotecnología en la conservación de germoplasma a largo plazo.

2.2 IMPORTANCIA DE LA CONSERVACION DE LA DIVERSIDAD BIOLOGICA

La diversidad genética representa la suma total de diversidad acumulada a través de los años, por la selección natural y artificial (Mehta *et al.*, 1982).

La diversidad biológica natural es un recurso limitado y perecederos, que proporciona la materia prima o "genes", que debidamente utilizados y manipulados por la técnicas vegetales dan origen a las variedades mejoradas (Esquinas, 1983)

Estos genes sólo es posible encontrarlos en los cultivos locales y poblaciones naturales, que han sido seleccionadas a través de miles de años por la naturaleza y por los agricultores (Frankel, 1970; Esquinas, 1983).

La evolución de las especies vegetales antes de la aparición de la agricultura tenía como único control la selección natural, actuando sobre la variabilidad genética, producida por fenómenos como las mutaciones, migraciones y recombinaciones.

Con el inicio de la domesticación de las especies de mayor interés para el hombre, la selección natural actúa acompañada de la selección artificial. Ello trae como consecuencia que la ulterior evolución de estas especies esté al servicio de la "humanidad" (Esquinas, 1983).

El hombre ha agrupado las plantas en especies de manera arbitraria, para encontrar una lógica en el funcionamiento de la naturaleza y el uso más adecuado de ésta.

Cuando se habla de tipos de recursos genéticos estos son clasificados en función de diferentes parámetros: en base al uso (medicinal, alimenticia, industrial etc.); en base al nivel tecnológico aplicado (variedades primitivas, variedades modernas) o en base a la estabilidad de la diversidad genética de una región determinada (especies convencionales y especies no convencionales) (Querol, 1988).

Miles de años de selección realizada por los agricultores y la naturaleza, han producido variedades y genotipos locales adaptados a los distintos lugares y a prácticas culturales, que a su vez están determinadas por el clima y otros factores ambientales.

Un incremento continuo en la producción y calidad de los alimentos pasa necesariamente por la protección y eficaz utilización de los recursos fitogenéticos y ello exige una adecuada "conservación" de éstos (Mooney, 1979; Querol, 1988; Esquinas, 1983).

Las variedades tradicionales son a menudo capaces de soportar condiciones que dañarían seriamente muchas variedades modernas. Lo cual les confiere mayor estabilidad en la producción.

El valor potencial de la diversidad genética radica fundamentalmente en los genes que contienen, los cuales son la fuente de resistencia, calidad nutritiva, adaptabilidad así como genes desconocidos que pueden en un futuro ser considerados valiosos (Nieto *et al.*, 1984).

Las variedades primitivas y poblaciones silvestres han sido fuente de resistencia a plagas y enfermedades, de adaptación a ambientes difíciles y otros caracteres agronómicos (Ortíz, 1978).

Desde un punto de vista teórico, la importancia de la diversidad genética, se fundamenta en la relación selección/variación. Cuando mayor es la variación existente mayor es el margen de acción reservado a la selección natural (motor de la evolución) y a la selección artificial (motor del mejoramiento).

Son numerosos los trabajos en los que se mencionan la utilización de la diversidad genética en el mejoramiento de los cultivos. Falconer (1960) y Lerner (1958), reportan numerosos ejemplos en los cuales la diversidad genética es la base fundamental para el fitomejoramiento.

La importancia de la preservación de la diversidad biológica resalta ante todo, cuando en algunos momentos de la historia, por la no disponibilidad de germoplasma se ha puesto en peligro la sociedad y la economía de los países afectados. Así como en el caso contrario, en el cual la utilización de genes determinados han favorecido tanto a la agricultura como a la industria.

Esto nos debe llevar a reflexionar y comprender mejor la transcendencia del papel de la conservación de los recursos genéticos.

En la década de los cuarenta más de dos millones de irlandeses murieron por la ambruna ocasionada por el ataque del tizón al cultivo de la papa. Genes resistentes a esta enfermedad fueron encontrados en cultivares primitivos y poblaciones silvestres de los Andes (Hawkes, 1979)

En 1970, los maizales de los Estados Unidos sufrieron un ataque catastrófico de roya (H. maydis) con pérdidas de hasta el 50% para algunos estados. El daño, según se pudo comprobar se debió a la susceptibilidad que presentaban los híbridos a esta enfermedad (NAS, 1972)

La variación genética en la colza (Brassica napus) ha permitido la selección de variedades con bajo contenido de ácido erúxico para el consumo humano y otras con alto contenido para producir lubricantes (Querol, 1988).

El algodón Alcalá, colectado en México en 1906, después de pasar por un programa de selección es el principal algodón sembrado en California y uno de los más importantes en Río Grande, Texas y Nuevo México (Querol, 1988)

El algodón Egipcio colectado en el Nilo en 1903, dio origen a varias de las mejores variedades sembradas en Norte América (Poehlman, 1965)

Las variedades de trigo primitivas han sido la fuente de genes de resistencia, contra las razas de roya, para las variedades mejoradas, las cuales son altamente susceptibles.

El Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) ha colectado sistemáticamente ecotipos silvestres forrajeros en América Central para seleccionar aquellas que toleren los suelos ácidos (Querol, 1988.)

Utilizando variedades tradicionales y variedades modernas durante los últimos 40 años se han aumentado los rendimientos de los cultivos (Esquinas, 1983).

2.3 METODOS DE CONSERVACION DE GERMOPLASMA

De nada sirve coleccionar el germoplasma, si no podemos preservarlo en condiciones de conservaci3n indefinida.

Los m3todos de conservaci3n de germoplasma varian de acuerdo a la forma de reproducci3n y al per3odo de viabilidad de la semillas.

A) Especies de reproducci3n por semilla

La mayor parte de semillas en plantas cultivadas que se reproducen sexualmente, pueden ser inducidas a un aumento en su longevidad, disminuyendo la temperatura y la humedad de almacenamiento (Harrington, 1963).

Roberts (1973) acuñ3 el nombre de semillas ortodoxas, t3rmino que se utiliza para referirse a aquellas semillas que toleran una disminuci3n significativa en su contenido de agua y bajas temperaturas. El IBPGR (1976) aconseja que las semillas ortodoxas almacenadas a largo plazo, sean conservadas en recipientes cerrados al vac3o con un contenido de humedad interno de aproximadamente 6% y una temperatura de -18°C . Estas condiciones permiten conservar el material por per3odos de hasta un siglo y m3s (Robert y Ellis, 1977).

La viabilidad de las semillas recalcitrantes oscila entre una semana y varios meses. Este tipo de semilla no puede ser conservado bajo las condiciones en las cuales son almacenadas la semillas ortodoxas, debido que la exposici3n de estas a bajas temperaturas y deshidrataci3n, les provocan la muerte.

Aunque no existen m3todos para la conservaci3n de este tipo de semillas, se han realizados alguno tipos de estudios. Villiers (1975), recomienda conservar las semillas de especies recalcitrantes completamente imbebidas en agua a temperatura ambiente.

Sakai y Noshira (1975) fueron los primeros en proponer la conservación de las semillas recalcitrantes con un contenido de humedad relativamente alto pero a ultrabajas temperaturas (-196°C, temperatura del nitrógeno líquido).

Dado que la crioconservación, se encuentra aún en fase experimental las semillas recalcitrantes deberán conservarse en condiciones normales y rejuvenecerlas periódicamente (IBPGR, 1979).

B) Especies de reproducción vegetativa

Las especies que se reproducen vegetativamente, como el caso de la mayoría de los frutales, raíces y tubérculos y otros cultivos como la alcachofa, fresa, etc. presentan la característica de que la naturaleza y el agricultor han seleccionado a través de los siglos los genes y las combinaciones alélicas (más conveniente) en genotipos muy heterocigotos.

Algunas de las soluciones adoptadas para preservar estos materiales son las siguientes:

- Mantenimiento de colecciones en crecimiento vegetativo, como es el caso de arboretum, jardín botánico o reservas naturales.
- Mantenimiento de estaquillas, bulbos o tubérculos en condiciones húmedas y temperaturas controladas. Este sistema de almacenamiento es aplicable únicamente a corto plazo.
- Cultivo de tejidos (Henshaw y Grout 1977; Morel, 1975; IBPGR, 1980).

2.4 CONSERVACION DE GERMOPLASMA DEL RECURSO GENETICO CACAO, SITUACION ACTUAL

Bergmann (1969), estima que unos dos mil años antes del descubrimiento de América, los Mayas habían domesticado algunas variedades de cacao.

Con el inicio de la explotación del cacao por parte de los españoles fueron establecidas plantaciones de variedades criollas en Sur América y el Caribe y algunas variedades de forasteros, las que por hibridación natural dieron origen a los trinitarios (Purseglove, 1968).

La diversidad genética de cacao en los centros de origen y diversificación ha sido diezmada drásticamente. En los países Centro Americanos y México, los materiales criollos han sido sustituidos por híbridos o por otros cultivos, como el caso de Nicaragua, en el que las áreas cultivadas con cacao fueron sustituidas por café y algodón.

En Sur América aunque las poblaciones nativas continúan manteniendo en gran medida su pureza, el efecto de algunos factores como la aparición de la monilia y la presión de un mercado más exigente ha dado paso a que los agricultores comiencen a introducir híbridos o a sustituir el cacao por otros cultivos (Soria, 1975).

El Consejo Internacional de Recursos Genéticos para el cacao del IBPGR reporta, que la erosión genética sobre el germoplasma de cacao, en América Latina es muy severa. Sobre todo, que existe un gran peligro de extinción de los materiales criollos en Centro América, y ha la fecha materiales nativos de la zona del Amazona se han perdido.

El IBPGR (1979) estima que los principales bancos de germoplasma de cacao del mundo: Trinidad, Brazil, Ecuador, Costa Rica, Venezuela y Estados Unidos, no son representativos de la diversidad genética existente, por lo que se hace necesario coleccionar y conservar este recurso genético.

Los cacaos criollos que dieron origen a la primeras variedades cultivadas, son la prioridad número uno.

Las variedades silvestres, base importante para el mejoramiento genético, no están presentes en los bancos de germoplasma actuales (IBPGR, 1980).

La base genética del cacao cultivado es muy estrecha. La mayoría de los materiales utilizados por los agricultores provienen de cuatro genotipos coleccionados hace 40 o 50 años lo que ocasiona que éstos sean muy vulnerables. Es por ello que es importante esforzarse en coleccionar y preservar genotipos silvestres (Lockwood, 1985).

El germoplasma de cacao normalmente es coleccionado por baretas o semillas, los que se deterioran rápidamente (Roberts *et al.*, 1984)

Los factores que limitan la coleccion y preservación del germoplasma de cacao tienen implicancia sobre la relación banco de germoplasma usuario, dificultando el movimiento de los materiales (Withers, 1985).

La conservación de cacao en la actualidad se realiza únicamente mediante el establecimiento de plantaciones en el campo. Si bien es cierto que ésta tiene la ventaja de que las accesiones pueden ser utilizadas en cualquier momento, presenta la desventaja de que el germoplasma está expuesto a

las enfermedades y plagas. Otro inconveniente es el alto costo del mantenimiento de los bancos de germoplasma en el campo (IBPGR, 1983).

La conservación in vitro se ha venido considerando como una posible alternativa para la preservación del germoplasma de cacao. Sobre todo para la conformación de bancos de germoplasma activos.

La formación de bancos de germoplasma activos deberá realizarse preferiblemente con órganos o tejidos organizados como embriones, yemas etc., dado que este sistema permite obtener una mayor estabilidad genética del material preservado (Withers, 1985).

La experiencia parece indicarnos que la única posibilidad para la conservación de germoplasma de cacao a largo plazo es la criopreservación (conservación a -196°C en nitrógeno líquido) (Withers, 1985).

2.5 PROBLEMATICA DE LA CONSERVACION DE ESPECIES TROPICALES CON SEMILLAS RECALCITRANTES

Muchas especies acuáticas, arbóreas y frutales del trópico, incluyendo muchos cultivos perennes de gran importancia económica como cacao, café, palma aceitera, coco y caucho presentan semillas recalcitrantes (Roberts, 1975; Sykes, 1978; Wang 1974; Wang 1975)..

Un buen número de listas de semillas recalcitrantes han sido producidas, pero desafortunadamente mucho de éstas están incompletas, faltas de información de muchas especies.

Por otra parte, muchas semillas han sido reportadas como recalcitrantes por el hecho de morir cuando se deshidratan, aunque se ha comprobado que la muerte de las semillas se debe a un mal manejo en el proceso de conservación (IBPGR, 1979).

2.5.1 FACTORES QUE AFECTAN LA CONSERVACION DE LA SEMILLAS RECALCITRANTES A LARGO PLAZO

Los factores que contribuyen a la pérdida de viabilidad de las semillas recalcitrantes son varios: daño por deshidratación; daño ocasionados por las bajas temperaturas, asociados con el contenido de agua; contaminación microbial y germinación durante el período de almacenamiento.

A) Daños ocasionados por la deshidratación

El daño ocasionado por la desecación trae como consecuencia pérdida en la viabilidad de la semilla. Las respuestas de las semillas a éste factor varía de especie a especie, aunque ocasionalmente estas diferencias podrían presentarse en lotes de semillas de la misma especie.

Semillas de Borneo (Dryobalanops aromática) sufren daños cuando su contenido de agua alcanza valores por debajo del 35% (Tamari, 1976).

La semilla del rambután (Nephelium lappaceum) se daña con contenidos de humedad por debajo del 20%, (Chin, 1975).

Las semillas imbibidas de las diferentes especies varía mucho y esta variación aparentemente tiene relación con el punto en el que la desecación comienza a hacer daño en la viabilidad de la semilla (IBPGR, 1979).

El contenido de humedad en peso fresco de la semilla de palma aceitera (Elaeis guineensis) es de 20% a 25% (Hardon, 1974), en cacao (Theobroma cacao L.) el contenido de agua es del 55% (Swabrick, 1965) y la semilla del alcornoque (Quercus robur) tiene un contenido de humedad del 72%.

Esto hace necesario considerar cada especie de una manera independiente para determinar el contenido de agua óptimo en el cual la semilla no pierde su viabilidad.

Mientras que la diversidad de respuestas observadas en las diferentes especies pueden explicarse anatómicamente y fisiológicamente, parcialmente, las diferencias a nivel de un mismo cultivo son menos comprensibles (IBPGR, 1979).

B) Daños ocasionados por el frío

Hay mucha información en la literatura sobre un gran número de especies forestales y frutales del trópico, que sufren daños irreversibles cuando son expuestas a temperaturas inferiores en las que normalmente se desarrollan. Por ejemplo, las semillas del cacao (Theobroma cacao) mueren cuando son expuestas a temperaturas de 10°C o menores que éstas (Pyke, 1935; Borroughs y Hunter, 1961; Barton, 1965; Swabrick, 1965) y las semillas de mango (Mangifera indica L.) sufren daños entre los 3°C y los 6°C (Bajpai y Treved, 1961; Chacko y Singh, 1971).

Otras especies reportadas que sufren daño al ser expuestas al frío son el rambután (Chin, 1975); borneo camphor (Dryobalanops aromática Gaertn) (Jensen, 1971); Hopea helferi y Hopea odorata (Tang y Tamari, 1973); Shorea ovalis (Sasaki, 1976); palma aceitera (Elaeis guineensis var Deli) (Mok y Hor, 1977) y café (C. canephora) (Bouharmont, 1971).

Resultados obtenidos por Borroughs y Hunter (1963) en trabajos realizados con cacao demostraron que la pérdida de la viabilidad de la semilla con respecto a la disminución de la temperatura es abrupta. Ellos plantearon que la posible razón a esta respuesta se debe:

- Que las bajas temperaturas limitan la tasa de reacción, con lo cual se interrumpe la producción de metabolitos cuya carencia se vuelve letal.

- La ausencia de algunas sustancias protectoras presentes en las semillas que no son susceptibles al frío.
- La producción de algunas sustancias tóxicas que inducen cambios en la permeabilidad de la membrana.

Ibanez y Caso (1965), aducen que el daño de las bajas temperaturas en la semilla de cacao podían ser reversibles. Ellos opinan, que la muerte de la semilla se relaciona con un factor el cual si se destruye rápidamente con el calentamiento no ocasiona la muerte a la semilla.

Sin embargo, esta aparente reversibilidad está más bien asociada con el tiempo a que haya sido expuesta la semilla a las bajas temperaturas, pues aparentemente solo la región central del eje embrionario es la que sufre el daño ocasionado por las bajas temperaturas (IBPGR, 1979).

Boroughs y Labarca (1962), reportan que el uso de vitaminas, aminoácidos y ácidos nucleicos no confirieron ninguna protección contra el daño ocasionado por temperatura de 3°C sobre la semilla de cacao.

En la década de los 60 Ibanes, Caso y Redshow publicaron trabajos sobre bioquímica, respiración y enzimología de embriones y cotiledones de cacao, desafortunadamente, toda ésta documentación está inconclusa (IBPGR, 1979).

Simon et al. (1976) atribuyen la susceptibilidad a las bajas temperaturas de las semillas ortodoxas de Cucumis sativus y Vigna radiata a la desnaturalización de las proteínas. Este factor también puede que afecte a las semillas recalcitrantes.

Wolfe (1978) sugiere que durante el proceso de enfriamiento declina la fluidez de las membranas lipídicas, lo que da como resultados: cambios en el grosor de la membrana celular, cambios en la permeabilidad, en el campo eléctrico, concentración de cationes y en la cantidad de agua superficial de la membrana. Consecuentemente pueden ocurrir cambios en la actividad y constitución de las enzimas.

Boroughs y Hunter (1963) reportan la sobrevivencia de semillas de cacao a 2°C por 2 horas. Estos resultados pueden haber sido obtenidos de un experimento anómalo o de otra forma indicarían la existencia de genotipos que toleran condiciones de bajas temperaturas (IBPGR, 1979).

Cuando el contenido de agua de las semillas ortodoxas es muy alto, las bajas temperaturas ocasionan daños similares a los que se presentan en las semillas recalcitrantes (Fedosenko, 1974; Sakai y Noshira, 1975; Omura *et al.*, 1978).

Strushnoff y Junttila (1978) demostraron que las semillas ortodoxas de lechuga (*Lactuca sativa* L.) pueden tolerar temperaturas de hasta -196°C si su contenido de humedad esta entre 3% y 5%.

El daño de las bajas temperaturas en las semillas ortodoxas con alto contenido de agua están asociados con la formación de cristales de hielo (Roberts, 1972).

Al presente, los métodos de conservación a largo plazo utilizando bajas temperaturas son inapropiados para las semillas recalcitrantes. Aunque, es posible que adoptando la técnica de criopreservación de semillas o embriones, se pueda lograr desarrollar métodos de conservación a largo plazo (Roberts, 1973).

C) Contaminación microbial

El ataque de microorganismos, principalmente hongos, en las semillas almacenadas es una de las causas de la pérdida de viabilidad de las semillas recalcitrantes (Swabrick, 1965; Christensen, 1972).

Se ha comprobado que contenidos de agua en las semillas (10% a 13%) facilita la invasión de los hongos, lo que puede destruir rápidamente la viabilidad de las semillas en conservación. (Harrington, 1963; Roberts, 1972).

La proliferación de los microorganismos puede ser reducida mediante la utilización de bajas temperaturas, cerca de cero grado centígrado, más esto es inapropiado para la mayoría de las semillas recalcitrantes que no soportan las bajas temperaturas. Por otra parte, se ha observado que ciertos hongos como Penicillium spp. permanecen activos en temperaturas de 5°C (Christensen, 1972).

El efecto negativo de los hongos sobre la viabilidad de las semillas recalcitrantes, también ha sido contrarrestado mediante el uso del control químico. Así, Berg (1975), Bouharmont (1971) y Mungomery *et al.* (1967) reportan que la utilización del control químico ha sido efectivo para evitar la pérdida de viabilidad en las semillas recalcitrantes, como efecto del ataque de hongos.

D) Germinación durante el almacenamiento

Uno de los principales problemas de la conservación de las semillas recalcitrantes es que debido a su alto contenido de humedad germinan en almacenamiento (Gardener, 1937).

La dormancia natural de muchas especies de las zonas templadas facilitan la conservación, sin embargo grupo de semillas recalcitrantes con estas características es muy reducido (IBPGR, 1979).

La aparente ausencia de dormancia en las semillas recalcitrantes, sensitivas a las bajas temperaturas, indujeron a la tarea de desarrollar métodos alternativos para su almacenamiento.

Aunque, el uso de éstos, como es el caso de los inhibidores naturales han sido relativamente inapropiados (Kurokami et al., 1947).

E) Requerimientos de oxígeno

Una complicación más a considerar en la conservación de las semillas recalcitrantes es saber si la semilla por su alto contenido de agua requieren de una fuente de oxígeno.

Reed (1947) aconseja que semillas de Castanea mollissima deberían ser almacenadas en empaques herméticos.

Barton (1945) sugiere que la demanda en oxígeno de las semillas almacenadas no es muy alto y que ésta declina con el período de almacenamiento.

Por el contrario el IBPGR (1979) sugiere que el oxígeno es esencial para la semillas almacenadas con alto contenido de humedad.

2.5.2 METODOS DE ALMACENAMIENTO ALTERNATIVOS PARA LA PRESERVACION DE ESPECIES CON SEMILLAS RECALCITRANTE

Diferentes métodos de almacenamiento han sido desarrollados, pero en general los métodos más adecuados son aquellos que toman en cuenta los factores ya mencionados: desecación, control del ataque microbial, prevención de la germinación en almacenamiento y mantenimiento de una fuente de oxígeno. Por ejemplo las semillas de encino pueden ser almacenadas y evitar la deshidratación mediante regulares

cambios de agua (Toumey y Korstian, 1942); aunque el almacenamiento en turba, aserrín o arena húmeda han sido más exitosos (Korstian, 1930; Gardener, 1937).

Estos métodos han sido utilizados para numerosas especies con semillas recalcitrantes como Aleurites fordii (Large et al., 1947); caucho (Ang, 1976); Castanea spp (Jaynes, 1969); café (León, 1974); Citrus spp (Button et al., 1971); rambután (Chin, 1975); cacao (Evans, 1953). Pero estos procedimientos son aplicables sobre todo para periodos de almacenamiento muy cortos que van de uno a varios meses.

Hay numerosos trabajos que sustentan la hipótesis que recubriendo la semilla con un material impermeable se evita el daño por deshidratación.

Friend (1964) almacenó semillas de cacao recubriendo la mazorca con parafina y encontró que se duplicaba el período de almacenamiento. Por el contrario, Huxley (1964) encontró que los granos de café no mostraban ningún beneficio al ser conservados con sustancia impermeables.

El método más utilizado para el almacenamiento de las semillas recalcitrantes consiste en almacenarlas en bolsas de polietileno (IBPGR, 1979).

Es importante hacer notar que todos los métodos que han sido mencionados sólo pueden ser utilizados para periodos de conservación muy cortos. Estos métodos serían importantes en apoyo a la colecta de materiales con semillas recalcitrantes para la preservación del germoplasma a largo plazo. Además se ha comprobado que estos métodos no funcionan para especies como el cacao y el rambután (IBPGR, 1979).

2.6 PRINCIPIOS Y FUNDAMENTOS DE LA CRIOCONSERVACION

La crioconservación de plantas superiores, si bien se encuentra en un estado menos desarrollado que la del reino animal, ofrece técnicas muy promisorias para la conservación de germoplasma a largo plazo (Mroginski *et al.*, 1991).

Desde que Quatrano en 1968 informó acerca de la crioconservación de células de lino, numerosos trabajos han contribuido al progreso de esta técnica, que últimamente ha sido objeto de varias revisiones (Finkle y Ulrich, 1983; Kartha, 1981; Withers, 1980).

Diferentes tejidos y órganos (ápices, meristemos, anteras, embriones), así como suspensiones celulares, protoplastos y callos han sido conservados exitosamente en nitrógeno líquido.

La heterogeneidad del material vegetal obliga al empleo de diversas técnicas de crioconservación. Sin embargo se reconocen aspectos comunes, independientemente del tipo de explante utilizado. De acuerdo con Withers (1983), estos son: pretratamiento, crioprotección, congelamiento, almacenamiento, descongelamiento y pruebas de viabilidad y recuperación.

A) Pretratamiento

La viabilidad del material vegetal de un genotipo determinado puede incrementarse si su conservación en nitrógeno líquido se efectúa en el estado de desarrollo y fisiológico más adecuado. Por ejemplo, el estado globular de los embriones somáticos, la fase exponencial de las suspensiones celulares y el precultivo por 3 días en un medio de cultivo de los meristemos han mostrado muy buenos resultados (Withers, 1983).

El precultivo del material vegetal puede ser de utilidad para el éxito en la fase de congelamiento. El cultivo de ápices caulinares de Solanum goniocalyx en medios nutritivos previo al congelamiento mejoró el porcentaje de sobrevivencia (Grout y Henshaw 1978).

Las suspensiones celulares de Zea mays conservadas en nitrógeno líquido manifestaron mayor viabilidad cuando fueron cultivadas en un medio que contenía prolina (Withers y King, 1979). Un resultado semejante fue observado usando manitol en suspensiones celulares (Withers y Street, 1977).

La utilización de DMSO (dimetilsulfóxido) al 5%, incorporado al medio de cultivo en la fase de precultivo incrementaron la viabilidad de las suspensiones celulares de Atropa belladonna (Nag y Street, 1975), Catharanthus roseus (Karthä et al., 1982), fresa (Karthä et al., 1980) y meristemas de Pisum sativum (Karthä et al., 1979).

Por otra parte, la crioconservación de meristemas de Dianthus caryophyllus fue favorecida por el pretratamiento de los meristemas a 4°C durante 3 días (Seibert y Wetherbee, 1977).

B) Crioprotección

Son pocas las especies, de las plantas superiores, en las que sus tejidos logran sobrevivir cuando se les expone a ultrabajas temperaturas, sin que hayan recibido un tratamiento previo con crioprotectores químicos.

Para proteger el material vegetal de los daños ocasionados por el congelamiento y descongelamiento se ha utilizado el DMSO y el glicerol en diferentes concentraciones (5%-15% y 5%- 20% respectivamente). También se han utilizado diferentes niveles de azúcares y aminoácidos (Withers, 1980)

En los trabajos iniciales el DMSO y el glicerol fueron utilizados con éxito en el congelamiento de tejidos. Sin embargo, estudios recientes han demostrado que es más eficiente, la crioprotección de las células, mediante la utilización de una mezcla de varios crioprotectores, dado que una combinación de éstos reducen el riesgo de toxicidad sobre los tejidos.

Una combinación de DMSO (10%), glicerol (5%) y prolina (10%) fue utilizada exitosamente en maíz y zanahoria (Withers, 1980b)

Una mezcla de PGE (polietilenglicol) al 10%, glucosa al 8% y DMSO al 10% ha sido empleada exitosamente en caña de azúcar y arroz (Finkle y Ulrich, 1983).

C) Congelamiento

El éxito de la crioconservación de material vegetal depende en gran medida, de la acertada elección del procedimiento de congelación que se utilice (Mroginski *et al.*, 1991).

Congelamientos rápidos o lentos conllevan a aspectos críticos. Un congelamiento lento provoca una excesiva deshidratación y alta concentración de electrólitos, que afectan las células provocando la desnaturalización de las enzimas. Por otro lado, un congelamiento rápido resulta en la formación de cristales de hielo intracelular. Así mismo un descongelamiento lento resulta perjudicial por que se forman hielo intracelular por recristalización (Withers y Street, 1977).

El congelamiento rápido consiste en colocar el material vegetal directamente en nitrógeno líquido, condiciones bajo las cuales el descenso de la temperatura ocurre muy

rápidamente alcanzando tasas de disminución de -300 hasta $-1000^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Este procedimiento ha sido utilizado con éxito en muchas especies: meristemos de Arachis hypogea, Manihot esculenta y Solanum tuberosum; suspensiones celulares de Capsicum annum, Daucus Carota, Glycine max, Nicotiana tabacum, Oriza sativa, Sorghum bicolor y Zea mays; protoplasto de Daucus carota; callos de Medicago sativa y Saccharum sp. y embriones somáticos de Nicotiana tabacum (Nitzsche, 1983).

Por otro parte, durante el congelamiento lento, la tasa de enfriamiento oscila entre 0.1 y $3^{\circ}\text{C}/\text{min}$, lo que resulta en la formación de cristales de hielo extracelular produciendo una deshidratación protectora. Sin embargo una excesiva deshidratación puede exponer las células a una alta concentración interna de solutos, tal y como se mencionara anteriormente. Generalmente el material se congela lentamente a una velocidad adecuada, hasta que alcance una temperatura determinada, usualmente -40°C , temperatura en la que la mayor parte del agua ha sido congelada extracelularmente. Luego se sumerge en nitrógeno líquido (Mroginski *et al.*, 1991).

Un proceso intermedio, de los dos mencionados anteriormente, ha sido utilizado con menos frecuencia, y se denomina congelamiento escalonado. Bajo este procedimiento el material vegetal se somete cierto tiempo a varias temperaturas por debajo de 0°C y posteriormente se sumergen en nitrógeno líquido. (Nitzsche 1983).

D) Descongelamiento

Cualquiera que sea el procedimiento empleado para la congelación del material vegetal, su descongelamiento puede llevarse a cabo en forma rápida por medio de inmersión en agua a 40°C teniendo la precaución de agregar gradualmente el medio de cultivo para diluir la concentración de los crioprotectores y evitar la desplasmólisis celular (Mroginski *et al.*, 1991).

También puede aplicarse descongelamiento lento por simple exposición del material vegetal crioconservado a temperatura del laboratorio (Withers, 1979) o en una corriente de aire caliente (Seibert y Wetherbee, 1977).

E) Prueba de viabilidad y recultivo

La estimación de la viabilidad del material crioconservado puede hacerse de diferentes maneras.

Tratándose de meristemas, lo más recomendable es recultivarlos y determinar su capacidad de regenerar plantas (Mroginski *et al.*, 1991).

Para estimación de la viabilidad de células y protoplastos se puede recurrir a la coloración con FDA (diacetato de fluoresceína). Esta técnica se basa en el hecho de que únicamente las células vivas adquieren coloración con FDA y emiten fluorescencia cuando se iluminan con luz ultravioleta (Widholm, 1972). Otro procedimiento utilizado para determinar la viabilidad de los explantes crioconservados es mediante la reducción del 2, 3, 5- cloruro trifeniltetrazolio (prueba TTC, siendo recomendable para pruebas con explantes de un tamaño relativamente grande (Ree, 1989).

2.7 EMBRIOGENESIS SOMATICA

La embriogénesis somática es un proceso por medio del cual se desarrollan embriones a partir de células somáticas, los cuales tienen una gran similitud morfológica con los embriones cigóticos.

Como embriones somáticos, se han definido los iniciados a partir de células que no son producto de la fusión de gametos, por lo que es de esperar que las plantas desarrolladas a

partir de este tipo de embriones van a poseer el mismo genotipo de la planta madre (Litz y Jarret, 1991).

La embriogénesis somática es el método más rápido para clonar plantas *in vitro*, sin embargo, estudios realizados en este sentido han demostrado que las plantas desarrolladas a partir de embriones somáticos pueden a veces presentar cambios genéticos (Conger, 1982).

La embriogénesis somática ha sido ampliamente estudiada, y aunque ésta ha sido lograda en muchas especies, el problema principal ha sido el establecimiento de condiciones adecuadas para que estos se desarrollen en plantas completas (Ammirato, 1989; Buchein *et al.*, 1989).

Según Ranch y Pace (1988) el origen de los embriones somáticos puede ser debido a la alteración de un programa de diferenciación o a la presencia de condiciones desfavorables para la expresión de un programa determinado.

Esan (1977) y Pence *et al.* (1979) reportan estudios sobre embriogénesis somática de cacao, desde hace más de 15 años, utilizando como explantes ápices, hojas etc.

Estudios recientes, en los cuales se utiliza como explantes tejidos de embriones cigóticos maduros e inmaduros, reportan el logro de la diferenciación de embriones adventicios (Pence *et al.*, 1979; Novak *et al.*, 1985; Duhem *et al.*, 1989).

Kononowicz y Janick (1984) reportan el incremento en la producción de embriones somáticos en presencia de concentraciones de 0.003 mg/l y 0.002 mg/l de 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético).

Adu-Ampomah *et al.* (1987) observaron que el efecto del ANA (ácido naftalenacético) fue superior a la de las otras auxinas en el estímulo de la embriogénesis somática en cacao.

Novak *et al.* (1985) lograron regenerar estructuras embriogénicas con 1 μM de zeatina y 0.01 μM de ANA. El desarrollo de los embriones somáticos tuvo lugar en medio MS (Murashige y Skoog) con caseína hidrolizada.

Palma (1988) logró inducir la embriogénesis somática y organogénesis, a partir de embriones cigóticos de cacao, con los reguladores de crecimiento ANA 1mg /l y BA 3 mg/l.

Duhem *et al.* (1989) reportaron que la embriogénesis somática en cacao fue inducida en un medio rico en citocininas, y que el agua de coco y la caseína hidrolizada no son esenciales.

En cacao altas concentraciones de sacarosa (5% a 7%) estimulan el desarrollo de embriones somáticos, con elongación y engrosamiento de los cotiledones, acentuando su coloración púrpura, semejándose a embriones cigóticos maduros (Rao y Lee, 1986).

Pence *et al.* (1979), reportan la formación de embriones somático en embriones cigóticos inmaduros de cacao utilizando un MS complementado con ácido naftalenacético.

Aguilar (1990) reporta que el proceso de embriogénesis somática desde el establecimiento del cultivo en el medio nutritivo hasta la obtención de plantas, tardó aproximadamente 10 meses, y que el mejor desarrollo de los embriones somáticos se logró microinjertando los embriones en porta injertos de tres semanas de edad y en un medio sin reguladores de crecimiento. El mismo autor encontró que concentraciones de ANA y BA estimularon el desarrollo de embriones somáticos a partir de tejidos cotiledonales.

2.8 CULTIVO DE EMBRIONES CIGOTICOS DE CACAO

Hu y Wang (1986) reportan, que el cultivo in vitro de embriones cigóticos ha sido estudiado en un sin número de especies pertenecientes a 72 géneros.

Esta técnica facilita la recolección y conservación de germoplasma (Lanaud, 1987; Yidama et al., 1987).

En el caso particular de cacao el cultivo de embriones in vitro es muy relevante por el hecho de que es una especie que presenta semillas recalcitrantes, lo que imposibilita la preservación de germoplasma de cacao a través de los métodos tradicionales empleados en la preservación de especies con semillas ortodoxas (Yidama et al., 1987).

Ibanez (1964) determinó que la dextrosa, sorbosa y sacarosa eran metabolizadas ligeramente por embriones cigóticos cultivados in vitro; pero la lactosa y la maltosa parecían inhibir el proceso respiratorio.

Esan (1975) observó que los embriones cigóticos cultivados en concentraciones muy bajas de sacarosa y GA3 mostraban un crecimiento muy lento. El mejor resultado se obtuvo con embriones cigóticos cultivados en concentraciones de GA3 de 60 mg/l y concentraciones de 5% al 20% de sacarosa.

Pence et al., (1979) cultivaron embriones cigóticos inmaduros de cacao en un medio básico de Murashige y Skoog con agua de coco (100 ml/l) y ANA (1.5 mg/l).

2.9 CRIOCONSERVACION DE EMBRIONES CIGOTICOS

Tal como se ha mencionado en los aspectos, anteriormente, abordados, la conservación de germoplasma de cacao a largo plazo a través de los métodos tradicionales no es posible. Aunque, la criopreservación de estructuras vegetales, como los embriones cigóticos presentan una nueva alternativa, que garantice la seguridad y disponibilidad del germoplasma de cacao.

Existe en la literatura varios ejemplos de especies vegetales en las que se ha logrado recuperar, exitosamente, de nitrógeno líquido embriones cigóticos. Así, Marín *et al.* (1990), reportan sobrevivencia de hasta el 97% en embriones cigóticos y semillas de yuca almacenadas en nitrógeno líquido por congelamiento rápido y descongelamiento lento. El descongelamiento lento evita que las semillas se resquebrajen.

Embriones cigóticos aislados de palma aceitera (*Elaeis guineensis*) resisten la deshidratación, pero no soportan las bajas temperaturas (-18°C) por el daño que causa la formación de cristales de hielo extra o intracelularmente. (Grout *et al.*, 1983).

Sun (1958), observó que al sumergir semillas de *Pisum sativum* en nitrógeno líquido, el meristemo de la radícula sobrevivía y que el resto de la semilla moría. Por otra parte, observó que semillas de *P. sativum*, de tamaño pequeño, sobrevivían al nitrógeno líquido, si estas eran previamente deshidratadas, a una reducción de su peso fresco entre el 72% y el 77%.

El mismo autor pudo comprobar que cuando la semilla presentó contenidos de agua mayores de los mencionados anteriormente, el meristemo radicular no lograba sobrevivir.

Embriones de arroz y trigo han logrado sobrevivir a la temperatura del nitrógeno líquido, cuando se les aplicó DMSO previo al congelamiento.

Un procedimiento satisfactorio con embriones cigóticos inmaduros de cereales ha sido llevado a cabo, tanto por congelamiento lento como congelamiento rápido utilizando una solución crioprotectora de DMSO al 15%.

Withers(1982) reporta que, a través de sus investigaciones con embriones, ha podido observar que un congelamiento rápido favorece la sobrevivencia del eje embrionario, en tanto que un congelamiento lento favorece la sobrevivencia del escutelo.

Embriones maduros de semillas ortodoxas, deshidratados, no son susceptibles a las ultrabajas temperaturas, por lo que pueden ser criopreservados mediante inmersión directa en nitrógeno líquido sin utilización de ningún crioprotector (Bajaj, 1981).

Embriones de palma aceitera pueden ser deshidratados y congelados rápidamente, obteniendo una alta tasa de recuperación (Grout et. al., 1983).

Grout (1979) reporta que embriones de Lycopersicum esculentum sobreviven en nitrógeno líquido con un alto contenido de agua (42%) cuando éstos son protegidos con una solución de DMSO al 15%.

2.10 CRIOCONSERVACION DE EMBRIONES SOMATICOS

La crioconservación de embriones somáticos ha recibido menos atención, comparados con el empleo de otros tipos de explantes.

Dos estudios de los más representativos son los que reportan Tisserat *et al.*, (1981) y Engelmann *et al.*, (1985). En estos estudios se utilizaron embriones somáticos en un estado de desarrollo muy juvenil, estos embriones fueron obtenidos a partir de callos de tejidos de Phoenix dactilera y Elaeis guineensis.

Bajaj (1984), reporta que embriones somáticos de arroz y trigo obtenidos a partir de polen lograron sobrevivir al nitrógeno líquido, cuando estos fueron previamente protegidos con DMSO.

Por otra parte, el descongelamiento lento en embriones somáticos parece ser más adecuado, debido a que esto evita la pérdida de material por resquebrajamiento o daños mecánicos.

Es importante hacer notatar que la sobrevivencia de los embriones sólo se pudo lograr a través de congelamiento lento y haciendo uso de compuestos como el DMSO, el polietilenglicol y la glucosa o la sacarosa.

III MATERIALES Y METODOS

3.1 LOCALIZACION DEL ESTUDIO

El presente trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Unidad de Biotecnología del Programa de Agricultura Sostenible, Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE), Turrialba, Costa Rica. En el período comprendido de Octubre de 1991 a Septiembre de 1992.

3.2 ORIGEN Y PREPARACION DEL MATERIAL VEGETAL ESTUDIADO

Los embriones cigóticos inmaduros utilizados como explantes en los diferentes tratamientos de crioconservación; así como aquellos embriones cigóticos maduros e inmaduros empleados para la obtención de embriones somáticos se obtuvieron del banco de germoplasma in vivo de cacao (Thebroma cacao L.) del CATIE. Todo el material vegetal utilizado provenía de genotipos de polinización libre.

Para los ensayos de crioconservación con embriones cigóticos inmaduros se utilizaron mazorcas de los genotipos Pound-12, CATIE-1000 y UF-29 de 2 a 3 meses de edad (6 a 7 cm de diámetro y 13 a 14 cm de longitud).

Para la obtención y crioconservación de embriones somáticos se utilizaron mazorcas de los genotipos UF-29, Poud-12, CATIE-1000, EET-183, EET-75 y EET-67.

La obtención de los embriones somáticos se realizó a través de dos procedimientos: utilizando embriones inmaduros, los que se disectaron de mazorcas de 2 a 3 meses de edad y utilizando embriones maduros de mazorcas de 5 a 6 meses de

edad. El hecho de haber utilizado dos procedimientos para la obtención de los embriones somáticos, se debió a los bajos porcentajes de formación de embriones somáticos.

Los embriones somáticos obtenidos a partir de embriones inmaduros (2 a 3 meses de edad) se realizó utilizando el método desarrollado por Pence *et al.*, 1980; quienes utilizaron un medio nutritivo MS (Murashige y Skoog, 1962) con 3 mg/l de ANA (ácido naftalenacético), 1g/l de caseína hidrolizada y 0.05% de carbón activado para lograr la formación de embriones a través de embriogénesis somática directa.

La formación de embriones somáticos a partir de embriones cigóticos maduros (5 a 6 meses de edad) se logró utilizando el método empleado por Aguilar (1990), y en el cual el medio nutritivo utilizado fue un MS con 1mg/l de ANA y 3mg/l de BA (6-bencilaminopurina).

Una vez recolectado el material se llevó al laboratorio donde se procedió a desinfectarlo mediante el lavado de la superficie de las mazorcas con agua y jabón; seguidamente se asperjarón y flamearon con alcohol al 95%, por 2 veces, dentro de la cámara de transferencia.

La extracción de los embriones cigóticos inmaduros se realizó haciendo un corte transversal en el centro de la mazorca, de tal forma que ésta se dividió en dos partes iguales. Seguidamente, se tomó la mitad de la mazorca y se realizaron cortes transversales, con un cuchillo estéril, para obtener rodajas de 5 mm de grosor. Las cuales se sujetaron con los dedos índice y pulgar, y con ayuda de un bisturí estéril se disectaron los embriones inmaduros. Esa misma práctica se realizó con la otra mitad de la mazorca.

La obtención de los explantes a partir de los embriones cigóticos maduros se realizó practicando un corte transversal en el centro de la mazorca, y posteriormente extrayendo las semillas, las cuales se colocaron en un plato petri estéril. Una vez extraídas las semillas de la mazorca, se sujetaron con una pinza estéril y con ayuda del bisturí se hizo un corte longitudinal en la parte lateral de la semilla y se procedió a retirar la sarcotesta. Obtenidos los embriones se extrajo de la parte central de éstos secciones de aproximadamente 4 mm de grosor y se inocularon el medio de cultivo.

3.3 CONTENIDO DE AGUA EN LOS EMBRIONES CIGOTICOS INMADUROS

El contenido en agua de los embriones cigóticos inmaduros se precisó utilizando cuatro muestras de 30 embriones de 4mm a 8mm de longitud, determinándose el peso húmedo inicial. Posteriormente, se colocaron en el horno por 24 horas a $104^{\circ}\text{C} \pm 1$; pasado este período, se extrajeron las muestras y se pesaron nuevamente para determinar el peso seco. Finalmente en base al peso de la materia fresca se determinó el contenido de agua.

El contenido de agua en los embriones cigóticos inmaduros deshidratados bajo el flujo de aire estéril de la cámara de transferencia se realizó utilizando el procedimiento descrito anteriormente. Los períodos de deshidratación a los cuales se expusieron los embriones fueron de 1 a 6 horas, a intervalos de 1 hora. Para cada uno de los períodos de deshidratación estudiados se utilizaron muestras de 10 embriones con 4 repeticiones, las que se colocaron en la cámara de transferencia sobre círculos de papel de aluminio de peso conocido.

3.4 GERMINACION IN VITRO EN EMBRIONES CIGOTICOS INMADUROS EN RELACION AL CONTENIDO DE AGUA

Para determinar la tasa de germinación in vitro de los embriones cigóticos inmaduros en relación al porcentaje de humedad de éstos, se cultivaron 350 embriones del genotipo UF-29 en un medio nutritivo MS, al cual se le adicionó 1g/l de caseína hidrolizada, 7 g/l de agar y se ajusto el pH a 5.7. Posteriormente, los embriones se llevaron al cuarto de crecimiento, en el cual permanecieron 3 días bajo condiciones de $22^{\circ}\text{C} \pm 1$, 3000 lux y 16 horas luz de fotoperíodo.

Seguidamente se hicieron 6 grupos de 50 embriones, los cuales a su vez se subdivieron en grupos de 10 y se colocaron en platos petri sobre trocitos de papel filtro estériles bajo el flujo de aire estéril de la cámara de transferencia. Los períodos de deshidratación variaron de 0.0 a 6.0 horas a intervalos de 1 hora.

Una vez transcurrido el tiempo de deshidratación definido para cada uno de los ensayos, se procedió a colocar los embriones en el medio de recuperación; el cual estaba constituido por las sales y vitaminas MS (Murashige y Skoog, 1962) más 3% de sacarosa, 1 g/l de caseína hidrolizada, 10% de agua de coco desproteínizada (Apéndice C), 7 g/l de agar y el pH se ajustó a 5.7, antes de ser esterilizado en el autoclave.

Los vasos "Gerber" con 30 ml de medio de recuperación y conteniendo los embriones se llevaron al cuarto de crecimiento, donde permanecieron 3 días bajo condiciones de 1500 lux de intensidad lumínica y 16 horas luz de fotoperíodo. Posteriormente, se les incrementó la intensidad lumínica hasta 3000 lux.

La evaluación de los materiales se realizó 30 días después de haber cultivado los embriones en el medio de recuperación.

3.5 EFECTO DE LA SACAROSA Y DESHIDRATACION SOBRE LA CAPACIDAD GERMINATIVA IN VITRO DE LOS EMBRIONES CIGOTICOS INMADUROS

Para determinar el efecto de la sacarosa y la deshidratación sobre la capacidad germinativa de los embriones cigóticos inmaduros; se cultivaron 600 embriones, 10 embriones por vaso "Gerber", en un MS con 0.1M de sacarosa y pH 5.7. Después de dos días se tomaron 120 embriones, los que a su vez se subdividieron en cuatro grupos, para ser deshidratados por periodos de 0.0, 0.5, 1.5 y 3.0 horas en la cámara de transferencia. La parte restante de los embriones se transfirieron a medios de cultivos frescos, pero con una concentración de 0.3M de sacarosa en la que permanecieron 2 días, y nuevamente se procedió a deshidratar los embriones y así sucesivamente hasta llegar al último ensayo en el que la concentración de sacarosa fue de 0.75M.

El medio en el cual se colocaron a germinar los embriones es el mismo utilizado en el acápite 3.4.

La evaluación se realizó a los 30 días después de la inoculación de los embriones en el medio de recuperación.

3.6 EFECTO DE PRETRATAMIENTOS FISICOS Y QUIMICOS SOBRE LA VIABILIDAD DE LOS EMBRIONES CIGOTICOS

3.6.1 DESHIDRATACION

El procedimiento utilizado en este ensayo fue similar al realizado en el acápite 3.4, con la diferencia que en vez de evaluar el porcentaje de germinación se evaluó la viabilidad. Por otra parte, se realizó otro ensayo similar al anterior, en el cual los embriones no fueron precultivados sino que se tomaron directamente de las mazorcas y se colocaron a deshidratar en la cámara de transferencia. El material vegetal utilizado en ambos ensayos fueron embriones del genotipo Pound-12.

La viabilidad se evaluó colocando los embriones en una solución de 2, 3, 5-Trifeniltetrazolio (TTC) al 0.6% (Apéndice E); por 48 horas a la oscuridad y por observación directa se determinó el porcentaje de embriones viables (embriones con coloración roja).

3.6.2 EFECTO DEL DMSO

Muestra de 10 embriones, sin precultivar en el medio nutritivo MS con 1 g/l de caseína hidrolizada, y tres repeticiones se incubaron en un MS líquido con concentraciones de 5%, 10% y 20% de DMSO por 30 minutos. Posteriormente, los embriones se retiraron del DMSO, y se incubaron en una solución de 2, 3, 5-Trifeniltetrazolio por 48 horas a la oscuridad para determinar el porcentaje de embriones viables.

3.6.3 EFECTO DE LA SACAROSA Y DMSO EN EMBRIONES CIGOTICOS INMADUROS SIN CONGELAR Y CONGELADOS EN NITROGENO LIQUIDO

Muestra de 10 embriones con tres repeticiones se incubaron en 25 ml de medio de cultivo, los cuales contenían concentraciones de 2.5%, 5% y 10% de DMSO combinadas con concentraciones de 0.50M, 0.75M y 1.00M de sacarosa, durante 45 minutos. Así mismo, muestras con igual números de embriones y repeticiones, pretratadas con las concentraciones de DMSO ya mencionadas anteriormente y combinadas con concentraciones de 0.5M y 1.0M de sacarosa e incubadas por 45 minutos se congelaron por inmersión directa en nitrógeno líquido.

El descongelamiento de los embriones, contenidos en criotubos de propileno de 2ml, se realizó por inmersión en agua a 40°C por 1.5 minutos.

La determinación del porcentaje de embriones viables se realizó con 2, 3, 5-Trifeniltetrazolio, tal y como se explicó anteriormente.

3.6.4 ESTUDIO DEL EFECTO DE LA DESHIDRATAACION, TIEMPO DE EXPOSICION A 5°C, CONCENTRACIONES DE DMSO Y TIEMPO DE INCUBACION SOBRE LA VIABILIDAD EN EMBRIONES CIGOTICOS CONGELADOS EN NITROGENO LIQUIDO

Dado que hasta esta etapa, las investigaciones realizadas, únicamente permitieron determinar el efecto de los factores físicos y químicos, estudiados, sobre la germinación y viabilidad de los embriones cigóticos inmaduros de una manera independiente. Se procedió a realizar un ensayo que permitiese determinar posibles interacciones entre éstos factores o determinar si éstos actuaban sobre la viabilidad de una forma independiente.

Los explantes utilizados para este ensayo fueron embriones de 4mm a 8m los que se disectaron de mazorcas del genotipo UF-29 .

Los embriones se cultivaron en un MS con 3% de sacarosa en vasos "Gerber", en los que se habían dispensado 30 ml de medio de cultivo. Posteriormente, se separaron en grupos de 10 embriones los que se asignaron cada uno de los tratamientos evaluados (Cuadro 1).

A) Diseño experimental y modelo matemático

El tiempo de deshidratación, tiempo de exposición a 5°C, la concentración de DMSO y el tiempo de incubación en las diferentes concentraciones de DMSO fueron utilizadas como variables independientes para determinar los efectos principales, cuadráticos e interacciones que tenían mayor importancia sobre el porcentaje de viabilidad de los embriones cigóticos inmaduros.

Para ello se utilizó un diseño de superficie de respuesta "Fase Centered Cube" de resolución V (Haaland, 1989) con 4 puntos centrales (Cuadro 1).

Cuadro 1: Diseño experimental de superficie de respuesta "Face Centerd Cube" con las variables independientes evaluadas.

Experimento	Valores codificados				Valores reales			
	X1	X2	X3	X4	X1	X2	X3	X4
1	-1	-1	-1	-1	3.5	0.0	0.0	1.0
2	-1	-1	-1	1	3.5	0.0	0.0	5.0
3	-1	-1	1	-1	3.5	0.0	10.0	1.0
4	-1	-1	1	1	3.5	0.0	10.0	5.0
5	-1	1	-1	-1	3.5	60.0	0.0	1.0
6	-1	1	-1	1	3.5	60.0	0.0	5.0
7	-1	1	1	-1	3.5	60.0	10.0	5.0
8	-1	1	1	1	3.5	60.0	10.0	5.0
9	1	-1	-1	-1	4.5	0.0	0.0	1.0
10	1	-1	-1	1	4.5	0.0	10.0	1.0
11	1	-1	1	-1	4.5	0.0	10.0	1.0
12	1	-1	1	1	4.5	60.0	0.0	1.0
13	1	1	-1	-1	4.5	60.0	0.0	5.0
14	1	1	-1	1	4.5	60.0	0.0	5.0
15	1	1	1	-1	4.5	60.0	10.0	1.0
16	1	1	1	1	4.5	60.0	10.0	5.0
17	-1	0	0	0	3.5	30.0	5.0	3.0
18	1	0	0	0	4.5	30.0	5.0	3.0
19	0	-1	0	0	4.0	60.0	5.0	3.0
20	0	1	0	0	4.0	60.0	5.0	3.0
21	0	0	-1	0	4.0	30.0	0.0	3.0
22	0	0	1	0	4.0	30.0	10.0	3.0
23	0	0	0	-1	4.0	30.0	5.0	5.0
24	0	0	0	1	4.0	30.0	5.0	5.0
25	0	0	0	0	4.0	30.0	5.0	3.0
26	0	0	0	0	4.0	30.0	5.0	3.0
27	0	0	0	0	4.0	30.0	5.0	3.0
28	0	0	0	0	4.0	30.0	5.0	3.0

X1: Tiempo de deshidratación en horas.

X2: Tiempo de exposición a 5°C en minutos.

X3: Concentración de DMSO.

X4: Tiempo de incubación en DMSO.

El congelamiento de los embriones se llevó a cabo por inmersión directa en nitrógeno líquido, en el cual permanecieron 48 horas. Posteriormente, los embriones se descongelaron por inmersión en agua a 40°C.

La determinación del porcentaje de viabilidad se realizó mediante la prueba con 2,3,5-Trifeniltetrazolio.

Antes de proseguir describiendo al lector la metodología. Considero necesario explicar que previo a la serie de ensayos que se abordarán después del acápite 3.7; fueron realizados una serie de experimentos, por medio de los cuales se trató de recuperar los embriones cigóticos inmaduros almacenados en nitrógeno líquido, a través de la germinación directa de éstos en los medios de recuperación. Los ensayos realizados al respecto fueron los siguientes:

- 1) Embriones cigóticos inmaduros deshidratados en la cámara de transferencia y congelados por inmersión directa en nitrógeno líquido.
- 2) Embriones cigóticos inmaduros, sin cotiledones, deshidratados en la cámara de transferencia y congelados por inmersión directa en nitrógeno líquido.
- 3) Embriones cigóticos inmaduros, precultivados en un medio nutritivo con prolina en concentraciones de 100 mg/l, 500 mg/l y 1000 mg/l; deshidratados en la cámara de transferencia y congelados en nitrógeno líquido por inmersión directa.
- 4) Embriones cigóticos inmaduros, precultivados en medios nutritivos con incrementos de sacarosa de 0.1M, 0.5M y 0.75M de sacarosa y congelados por inmersión directa en nitrógeno líquido. La temperatura de incubación durante la fase de precultivo fue de 22°C ± 1.

5) Embriones cigóticos inmaduros, precultivados en medios nutritivos con incrementos de sacarosa de 0.1M, 0.5M y 0.75M de sacarosa y congelados por inmersión directa en nitrógeno líquido. La temperatura de incubación durante la fase de precultivo fue de $14^{\circ}\text{C} \pm 1$.

6) Embriones cigóticos inmaduros, precultivados en medios nutritivos con incrementos de sacarosa de 0.1M, 0.5M y 0.75M de sacarosa y congelados a una tasa de $0.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$.

7) Embriones cigóticos inmaduros, precultivados en medios nutritivos con incrementos de sacarosa de 0.1M, 0.5M y 0.75M de sacarosa y congelados a una tasa de $1.0^{\circ}\text{C}/\text{min}$.

El medio de recuperación utilizado para todos los tratamientos mencionado anteriormente fue el recomendado por Palma (1988), el cual está constituido por las sales MS, 3% de sacarosa, 1g/l de caseína hidrolizada y el pH es ajustado a 5.7. En vista de no haber logrado la germinación de los embriones almacenados en nitrógeno líquido, se realizaron ensayos similares a los anteriores, pero modificando en el medio de recuperación; modificaciones que consistieron en lo siguientes:

1) MS más 1 g/l de caseína hidrolizada y 10% de agua de coco desproteínizada (Apéndice C).

2) MS más 1 g/l de caseína hidrolizada, 10% de agua de coco desproteínizada y 0.05% de carbón activado.

3) MS más 1 g/l de caseína hidrolizada y 10 mg/l de ácido giberélico.

4) MS con 3% de sacarosa, $2\ \mu\text{M}$ de zeatina y 0.05% de carbón activado.

Es debido a esa situación, en la cual no fue posible la recuperación de los embriones cigóticos inmaduros utilizando diferentes tratamientos en las fases del congelamiento y diferentes medios de germinación, que fue necesario replantear el trabajo, y en lugar de tratar de recuperar los embriones en un medio de germinación. Utilizar un medio de recuperación que permitiera la formación de embriones somáticos o la formación de callo. Esto a sabiendas, mediante los ensayos de pruebas de viabilidad realizados hasta esta etapa, que los embriones cigóticos inmaduros preservados en nitrógeno líquidos permanecían viables cuando se sometían a determinados tratamientos durante las fases de congelamiento.

3.7 CRIOCONSERVACION DE EMBRIONES CIGOTICOS POR INMERSION DIRECTA EN NITROGENO LIQUIDO

Con el objetivo de recuperar los embriones cigóticos inmaduros congelados por inmersión directa en nitrógeno líquido mediante la formación de embriones somáticos o callo, se realizó una serie de ensayos en los que las principales variantes se realizaron en la fase de precultivo.

A) Pretratamientos

1) Cien embriones cigótico inmaduros fueron cultivados en un medio MS (Murashige y Skoog, 1962) con 3% de sacarosa. Posteriormente fueron transferidos a medios frescos cada dos días con incrementos de sacarosa en 6%, 9%, 15% y 21%.

2) Similar al pretratamiento 1, pero con la diferencia que al medio de cultivo se le adicionó 3 mg/l de ABA y se deshidrataron por 1 hora.

3) Deshidratación de los embriones en períodos de 0 a 6 horas a intervalos de 1 hora.

- 4) Embriones sin cotiledones y deshidratados por 4 horas.
- 5) Similar al pretratamiento 1, pero adicionado al medio 3mg/l de ABA y sin deshidratación.
- 6) Adición al medio de cultivo de 3 niveles de prolina 100 mg/l, 500 mg/l y 1000 mg/l y deshidratación por 4 horas.
- 7) Incrementos de sacarosa en 0.3M, 0.5M y 0.75M con tiempos de deshidratación de 0.0, 0.5 y 3.0 horas.

B) Unidad experimental y controles

La unidad experimental estuvo constituida por 10 embriones, y en cada uno de los pretratamientos evaluados se utilizaron como mínimo 6 repeticiones y como máximo 8. Los controles estaban formados por 2 unidades experimentales que recibieron los tratamientos de igual forma, pero que no fueron expuestas al nitrógeno líquido.

C) Variables evaluadas

las variables a evaluar fueron:

- 1) Porcentajes de embriones que formaron callo.
- 2) Porcentajes de embriones que formaron embriones somáticos.

D) Descongelamiento

El descongelamiento se realizó mediante la inmersión de los criotubos en agua a 40°C por 1.5 minutos.

E) Recuperación

La evaluación del material se realizó 30 días después de haber establecido los embriones en el medio de recuperación (medio MS más 3mg/l de ANA).

3.8 EFECTO DEL TAMAÑO DEL EMBRION EN LA FORMACION DE CALLO

Embriones inmaduros de 2 mm, 4 mm y 8 mm de longitud del genotipo Pound-12 fueron disectados de mazorcas de 2 a 3 meses de edad. Los cuales se utilizaron para determinar el efecto del tamaño del embrión en la formación de callo.

Los embriones disectados asépticamente fueron sembrados en grupos de 10 en vasos "Gerber" que contenían 25 ml de medio MS con 3% de sacarosa. Posteriormente, fueron transferidos cada 2 días a medios frescos, con incrementos de sacarosa de 6%, 9%, 15% y 21%.

Una vez que los embriones se cultivaron en el medio nutritivo con 21% de sacarosa, se procedió a transferirlos a los criotubos y con ayuda de una pinza se sumergieron en nitrógeno líquido, donde permanecieron 48 horas. Transcurridas las 48 horas, se procedió a descongelarlos mediante inmersión en agua a 40°C por 1.5 minutos, posteriormente se procedió a cultivarlos en el medio de recuperación (MS + 3mg/l de ANA).

Los cultivos fueron incubados durante 6 semanas en un cuarto de crecimiento con fotoperíodo de 16 horas luz, temperatura de 22°C ± 1 y una intensidad lumínica de 3000 lux.

A) Análisis estadístico

Para determinar el tamaño del embrión, que permitiera la mayor formación de callo, se utilizó un diseño completamente al azar con 8 repeticiones y 10 embriones por unidad experimental.

B) Variables evaluadas

- 1) Formación de callos en porcentajes.
- 2) Formación de raíces en porcentajes.

C) Procesamiento de la información

El análisis estadístico se realizó en el Centro de Computo del CATIE utilizando el paquete estadístico SAS.

El modelo estadístico para el diseño experimental fue:

$$Y = \mu + T_i + E_{ij}$$

donde:

- Y = variable de respuesta
- μ = media general
- T = efecto del tamaño de embrión
- E = error experimental

Una vez realizado el análisis de varianza se procedió a realizar un análisis de regresión, para determinar la tendencia del tamaño de los embriones en relación a las tasas de sobrevivencia obtenidas en el experimento.

3.9 EFECTO DE LA TEMPERATURA DE INCUBACION

Para determinar el efecto de la temperatura de incubación previa al congelamiento, se utilizaron embriones de 2mm y 4mm de longitud.

El pretratamiento, congelamiento, descongelamiento, recuperación y evaluación del ensayo se realizaron siguiendo los procedimientos utilizados en el experimento anterior (acápite 3.8).

A) Modelo estadístico

El modelo estadístico para este diseño fue el siguiente:

$$Y = \mu + T_i + E_{ij}$$

donde:

Y = variable de respuesta.

μ = media general.

T = efecto de la temperatura de incubación .

E = error experimental.

El análisis de varianza se estructuró de la siguiente manera:

Fuente de variación	G1
temperatura incubación	t-1
lineal	1
cuadrático	1
residual	t(r-1)

3.10 EFECTO DEL pH

Este ensayo se llevó a cabo bajo condiciones similares a las realizadas en el acápite 3.8, . El ajuste de los tres potenciales de hidrógeno evaluados se realizó antes de esterilizar el medio en el autoclave.

El material vegetal utilizado lo constituyeron embriones de 2 y 4 mm de longitud del genotipo UF-29.

Para determinar la formación de callos en relación al pH del medio de cultivo, en el que se inocularon los embriones a criopreservar, se utilizó un diseño completamente al azar con 7 repeticiones y 10 embriones por unidad experimental. Los tratamientos evaluados fueron los siguientes potenciales de hidrógeno: 4.7, 5.7 y 7.7.

La evaluación del ensayo se realizó 6 semanas después de haber descongelado y cultivado los embriones en el medio de recuperación.

3.11 CONGELAMIENTO LENTO DE EMBRIONES CIGOTICOS

A) Pretratamientos

1) Embriones del genotipo UF-29 fueron disectados y cultivados en un medio nutritivo MS (Murashige y Skoog, 1962) con 3% de sacarosa. Posteriormente, se transfirieron cada 2 días almismo medio de cultivo, pero incrementando la concentración de sacarosa en la siguientes proporciones : 8%, 9%, 15% y 21%.

2) Embriones del genotipo Pound-12 fueron disectados y cultivados en un MS con 3% de sacarosa por 3 días. Posteriormente, se incubaron en un medio de cultivo MS líquidos con altas concentraciones de sacarosa: 0.5M, 0.75M y 1.0M en el que permanecieron 12 horas, previo al congelamiento.

B) Crioprotección

El tratamiento crioprotector recibido por los embriones pretratados fue el siguiente: se colocaron 10 embriones en 0.8 ml de MS en criotubos de 2ml a los cuales se les agregó una disolución de 150 μ l de DMSO al 20% con 1.0M de sacarosa a intervalos de 15 minutos, teniendo al final una solución de 10% de DMSO y 0.5M de sacarosa. Seguidamente, los criotubos se colocaron sobre hielo (5°C) por 30 minutos, con ayuda de una micropipeta se retiró la solución crioprotectora de los criotubos y se procedió a cerrarlos para llevar los embriones a la cámara de congelamiento.

C) Congelamiento

1) Los embriones que recibieron el pretratamiento 1 fueron congelados en un congelador programable (CRYOMED 1010) de la siguiente manera: El congelamiento se inició a 5°C y se disminuyó la temperatura hasta -40°C, estudiando las siguientes tasas de congelamientos 0.5°C/min, 0.4°C/min, 0.8°C/min y 1.0°C/min. Finalmente los criotubos se transfirieron al nitrógeno líquido donde permanecieron 48 horas.

2) Para los embriones que recibieron el pretratamiento 2 se realizó el siguiente procedimiento de congelamiento: Los criotubos se colocaron en la cámara de congelamiento cuando esta había alcanzado 5°C, se bajó la temperatura a -140°C, en la fase de cristalización se utilizó una tasa de congelamiento de 15 °C/min hasta -30°C; la fase de calentamiento se llevó a cabo empleando una tasa de congelamiento de 15 °C/min hasta -12°C y finalmente se congelaron a razón 0.5 °C/min hasta -40°C. Después fueron almacenados en nitrógeno líquido.

D) Recuperación

Los embriones se descongelaron por inmersión de los criotubos en agua a 40°C, después de haber permanecido en nitrógeno líquido por 48 horas. El medio de recuperación fue el medio MS + 3 mg/l de ANA.

E) Controles

Los controles fueron muestras de 10 embriones extraídos y cultivados en el medio de recuperación de las fases de pretratamiento, crioprotección y embriones congelados hasta -40°C.

3.12 ESTUDIO DEL EFECTO DE LA SACAROSA Y ANA SOBRE LA FORMACION DE CALLOS EN EMBRIONES CIGOTICOS

Los embriones utilizados provinieron de mazorcas del genotipo UF-29. Se utilizaron embriones de 2 a 4 mm de longitud.

Los embriones se cultivaron en grupos de 10 por vaso "Gerber", los que contenían 30 ml de MS con concentraciones de sacarosa de 12 g/l, 20 g/l, 40 g/l y 60 g/l (cuadro 2), en donde permanecieron por 3 días. Posteriormente, se procedió a aplicarles una solución crioprotectora como la utilizada en el acápite 3.11. Una vez que los embriones habían sido pretratados se llevaron a la cámara de congelamiento en donde se congelaron hasta -40°C a una tasa de $0.6^{\circ}\text{C}/\text{min}$ y finalmente se llevaron a nitrógeno líquido.

El descongelamiento se realizó por inmersión en agua 40°C , después de haber permanecido los embriones 48 horas en nitrógeno líquido.

La recuperación llevó a cabo mediante el cultivo de los embriones descongelados en un MS con ANA en las siguientes concentraciones: 1.2 mg/l, 2 mg/l, 4 mg/l, 6 mg/l y 6.8 mg/l (Cuadro 2).

A) Diseño experimental y modelo matemático

Las concentraciones de sacarosa y concentraciones de ANA fueron utilizadas como variables independientes para optimizar el porcentaje de formación de callo en los embriones cigóticos inmaduros. Para ello se empleó un diseño central compuesto de resolución V (Haaland, 1989) con 3 puntos centrales y 4 puntos estrellas, en el que los tratamientos estaban constituidos por 10 embriones (Cuadro 2).

Cuadro 2: Diseño experimental central compuesto y las variables independientes evaluadas.

Experimento	Valores codificado		Valores reales	
	X1	X2	X1	X2
1	-1	-1	20	2
2	-1	-1	20	6
3	1	-1	60	2
4	1	1	60	6
5	1.41	0	12	4
6	1.41	0	68	4
7	0	1.41	40	1.2
8	0	1.41	40	6.8
9	0	0	40	4
10	0	0	40	4
11	0	0	40	4

X1: Concentraciones de sacarosa (g/l).

X2: Concentraciones de ANA (ácido naftalenacético mg/l).

3.13 CONGELAMIENTO DE EMBRIONES SOMATICOS

Los embriones usados para la crioconservación fueron obtenidos después de haber sido cultivados 2 meses en un MS suplementado con 1 mg/l de caseína hidrolizada.

A) Procesamiento de crioconservación

El método de crioconservación comprende 5 fases: pretratamiento, crioprotección, congelamiento, descongelamiento y recuperación. De las 5 fases mencionadas anteriormente únicamente 2 fueron variadas.

B) Pretratamiento

1) Tres grupos de 100 embriones del genotipo EET-183 se cultivaron en un medio MS con 3% de sacarosa y 1g/l de caseína hidrolizada, posteriormente, se incubaron en un MS líquidos con concentraciones de sacarosa 0.5M, 0.75M y 1.0M a por 12 horas.

2) Cien embriones del genotipo Pound-12 se cultivaron con incrementos de sacarosa de 0.3M y 0.5M de sacarosa, posteriormente, se transfirieron a un medio líquido con 0.75 M de sacarosa en el que permanecieron 24 horas.

C) Crioprotección

El crioprotector utilizado en los embriones somáticos fue el mismo empleado en los embriones cigóticos, 20% de DMSO combinado con 1.0 M de sacarosa, el que se adicionó en 45 minutos a los criotubos que contenían los embriones. Pasado el tiempo de exposición al crioprotector se colocaron los embriones 30 minutos sobre hielo.

D) Congelamiento

Los embriones que recibieron el pretratamiento 1 fueron congelados por inmersión directa en nitrógeno líquido y los embriones que recibieron el pretratamiento 2 se congelaron siguiendo el procedimiento mencionado en el acápite 3.10.3

E) Descongelamiento

Después de haber permanecido las muestras 48 horas en nitrógeno líquido se descongelaron por inmersión de los criotubos por 1.5 minutos en agua a 40°C.

F) Recuperación de los embriones

La tasa de sobrevivencia se determinó 16 semanas después de haber cultivado los embriones en un MS con 1g/l de caseína hidrolizada.

3.14 ANALISIS HISTOLOGICO

Embriones expuestos a varios de los pretratamientos utilizados en el proceso de crioconservación fueron utilizados para efectuar el análisis histológico.

El estudio se realizó tomando 5 embriones cigóticos por tratamiento. Cada una de las muestras fueron fijadas en F.A.A (formalina, 5%; ácido acético, 5% y alcohol al 70%, 90%), deshidratadas en una serie ascendente de etanol (cuadro 1B) e infiltradas en parafina.

Los cortes fueron hechos en un micrótomo a 8mm de grosor y la tinción se realizó en safranina y verde rápido (cuadro 2B).

El análisis de los tejidos se determinó a través del microscopio.

Los embriones que fueron sometidos al estudio histológico fueron los siguientes:

- 1) Embriones de 4 mm cultivados en MS con 3% de sacarosa, 10% de agua de coco desproteinizada y 1g/l de caseína hidrolizada.
- 2) Embriones de 4 mm cultivados en un MS con 3% de sacarosa, 10% de agua de coco y 1g/l de caseína hidrolizada. Deshidratados por 6 horas al flujo de aire estéril de la cámara de transferencia.

3) Embriones cultivados en el medio de cultivo utilizado en "1", a los cuales se les subcultivo en incrementos de sacarosa de 3%, 6%, 9%, 15% y 21% de sacarosa a intervalos de 2 días.

4) Embriones a los cuales se les pretrató utilizado el tratamiento "3". Congelados a una tasa de 0.6°C/min, almacenado en nitrógeno líquido por 48 horas y recuperados en un MS + 3mg/l de ANA.

IV RESULTADOS

4.1 CONTENIDO DE AGUA, VIABILIDAD Y GERMINACION IN VITRO EN EMBRIONES CIGOTICOS INMADUROS DE CACAO

El contenido de agua en los embriones cigóticos inmaduros de 8 a 4 mm, cultivados en un medio MS con 1g/l de caseína hidrolizada e incubados por 3 días bajo condiciones de 22°C, 16 horas luz y intensidad lumínica de 3000 lux presentaron contenidos de humedad de un 85% a un 90 % (Cuadro 3).

Por otra parte, la exposición de los embriones al flujo de aire estéril de la cámara de transferencia, ocasionó una rápida disminución del contenido de agua, como se logra apreciar en el cuadro 3. En la primera hora de deshidratación, el contenido de agua se redujo aproximadamente en un 30%; descendiendo lentamente hasta alcanzar un 20% en los embriones expuesto por un período de 6 horas al flujo de aire estéril .

El contenido de agua en los embriones estuvo relacionado con el poder germinativo de éstos, pérdidas de agua por debajo del 40% provocaron disminuciones de un 60% en el porcentaje de germinación (Figura 1). Así mismo, disminuciones en el contenido de agua menores del 60% indujeron marchitez y pérdida de turgor en los embriones, produciéndose una carencia total de la capacidad germinativa de los embriones cuando el porcentaje de humedad alcanzó valores por debajo del 22 % (6 horas de deshidratación). Sin embargo, la viabilidad en los embriones precultivados por 3 días en el medio nutritivo se mantuvo entre un 100% y 85%, aún con períodos de deshidratación de 6 horas (Figura 1).

Cuadro 3. Contenido de agua y porcentaje de germinación in vitro de embriones cigóticos inmaduros deshidratados al flujo de aire estéril por diferentes periodos de tiempo.

Período de deshidratación en horas	Contenido de agua %	Sobrevivencia % germinación
0 hora	88 ±2.52	100.0±0.00
1 hora	61 ±4.04	100.0±0.00
2 horas	40.6±3.05	80.0±4.52
3 horas	23 ±3.06	40.0±3.52
4 horas	22.8±2.52	35.0±3.04
5 horas	22 ±3.06	30.0±4.06
6 horas	20 ±3.51	0.0±0.00

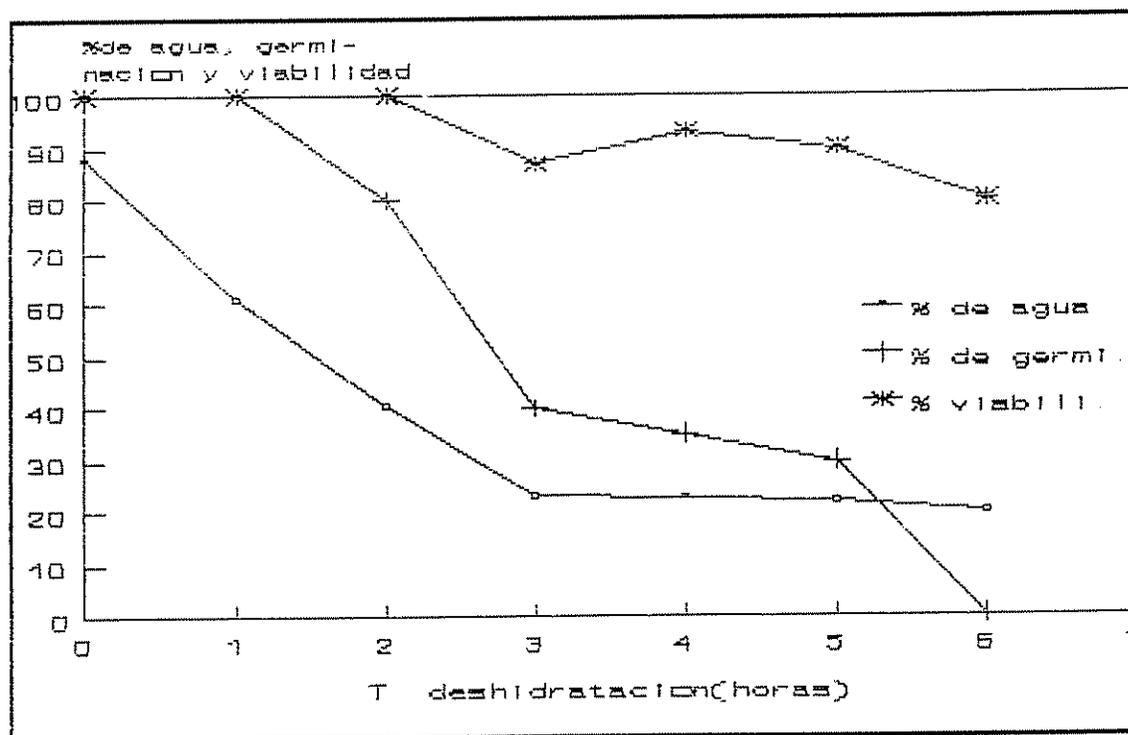


Figura 1. Porcentaje de agua, germinación y viabilidad en embriones cigóticos inmaduros deshidratados en la cámara de transferencia.

4.2 EFECTO DE LA SACAROSA Y DESHIDRATACION SOBRE LA CAPACIDAD GERMINATIVA IN VITRO DE LOS EMBRIONES CIGOTICOS INMADUROS

Como se puede observar en la figura 2, cuando los embriones cigóticos inmaduros eran precultivados en altas concentraciones de sacarosa y posteriormente se deshidrataron al flujo de aire estéril de la cámara de transferencia, el porcentaje de germinación in vitro de éstos fue marcadamente afectado. Sin embargo el incremento en los niveles de sacarosa no redujeron notablemente la capacidad germinativa de los embriones. Contrariamente, al efecto de la sacarosa el tiempo de deshidratación de los embriones al flujo de aire estéril, redujo bruscamente el porcentaje de germinación; a tal punto que embriones cultivados en 0.75M de sacarosa y deshidratados por 3 hora perdieron totalmente la capacidad germinativa.

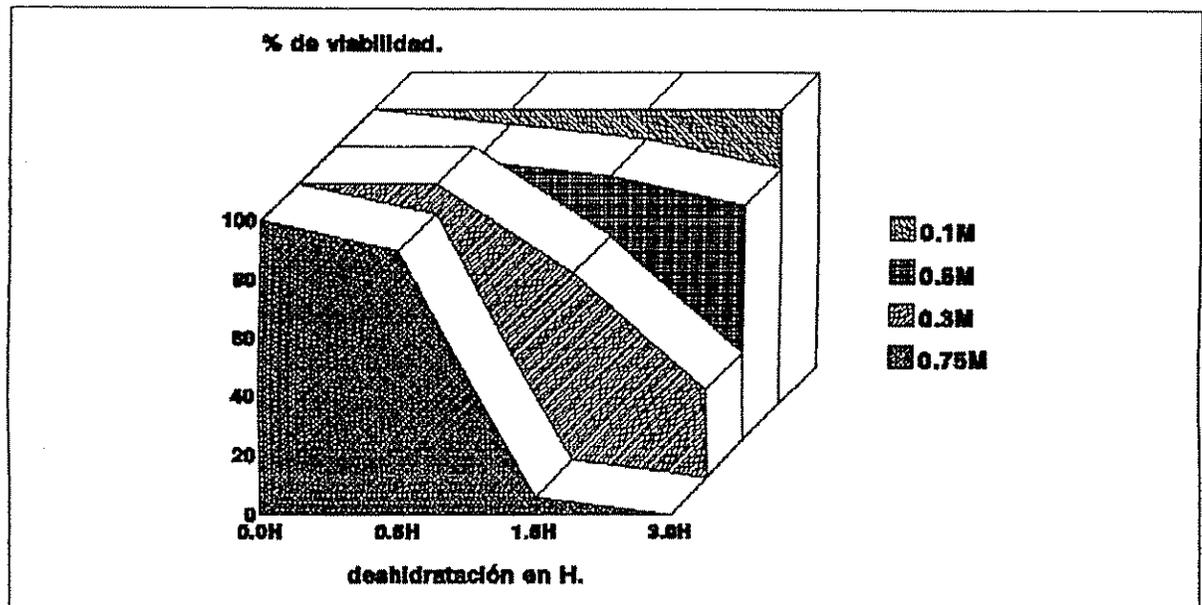


Figura 2. Porcentaje de germinación de embriones cigóticos inmaduros de cacao cultivados en cuatro concentraciones de sacarosa y cuatro períodos de deshidratación.

4.3 EFECTO DE PRETRATAMIENTOS FISICOS Y QUIMICOS SOBRE LA VIABILIDAD DE LOS EMBRIONES CIGOTICOS SIN CONGELAR Y CONGELADOS EN NITROGENO LIQUIDO

4.3.1 DESHIDRATAACION

En un primer ensayo (Cuadro 4), en el que se utilizaron embriones cigóticos inmaduros (Figura 1D) recién aislados del genotipo Pound-12 (sin que permanecieran previamente en un medio nutritivo) se encontró que éstos perdieron el 90 % de su viabilidad después de una hora de deshidratación al flujo de aire estéril de la cámara de transferencia.

Por el contrario, cuando los embriones se extrajeron de las mazorcas y se precultivaron sobre un medio MS con 1mg/l de caseína hidrolizada por 4 días, y posteriormente se incubaron en un cuarto de crecimiento bajo condiciones de 22°C, 16 horas luz de fotoperíodo y 3000 lux. Los embriones soportaron períodos de deshidratación de 6 horas, con una tasa de viabilidad del 80% (cuadro 4) .

Cuadro 4. Viabilidad de los embriones cigóticos inmaduros de cacao deshidratados al flujo del aire.

Período de deshidrata en horas	Porcentajes de embriones viables		
	embriones sin precultivar	embriones precultivados	
		sin congelar	congelados en NL
0.0 hora	100.0± 0.0	100 ±0.00	0.0±0.0
1 hora	13.0±10.9	100 ±0.00	"
2 horas	0.0± 0.0	100 ±0.00	"
3 horas	" -	87.9±5.25	"
4 horas	" -	93 ±5.77	"
5 horas	" -	90 ±5.78	28.0±4.47
6 horas	" -	80 ±8.75	0.0

Por otra parte, cuando se realizaron pruebas de congelamiento por inmersión directa en nitrógeno líquido con embriones cigóticos inmaduros precultivados por tres días en un MS y deshidratados en los períodos mencionados anteriormente, se encontró que únicamente embriones deshidratados por un período de 5 horas, es decir, con un contenido de humedad del 22%, lograron sobrevivir. La tasa de viabilidad que se encontró en estos embriones fue del 28%, según la prueba del TTC (cuadro 4).

4.3.2 EFECTO DEL DMSO SOBRE LA VIABILIDAD EN EMBRIONES CIGOTICOS INMADUROS

El DMSO incorporado al medio de cultivo en concentraciones de 5%, 10% y 20% (v/v), como crioprotector, afectó negativamente la viabilidad de los embriones sin congelar. Así, se observó que embriones cigóticos inmaduros sin precultivar e incubados por 30 minutos en presencia de 5% de DMSO presentaron una sobrevivencia del 12%, según la prueba de Trifeniltetrazolio. Concentraciones de 10% y 20% resultaron ser letales.

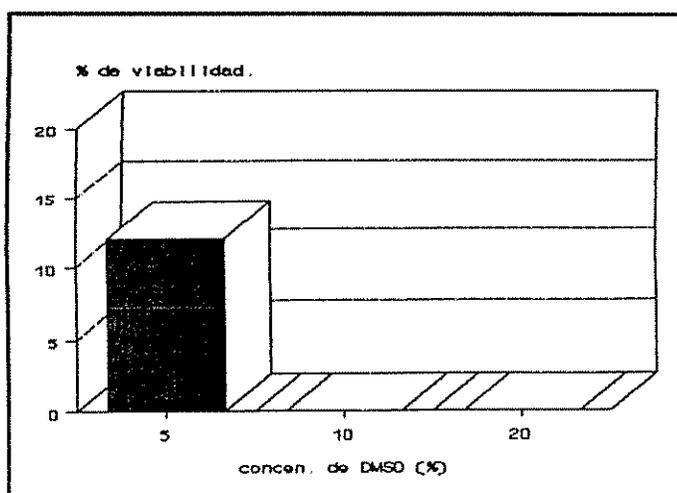


Figura 3. Efecto de tres concentraciones de DMSO sobre el porcentaje de viabilidad en embriones cigóticos inmaduros de cacao.

4.3.3 EFECTO DE LA COMBINACION DMSO-SACAROSA.

Contrario al comportamiento anterior, embriones cigóticos inmaduros sin precultivar e incubados por 45 minutos en concentraciones de DMSO de 2.5%, 5% y 7.5% en combinación con 0.5M, 0.75M y 1.0M de sacarosa permitieron que los embriones permanecieran viables (Figura 4a). De igual forma embriones que recibieron el tratamiento utilizado en los embriones sin congelar presentaron altas tasas de viabilidad después de haber sido congelados por inmersión directa en nitrógeno líquido, almacenados 48 horas en nitrógeno líquido, descongelados por inmersión en agua a 40°C y evaluados a través de la prueba de TTC (Figura. 4b).

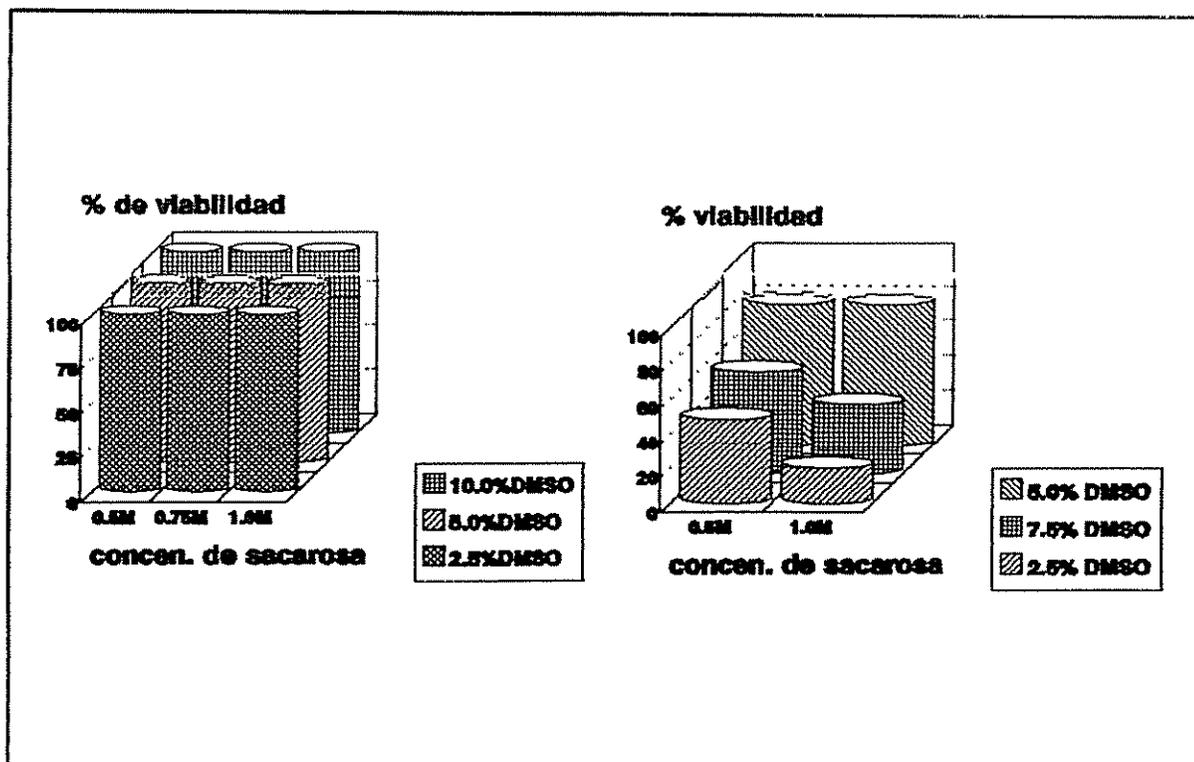


Figura 4. Efecto de la combinación de sacarosa y DMSO sobre la viabilidad de embriones cigóticos inmaduros : a, viabilidad de embriones sin congelar; b, viabilidad de embriones congelados por inmersión directa en nitrógeno líquido.

4.3.4 EFECTO DEL TIEMPO DE DESHIDRATACION, TIEMPO DE EXPOSICION A 5°C, CONCENTRACION DE DMSO Y TIEMPO DE INCUBACION

De las cuatro variables evaluadas por medio de un diseño de superficie de respuesta (Figura 5), se encontró que los factores con mayor efecto sobre la viabilidad de embriones cigóticos inmaduros fueron: la concentración de DMSO (CONDMSO), el tiempo de incubación (TIMSO) y el tiempo de exposición de los criotubos con los embriones a la temperatura de 5°C (TEXPFRI). También fue posible observar que los efectos cuadráticos tiempo de exposición a 5°C por tiempo de exposición a 5°C (TEXPFRI*TEXPFRI), concentración de DMSO por concentración de DMSO (CONDMSO*CONDMSO) y tiempo de incubación en DMSO por tiempo de incubación en DMSO fueron altamente significativos.

Así mismo, se observó que la interacción entre la concentración de DMSO y tiempo de incubación a 5 °C (TEXPFRI*CONDMSO), fue la única estadísticamente significativa.

La concentración de DMSO y el tiempo de incubación actuaron de una manera negativa sobre la viabilidad de los embriones cigóticos congelados, de tal forma que entre mayores fueron las concentraciones y tiempos de incubación utilizados, fue menor el porcentaje de viabilidad presentados por éstos.

Por el contrario, el tiempo de exposición de las muestras a la temperatura de 5°C redujo el efecto tóxico del DMSO, sobre los embriones, incrementado el porcentaje de viabilidad de los embriones.

Del modelo reducido (Cuadro 1A y Cuadro 2A), en el que no se consideró la variable, deshidratación (DESHI); las

interacciones concentración de DMSO por deshidratación (DESHI*CONDMSO), tiempo de incubación en DMSO por deshidratación (TIMSO*DESHI), tiempo de incubación en DMSO por concentración de DMSO (TIMSO*CONDMSO), tiempo de exposición a 5°C por deshidratación (TEXPFRI*DESHI), tiempo de incubación en DMSO por tiempo de exposición a 5°C (TIMSO*TEXPFRI) y el efecto cuadrático deshidratación por deshidratación (DESHI*DESHI), y en función del porcentaje de embriones viables, se derivó la ecuación de regresión, la cual fue la siguiente:

$$Y=8.226+0.227*X2-1.295*X3-1.808X4-0.003*X22-0.00*X2*X3 \\ +0.068*X32+0.301*X42 \quad (1) \\ R2 = 0.97$$

Donde:

X2=tiempo de exposición (en minutos) de los criotubos con los embriones a 5°C .

X3=concentración de DMSO.

X4=tiempo de incubación en DMSO.

La figura 6 se puede observar que el mayor porcentaje de embriones viables que se observaron cuando se fijo el tiempo de incubación en DMSO por 1 hora, fue cuando se utilizaron las concentraciones más bajas de DMSO . Sin embargo es notorio que la exposición de los embriones a 5°C por 30 minutos reducen el efecto tóxico del DMSO, permitiendose de esta forma la obtención de tasas de viabilidad relativamente altas. También se pudo observar que cuando los embriones se incubaron por 30 minutos a 5°C, y la viabilidad se determinó en función de la concentración de DMSO y el tiempo de incubación, las mayores tasa de sobrevivencia ocurrieron con las concentraciones más bajas de DMSO y tiempos de incubación más corto (Figura 7).

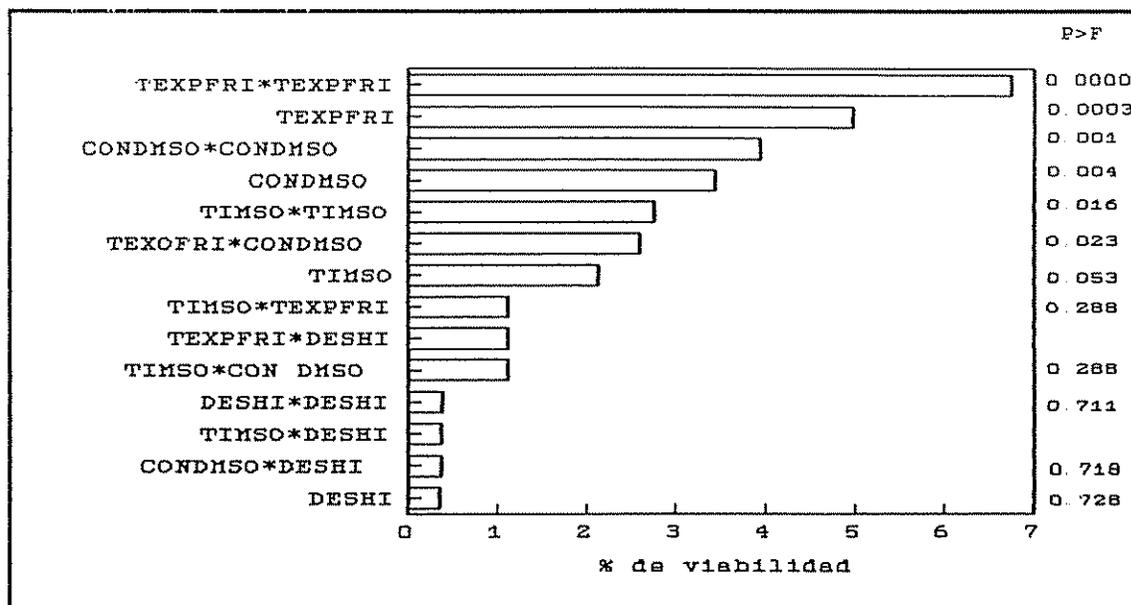


Figura 5. Efectos principales e interacciones del DMSO, tiempo de incubación, deshidratación y tiempo de exposición a 5°C.

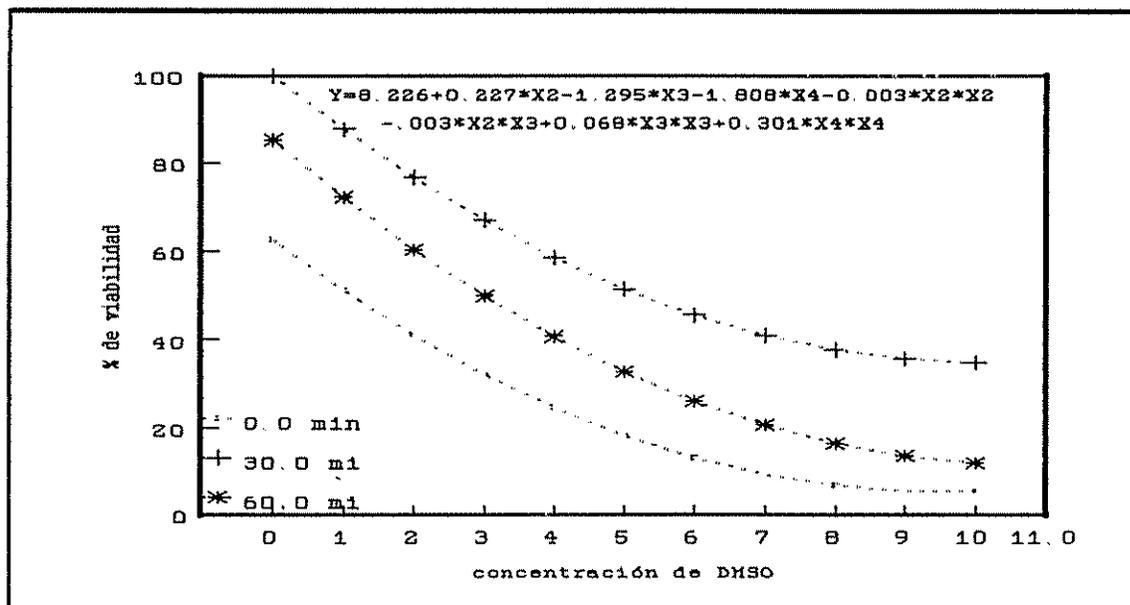


Figura 6. Efecto de la concentración de DMSO y tiempo de exposición a 5°C sobre la viabilidad de embriones cigóticos inmaduros e incubados por una hora en DMSO.

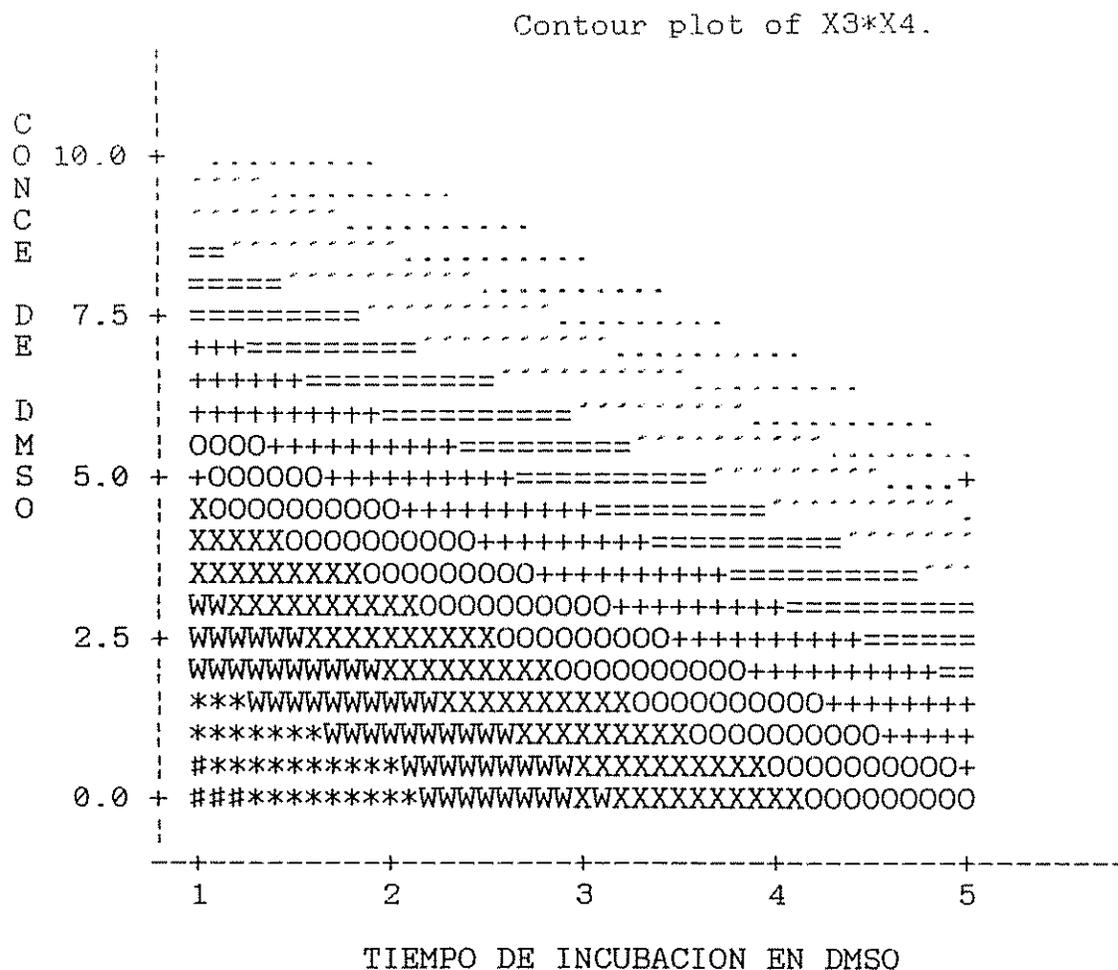


Figura 7. Viabilidad de embriones cigóticos en función de concentraciones y tiempo de incubación en DMSO. Con tiempo de exposición a 5°C por 30 minutos.

Símbolo	% viabili	Símbolo	% viabili	Símbolo	% viabili
.....	0 - 11	+++++	33 - 44	WWWWW	67 - 78
=====	11 - 22	OOOOO	44 - 56	*****	78 - 89
	22 - 33	XXXXX	56 - 67	#####	89 - 100

4.4 CONGELAMIENTO POR INMERSION DIRECTA EN NITROGENO LIQUIDO

Embriones cigóticos inmaduros congelados por inmersión directa en nitrógeno líquido, previa deshidratación en la cámara de transferencia no formaron callo ni germinaron.

Pretratamientos con 100 mg/l, 500 mg/l y 1000 mg/l de prolina, así como en 3mg/l de ABA en combinación con la deshidratación tampoco dieron resultados positivos con respecto a la germinación o formación de callo a partir de los embriones congelados. En ninguno de los casos se pudo recuperar los embriones o la obtención de callos .

Similares resultados se obtuvieron cuando se cultivaron los embriones en altas concentraciones de sacarosa y se deshidrataron en el flujo de aire, previo al congelamiento, y posteriormente se recuperaron en un medio nutritivo con 10 mg/l de GA3. Sin embargo, se pudo observar formación de callo (Figura 2D) en embriones congelados en nitrógeno líquido por inmersión directa, hasta un 70% , cuando éstos fueron previamente cultivados en medios nutritivos con incrementos de sacarosa en proporciones de 3%, 9%, 15% y 21%; con y sin ABA; a intervalos de 2 días y recuperados en un MS con 3mg/l de ANA (cuadro 5).

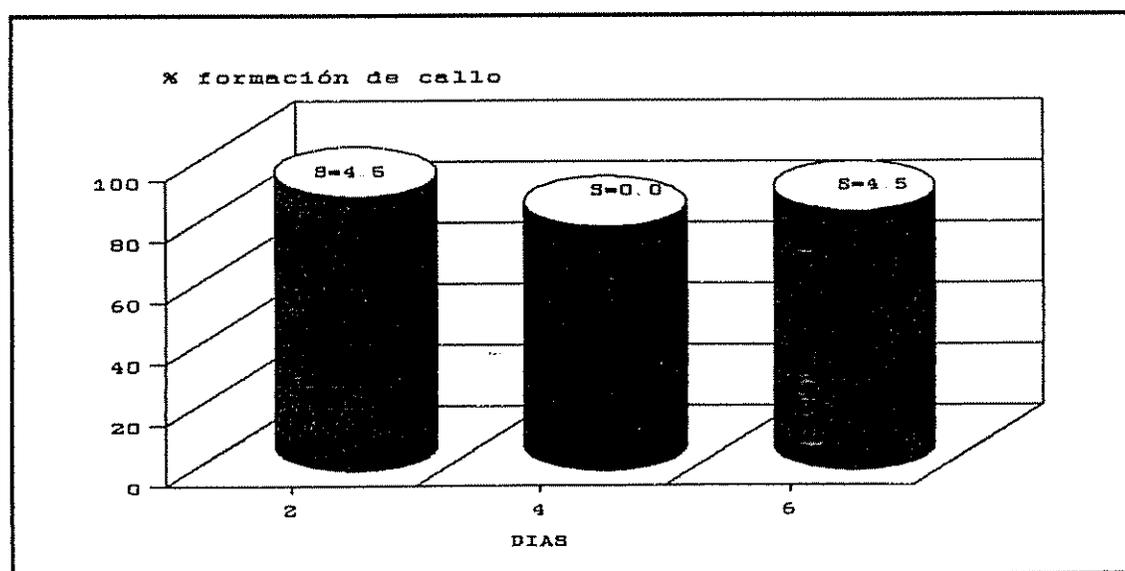


Figura 8. Formación de callo en embriones cigóticos inmaduros precultivados en altas concentraciones de sacarosa (3 a 21 %) a intervalos de subcultivos de 2, 4 y 6 días.

Este mismo comportamiento se observó con los embriones cultivados bajo las mismas condiciones del ensayo anterior, pero variando el intervalo de transferencia de una concentración a otra cada 4 o 6 días. La formación de callo para los tres intervalos de subcultivos fue alrededor del 80 %. En la figura 8 se puede observar que no hay una diferencia notoria en la formación de callos para los tres intervalos estudiados.

Cuadro 5. Recuperación en embriones cigóticos inmaduros de cacao congelados por inmersión directa en NL.

Ensayo	Pretratamiento	Total de embriones con callo	formación de callo en %
I	Incremento de sacarosa a 21% + ABA y 1 h. deshidratación.	0.0	0.0
II	Incremento de sacarosa a 21%.	21/30	70.0
III	Deshidratación de 1 a 12 horas.	0.0	0.0
IV	embriones sin contiledones + 4 h. deshidratación.	0.0	0.0
V	Incremento de sacarosa a 21% + ABA.	26/39	66.67
VI	Prolina + deshidratación por 4 horas.	0.0	0.0
VII	Incrementos de sacarosa en 0.3, 0.5 y 0.75 con deshidrataciones de 0.0, 0.5, 1.5 y 3 h.	0.0	0.0

4.5 TAMAÑO DEL EMBRION EN LA FORMACION DE CALLO

De acuerdo a los resultados obtenidos, el tamaño del embrión esta relacionado con su capacidad de formar callo después de haber permanecido almacenado en nitrógeno líquido. Cuando se utilizaron como pretratamiento incrementos de sacarosa de 3% a 21% a intervalos de 2 días (Figura 9) se pudo observar que a medida que se incrementó el tamaño del embrión a congelar se redujo el porcentaje de formación de callo ; así el mayor porcentaje de formación de callo se presentó con embriones de 2 mm.

Por otro lado, se observó la formación de raíces a partir de los callos después de 4 semanas de establecidos los embriones en el medio de recuperación (Figura 3D), pero no se encontró una relación entre la formación de raíces y el tamaño de embrión utilizado como explante.

4.6 EFECTO DE LA TEMPERATURA DE INCUBACION

Cuando se estudió el efecto de la temperatura de incubación en la formación de callo en embriones cigóticos inmaduros cultivados en concentraciones de 3% a 21% de sacarosa, previo al congelamiento, se encontró que temperaturas de 14°C redujeron la formación de callo. Encontrándose únicamente que un 20% de los embriones formaban callo (Figura 10).

No obstante, el mayor porcentaje de recuperación de los embriones, tomando como parámetro la formación de callo y según el análisis de regresión realizado, se dio a 20°C . Temperatura bajo la cual se obtuvo aproximadamente 85% de recuperación de los embriones congelados en forma de callo. Sin embargo, a partir de este punto se pudo observar que en la medida que se aumento la temperatura se redujo el porcentaje de producción de callo.

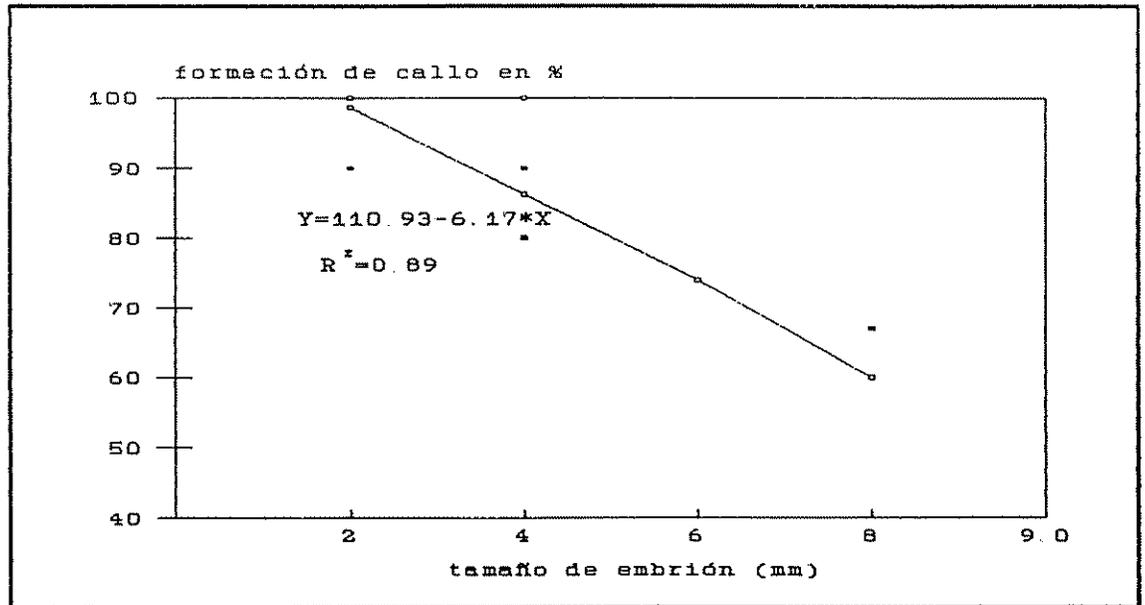


Figura 9. Relación entre el tamaño de los embriones cigóticos inmaduros de cacao congelados en nitrógeno líquido y la formación de callo

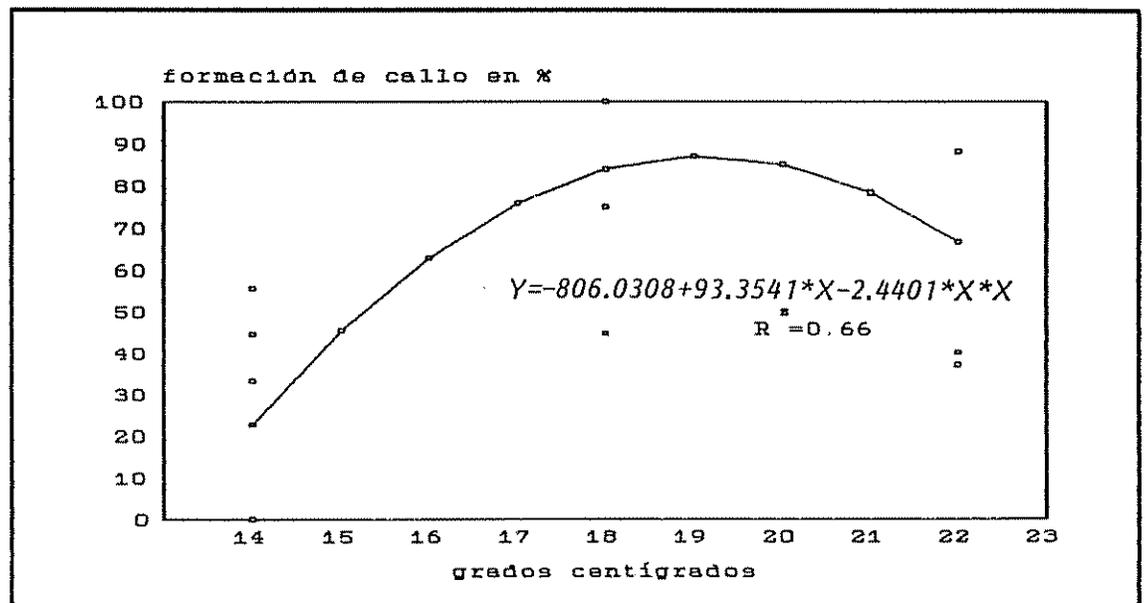


Figura 10. Efecto de la temperatura de incubación sobre la formación de callo en embriones cigóticos inmaduros de cacao.

4.7 EFECTO DEL pH DEL MEDIO DE CULTIVO

La recuperación a través de formación de callo en embriones cultivados en concentraciones altas de sacarosa y congelados por inmersión directa en nitrógeno líquido se vio afectado por el pH del medio de cultivo. En la figura 10 se puede notar como un pH ácido de 4.7 y un pH alcalino 7.7 no favorecieron la formación de callo. Por el contrario un pH de 5.7 permitió la formación de callo hasta un 80%.

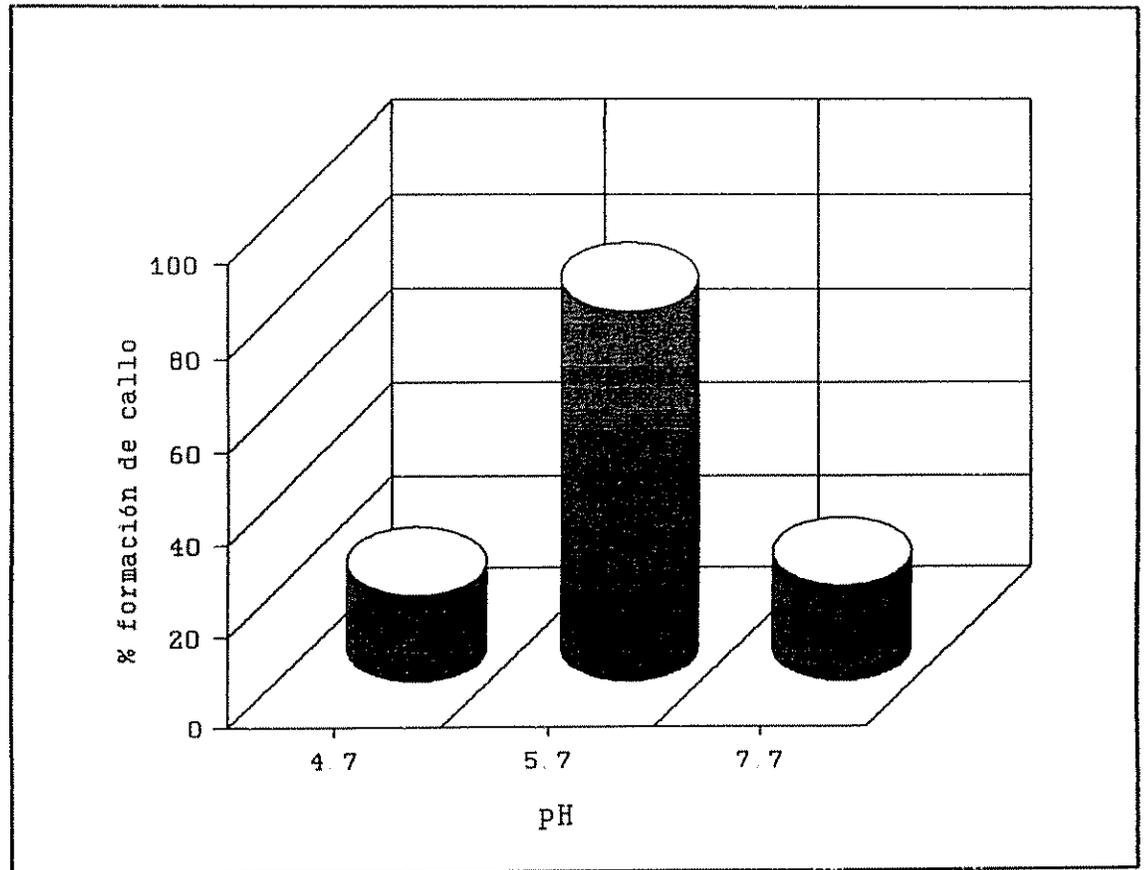


Figura 11. Efecto del pH sobre la formación de callo en embriones cigóticos inmaduros de cacao congelados en nitrógeno líquido.

4.8 CONGELAMIENTO LENTO

Los embriones cigóticos inmaduros de cacao también recibieron tratamientos con congelamiento lento. Para ésto se probaron diferentes velocidades de enfriamiento. Así, se pudo observar que cuando los embriones fueron congelados a tasas de $0.8^{\circ}\text{C}/\text{min}$ y $1.0^{\circ}\text{C}/\text{min}$ no se observó sobrevivencia, es decir, no se obtuvo germinación de éstos o formación de callos.

Por el contrario, cuando los embriones fueron congelados a velocidades de enfriamiento de $0.4^{\circ}\text{C}/\text{min}$ y $0.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ se logró obtener tasas de sobrevivencia, a través de la formación de callos, de 30% y 26% respectivamente (cuadro 6).

Por otro lado, embriones cigóticos inmaduros de 4 mm incubados en un medio MS + agua de coco por 3 días; transferidos posteriormente a un medio MS líquido con 1M de sacarosa en el que permanecieron 24 horas; congelados a una tasa de $0.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ hasta -40°C antes de ser almacenados en nitrógeno líquidos y recuperados en un MS con 3 mg/l de ANA. Lograron formar embriones somáticos (Figura 4D) en un 14% (cuadro 6).

La utilización de un tratamiento similar al mencionado anteriormente, pero variando la concentración de sacarosa en la que fueron incubados previo a la fase de congelamiento en 0.3M, 0.5M y 0.75M, no se obtuvo ninguna respuesta positiva en cuanto a la recuperación del material.

Cuadro 6. Recuperación de embriones cigóticos inmaduros de cacao crioconservados por congelamiento lento .

Ensayo	Pretratamiento	Formación de callo en %	Formación de embriones somáticos en %
I	Incremento de sacarosa 3, 9, 15 y 21 % + inmersión en una solución de DMSO al 20% y 1M sacarosa y una tasa de congelamiento de 0.5°C minutos.	30	—
II	Incremento de sacarosa 3, 9, 15 y 21 % + inmersión en una solución de DMSO al 20% y 1M sacarosa y una tasa de congelamiento de 0.4°C minutos.	26	—
III	Incremento de sacarosa 3, 9, 15 y 21 % + inmersión en una solución de DMSO al 20% y 1M sacarosa y una tasa de congelamiento de 0.8°C minutos.	0.0	0.0
IV	Incremento de sacarosa 3, 9, 15 y 21 % + inmersión en una solución de DMSO al 20% y 1M sacarosa y una tasa de congelamiento de 1.0°C minutos.	0.0	0.0
V	Precultivo de los embriones por 3 días en un MS con 1g/l de caseína hidrolizada+10% de agua de coco e incubación de éstos en un MS con 1.0M de sacarosa por 12 horas.	—	14.0
VI	Precultivo de los embriones por 3 días en un MS con 1g/l de caseína hidrolizada+10% de agua de coco e incubación de éstos en un MS con 0.75M de sacarosa por 12 horas.	0.0	0.0
VII	Precultivo de los embriones por 3 días en un MS con 1g/l de caseína hidrolizada+10% de agua de coco e incubación de éstos en un MS con 0.5M de sacarosa por 12 horas.	0.0	0.0

4.9 EFECTO DE LA SACAROSA Y EL ACIDO NAFTELENACETICO SOBRE LA FORMACION DE CALLO

En la figura 12 se observa como actuaron las concentraciones de sacarosa, incorporadas al medio de cultivo como pretratamiento, y las concentraciones de ANA, incorporadas al medio de recuperación, sobre la formación de callo en embriones cigóticos inmaduros congelados a una tasa de $0.4^{\circ}\text{C}/\text{min}$.

La mayor formación de callo se presentó cuando se utilizaron concentraciones de 3 mg/l de ANA y 12 g/l de sacarosa.

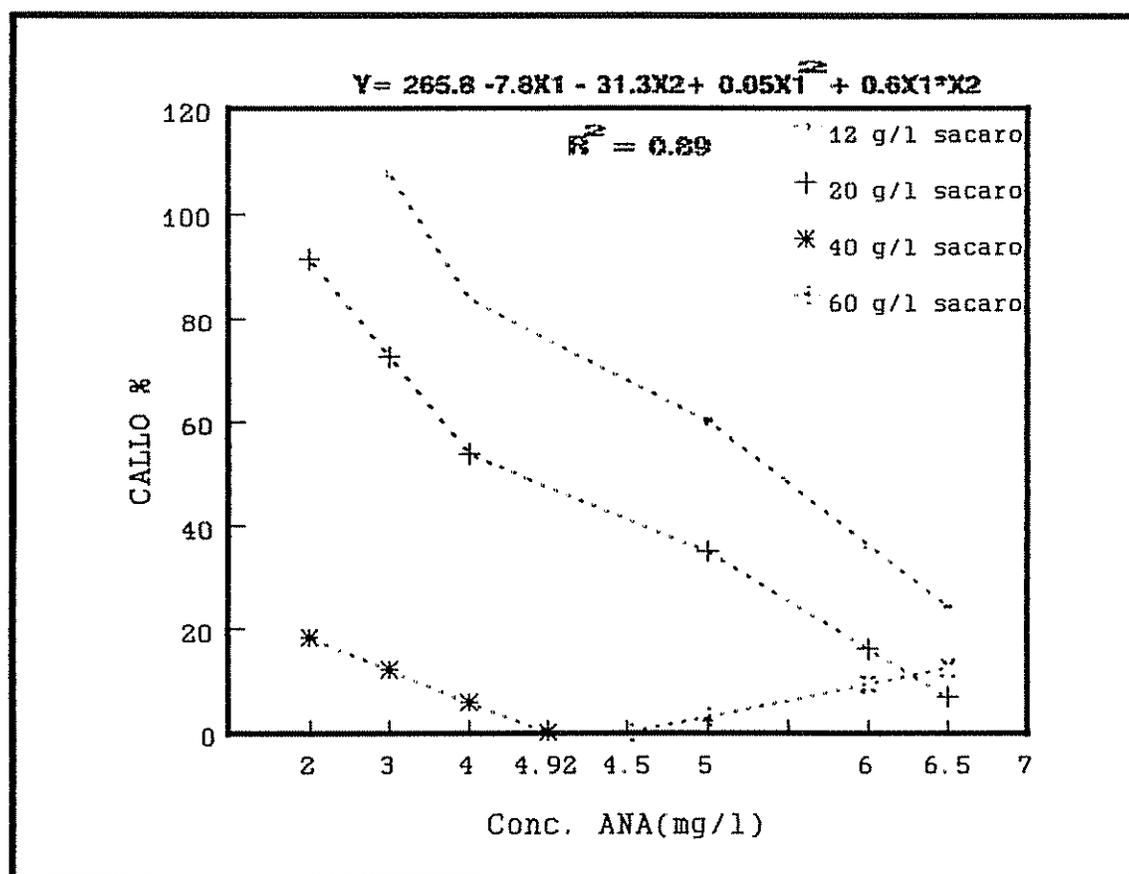


Figura 12. Efecto de la sacarosa y ANA en la formación de callo en embriones cigóticos inmaduros de cacao criocconservados en nitrógeno líquido.

4.10 CONGELAMIENTO DE EMBRIONES SOMATICOS

Las tasas de sobrevivencia de los embriones somáticos preservados en nitrógeno líquido por 48 horas son presentados en el cuadro 7. La tasa de sobrevivencia de estos corresponden al total de embriones germinados 12 semanas después de haber sido descongelados y establecidos en el medio de recuperación.

Los embriones somáticos del genotipo EET-183 precultivados en un MS líquido con 0.5M de sacarosa, crioprottegidos con una mezcla de DMSO y congelados por inmersión directa en nitrógeno líquido presentaron una tasa de sobrevivencia del 16% (Cuadro 7).

Asimismo, los embriones somáticos del genotipo POUND-12 precultivados en incremento de sacarosa e incubados en un MS líquido con 0.75M de sacarosa, en el que permanecieron 24 horas previo al congelamiento, a una tasa de 0.5°C/min, mostraron una de sobrevivencia del 20% (Cuadro 7). Un aspecto que hay que destacar es de que los embriones somáticos utilizados en para ambos ensayos presentaban sus tres estados de desarrollo globular, en forma de torpedo y en forma de corazón. Sin embargo, únicamente germinaron los embriones que se encontraban en un estado globular (Figura 4D).

Los embriones en un estado de torpedo y corazón se tornaron de un color café oscuro inmediatamente después de haber sido descongelados.

Por otra parte los embriones globulares germinados alcanzaron a las 16 semanas un tamaño de 1 cm (Figura 5D), aproximadamente, y después de 24 semanas de estar en el medio de recuperación se tornaron de un color café oscuro, necróticos y no desarrollaron, es decir no lograron alcanzar la formación de plántulas.

Cuadro 7. Recuperación de embriones somáticos de cacao congelados por inmersión directa en NL y por congelamiento lento.

Ensayo	Pretratamiento	germinación en %
I	Embriones somáticos EET-183 cultivados por 12 hora en MS con 0.5 M de sacarosa congelamiento rápido.	16
II	Embriones somáticos EET-183 cultivados por 12 hora en MS con 0.75 M de sacarosa congelamiento rápido.	0.0
III	Embriones somáticos EET-183 cultivados por 24 hora en MS con 0.1 M de sacarosa congelamiento rápido.	0.0
IV	Embriones somáticos Pound-12 cultivados por 24 hora en MS con 0.75 M de sacarosa 0.5 °C/min.	20.0

4.11 ESTUDIO HISTOLOGICO

El estudio histológico realizado sobre los embriones cigóticos inmaduros (Figura 6D) que fueron expuestos a los tratamientos mencionados en el acápite 3.14, y congelados en nitrógeno líquido demostraron que altas concentraciones de sacarosa permitían la recuperación de éstos en forma de callo. Con éste pretratamiento las células de los tejidos embrionarios no mostraron daños ocasionados por las ultrabajas temperaturas. En la figura 8D se puede apreciar una división celular muy pronunciada en tejidos embrionarios descongelados y cultivados en el medio de recuperación. Así mismo, embriones con el mismo tratamiento fueron capaces de desarrollar callo después de dos semanas de haber sido descongelados (Figura 9D).

Sin embargo este pretratamiento ocasiono un rápido desarrollo y madurez de los embriones lo cual se reflejó en la formación bien definida de los tejidos vasculares (Figura 7D).

Por el contrario, los embriones deshidratados al flujo de aire estéril de la cámara de transferencia mostraron que este tipo de pretratamiento ocasionó una marcada perdida del turgor de las células, observándose una total destrucción de las células de la epidermis (Figura 10D).

V DISCUSION

5.1 CONTENIDO DE AGUA Y EFECTO DE LA DESHIDRATAACION EN EMBRIONES CIGOTICOS INMADUROS DE CACAO

Los embriones cigóticos inmaduros de cacao presentaron altos niveles de agua en estado libre, variando entre un 85% y un 90% en relación a su peso fresco. Este porcentaje está por encima del contenido de agua reportado para la semilla de cacao, el cual según Swabrik (1965) es del 55%.

El hecho de que los embriones cigóticos inmaduros hayan presentado los niveles de agua mencionados anteriormente, se debe sobre todo al estado de desarrollo y madurez de éstos al momento de ser extraído de las mazorcas. La determinación del contenido de agua en los explantes a utilizar en el proceso de congelamiento es muy importante, sobre todo si se tiene en cuenta que el contenido de agua en semillas de especies recalcitrante está relacionado con el punto de deshidratación crítico en el cual la pérdida de agua comienza a causar daños sobre el poder germinativo.

Si bien es cierto, que no existen estudios en cuanto a la relación entre el contenido de agua y la capacidad germinativa en los embriones de especies recalcitrantes. La relación entre el contenido de agua en la semilla y la capacidad de germinar en especies recalcitrantes ha sido estudiada en varios cultivares.

El alcornoque (Quercus robur) y Dryobalanops aromática que poseen un 70% de agua en estado libre sufren daños cuando el contenido de agua en estado libre alcanza porcentajes de 35% o menores (Tamari, 1976).

La semilla de rambután (Nephelium lappaceum) en la cual el contenido de agua es de alrededor del 50%, se ve afectada en su capacidad germinativa cuando su contenido de agua es de 20% o menos (Chin, 1975).

El contenido de agua, en las semillas de la palma aceitera (Elaeis guinensis) es de 20% a 25% de su peso fresco y soporta deshidratación hasta un 10% de humedad sin que pierda su capacidad germinativa (Hardon, 1974).

Según Swabrick, (1965) y Hunter, (1959) la semilla de cacao es muy sensible a la pérdida de agua, y en el presente estudio se comprobó que esta característica se mantuvo en los embriones cigóticos inmaduros. Es decir, que existe una relación entre el contenido de agua en estado libre y la capacidad germinativa de los embriones cigóticos inmaduros. Así, cuando el porcentaje de agua fue menor del 61% (1 hora de deshidratación) comenzó a reducirse el porcentaje de germinación in vitro, produciéndose la pérdida total de la capacidad germinativa de los embriones cuando el contenido de humedad fue menor del 22% (5 horas de deshidratación).

Por otra parte, se pudo observar que embriones de cacao extraídos directamente de las mazorcas perdieron su viabilidad en la primera hora de deshidratación. Si embargo, se obtuvo una respuesta diferente cuando estos fueron precultivados en un medio MS por 3 a 4 días y posteriormente deshidratados. En este caso, el porcentaje de viabilidad disminuyó después de la tercera hora de deshidratación (80% de humedad).

A este respecto Withers (1983), reporta que la viabilidad de los materiales vegetales puede ser incrementada, en el proceso de crioconservación, si éstos son precultivados por 2 o 3 días en condiciones in vitro.

Este comportamiento posiblemente se deba a la acumulación de metabolitos, cambios morfológicos y fisiológicos que ocurren en las células, lo que permite que los embriones soporten mejor las condiciones de estrés a la que son sometidos en el proceso de congelamiento.

Este aspecto es muy importante ya que de acuerdo a la relación entre el contenido de humedad y la capacidad germinativa de la especie recalcitrante en estudio, se puede planificar una estrategia a seguir en las diferentes etapas de la criopreservación, con el objetivo de evitar disminuciones en la capacidad germinativa del material.

En relación a lo anterior, concentraciones altas de sacarosa y tiempos de deshidratación en el flujo de aire estéril de la cámara de transferencia provocaron una rápida disminución de la capacidad germinativa de los embriones. Así, cuando se precultivaron los embriones en la concentración más alta de sacarosa (1M), los embriones perdieron su capacidad germinativa, rápidamente, después de ser deshidratados 0.5 horas, presentándose una pérdida total de la germinación en los embriones deshidratados por 3 horas.

Por otra parte, cuando se utilizó el aminoácido prolina y la fitohormona ABA (ácido abscisico) en la fase de precultivo combinados con posteriores deshidrataciones, no se observaron efectos benéficos de protección contra el efecto negativo de la deshidratación.

No obstante, hay que tener presente que altos contenidos de agua en las células vegetales son letales durante el congelamiento, debido a la formación de cristales de hielo que rompen las membranas celulares provocando daños irreversibles. Este aspecto ha sido claramente demostrado mediante

investigaciones con semillas ortodoxas y recalcitantes. Así, Fedosenko (1974); Sakai y Noshira (1975) y Omura *et al.* (1978), estiman que altos contenidos de agua ocasionan la muerte de las semillas antes que éstas alcancen 0°C.

Se ha comprobado también que las semillas ortodoxas requieren de contenidos de humedad por debajo del 9% para poder ser exitosamente criopreservadas en nitrógeno líquido (Roberts, 1972). Experimentos realizados en las últimas décadas con semillas ortodoxas y semirecalcitantes han validado este planteamiento: Mora (1990); Abdelnour-Esquivel *et al.* (1992) reportan que los embriones de Musa acuminata y Musa balbisiana resisten la deshidratación y que a su vez este procedimiento proporciona una adecuada protección contra las ultrabajas temperaturas. Similares resultados se obtuvieron con embriones cigóticos de la palma aceitera (Elaeis guinensis) (Grout *et al.*, 1983); palma datilera (Phoenix dactylifera var zahidi) (Al-Madeni y Tisserat, 1986); veitchia y howea (Chin *et al.*, 1988); tomate (Lycopersicum esculentum) (Grout *et al.*, 1986); araucaria, (Araucaria hunstenia Schum) (Pritchard y Prendergast, 1986); caucho (Normah *et al.*, 1986) y café (C. canephora y C. arabica) (Abdelnour-Esquivel *et al.* 1992). Estos últimos pudieron ser deshidratados hasta un 16% de humedad sin que se afectara su capacidad germinativa.

En cacao, un alto grado de deshidratación ocasionó un 100% de pérdida en la capacidad germinativa de los embriones. Aunque, embriones deshidratados por 5 horas y congelados por inmersión directa en nitrógeno líquido presentaron un 28% de embriones viables, según la prueba de viabilidad con tetrazolio. Contrariamente, este pretratamiento no permitió la recuperación de los embriones a través de su germinación directa, ni a través de la formación de callo.

Si bien es cierto y como se explicó anteriormente, la deshidratación ha sido reportada por muchos autores como un procedimiento adecuado para la crioconservación de embriones y semillas de especies ortodoxas y de algunas especies recalcitrantes, los resultados obtenidos en este trabajo indicaron que no es así para los embriones cigóticos inmaduros de cacao.

Este comportamiento posiblemente se deba a que en el proceso de deshidratación es removida agua biológicamente funcional o estructuralmente importante, que hacen que en el proceso del descongelamiento precipiten las proteínas o entren en contacto entre si; y formen ligamientos anormales que provoquen la ruptura de éstas y por ende el colapso de las células. Otra posibilidad es que en el proceso de crioconservación se formen metabolitos secundarios que inhiban la división celular y recuperación de los embriones. Posiblemente, la utilización de medios nutritivos más complejos que los utilizados en este trabajo para la germinación de los embriones en la fase de recuperación permitan el desarrollo del eje embrionario.

Por otra lado, fue posible observar que la deshidratación con altas concentraciones de sacarosa permitieron un 100% de germinación en los embriones. Lo que dio la posibilidad de extraer agua de los embriones sin causar daños en su capacidad germinativa.

5.2 EFECTO DEL DMSO Y SACAROSA SOBRE LA VIABILIDAD DE LOS EMBRIONES CIGOTICOS INMADUROS

El DMSO es uno de los principales crioprotectores utilizados en la fase de precultivo y crioprotección, para prevenir el daño durante el proceso de congelamiento.

Este crioprotector actúa formando cadenas múltiples de hidrógeno con el agua y los fosfolípidos de las membranas celulares generando una cubierta que reduce la permeabilidad de éstas.

También estos enlaces permiten que el DMSO actúe como anticongelante, reduciendo el tamaño y la formación de los cristales de hielo y aumentando la concentración de solutos a un grado que no son osmóticamente dañinos.

Existen numerosos ejemplos para los que esta sustancia ha sido beneficiosa, entre ellos: Atropa belladonna (Nag Y Street, 1975); Catarantus roseus (Kantha *et al.*, 1980) y fresa (Kantha *et al.* 1980). También ha sido reportado que el DMSO tiene efectos negativos sobre la viabilidad de otras especies. Este fue el caso del cacao, para el cual efecto del DMSO resultó ser negativo sobre la viabilidad de los embriones cigóticos inmaduros.

Cuando los embriones fueron cultivados aún, por períodos cortos (30 minutos), en 5% de DMSO el porcentaje de viabilidad se redujo en un 12%. Concentraciones y períodos de incubación mayores fueron letales.

Según Bajaj *et al* (1970), las altas concentraciones de DMSO inhiben la respiración y reducen la síntesis de ARN y proteínas, lo que podría explicar el efecto negativo de este compuesto sobre algunas especies, como fue el caso del cacao.

Aunque el DMSO tuvo un efecto negativo sobre la viabilidad de los embriones cigótico, su combinación con la sacarosa presentó un efecto totalmente diferente. Obteniéndose porcentajes de viabilidad de un 100% cuando se utilizó una concentración del 10% de DMSO combinado con sacarosa. Posiblemente, esta respuesta sea debió a que la combinación

sacarosa DMSO forma un complejo que tiene un modo de acción totalmente diferente y que hace que éste complejo no inhiba la actividad respiratoria ni la síntesis de proteínas, de tal manera que cuando el DMSO se utilice como crioprotector con embriones de cacao debe hacerse combinado con sacarosa u otro crioprotector.

5.3.EFECTO DEL TIEMPO DE EXPOSICION DE LOS EMBRIONES A 5°C

Del ensayo de superficie de respuesta en el que se estudiaron la deshidratación, el tiempo de incubación, la concentración de DMSO y el tiempo de exposición de los embriones a 5°C, se pudo corroborar nuevamente el efecto negativo de la concentración y el tiempo de incubación en DMSO.

Además, se pudo observar que el tiempo de exposición, de los embriones precultivados en DMSO, a 5°C incrementaron la viabilidad de éstos. De los tres tiempos estudiados el intermedio, 30 minutos, resultó ser el mejor el cual incrementó significativamente la viabilidad de los embriones

A éste respecto algunos investigadores estiman que, pérdidas considerables en la viabilidad pueden resultar de la aplicación de crioprotectores, pero la adición de bajas concentraciones y periodos de incubación limitados (por ejemplo una hora) y exposición de los materiales a bajas temperaturas minimizan estas pérdidas (Nag y Street, 1977).

Otros expertos opinan al respecto, que la contribución en evitar la pérdida de la viabilidad mediante la exposición de los explantes a bajas temperaturas es mínimo y tiempos prolongados de exposición podrían no tener efectos benéficos (Sakai y Sugawara, 1973).

Este comportamiento parece reflejarse en los embriones de cacao, los cuales presentaron un incremento relativamente alto en su sobrevivencia al exponerlos a 5 °C durante un período de 30 minutos.

5.4 CRIOCONSERVACION DE EMBRIONES CIGOTICOS INMADUROS DE CACAO

La recuperación de los embriones cigóticos congelados directamente en nitrógeno líquido fue posible mediante el uso de altas concentraciones de sacarosa en el medio de precultivo.

En la mayoría de los casos la sobrevivencia fue evidente mediante la formación de callo y en uno de los métodos de congelamiento desarrollados se logró la obtención de embriones somáticos, vía embriogénesis somática directa.

La sacarosa, utilizada como crioprotector, ha sido utilizada con éxito en varias especies: gardenia (Gardenia grandiflora) ; col (Brassica oleracea) (Sakai y Yoshida, 1968); cerezo (Tumanov et al., 1968); sicamores y soya (Pritchard et al., 1986).

Sin embargo hay reportes de que la sacarosa ha tenido un efecto negativo. Según Bajaj y Reinert (1977), concentraciones mayores de 0.75M pueden causar plasmólisis y daños considerables; Mora(1990), encontró que concentraciones altas de sacarosa reducen en un 50 % la viabilidad en los embriones de Musa.

Los embriones cigóticos de cacao, respondieron adecuadamente a los pretratamientos con sacarosa. Los mayores porcentajes de formación de callo después del congelamiento se obtuvieron al subcultivar los embriones en concentraciones crecientes sacarosa (3%, 9%, 15% y 21%) obteniéndose porcentajes de 100 % cuando el congelamiento fue rápido.

Es importante resaltar que se pudo obtener recuperación del material vegetal a través de embriogénesis somática directa. En este caso el pretratamiento consistió en la incubación de los embriones en un MS líquido con 1.0M de sacarosa por 12 horas. Luego, fueron congelados a una tasa de 0.5 °C/min hasta -40 °C antes de ser almacenados en nitrógeno líquido.

La protección proporcionada por la sacarosa podría deberse a que ésta ocupa el espacio dejados por el agua entre las proteínas evitando de esta manera que las proteínas tengan contacto entre si durante el descongelamiento, o debido a que su presencia le da una mejor estructura a las membrana celulares evitando que estas pierdan su propiedad de selectividad.

sin embargo, es importante destacar que altas concentraciones de sacarosa presentan el inconveniente que estimulan el desarrollo de los embriones (estado de madurez) lo que ocasiona que el explante pierda capacidad embriogénica (Pence *et al.*, 1979).

5.5 FACTORES QUE AFECTAN EL DESARROLLO DE CALLO A PARTIR DE EMBRIONES CIGOTICOS CONGELADOS POR INMERSION DIRECTA EN NITROGENO LIQUIDO.

El precultivo de los embriones en altas concentraciones de sacarosa (3%, 9%, 15% y 21%) permitió la sobrevivencia de los embriones en forma de callo (70%) cuando se utilizó congelamiento rápido. No obstante, la formación de callos estuvo vinculada a factores como el tamaño del embrión, temperaturas de incubación y pH del medio de cultivo.

5.5.1 EFECTO DEL TAMAÑO DEL EMBRION

El tamaño de embrión más adecuado, para obtener recuperación como callo resultó ser 2mm.

Quizás el hecho de que los embriones estén en un estado de desarrollo juvenil y las células no se encuentren tan diferenciadas permitieron que los pretratamientos utilizados hayan sido homogéneos y se evite de esta manera que las células con mayor grado de diferenciación degeneren durante el proceso de congelamiento y generen sustancias que inhiban la división celular en la fase de recuperación. A este respecto Sun (1958) reporta que semillas de arvejas de 7 a 12mm presentaron mayores tasas de sobrevivencia que semillas de 13 a 20mm y semillas de 21 a 30mm. Contrario a los resultados, observados en arveja, embriones de café en un estado de mayor madurez (tanto rojo como amarillo) presentaron mayores resultado de sobrevivencia, con pretratamiento de deshidratación que frutos inmaduros (verdes). Aunque la mayores tasas de recuperación se lograron mediante la incorporación de GA3 en el medio de cultivo (Abdelnour -Esquivel *et al.*, 1992).

5.5.2 TEMPERATURA DE INCUBACION

Para algunas especies como Dianthus carvophyllus, la incubación durante la etapa de precultivo en bajas temperaturas ha sido favorable (Seibert y Wetherbee, 1977). Sin embargo, para el cacao este tipo de tratamiento no resultó positivo, ya que mediante el análisis de regresión realizado se pudo observar que la temperatura de 20°C fue la más adecuada para la fase de precultivo. En tanto que temperaturas menores producen una disminución abrupta sobre la tasa de recuperación.

Este comportamiento de los embriones es muy similar al de la semilla la cual no sobrevive a temperaturas por debajo de 10°C (Bajpai y Trivedi, 1961; Chacko y Singh, 1971).

5.5.3 pH DEL MEDIO DE CULTIVO

Cambios en el pH provocan la desnaturalización de la proteínas por la alta acumulación de electrólitos (Maryman, 1966).

Lovelock (1957) ha sugerido que muchos de los enlaces covalentes de proteínas y lipoproteínas son muy débiles por lo que se rompen en el proceso de congelamiento esto probablemente se deba a cambios en la concentración de solutos y modificaciones del pH. También Lovelock (1953); citado por Lovelock (1957) demostró que altas concentraciones de sales producían pérdidas de fosfolípidos de las membranas celulares con la subsecuente permeabilidad de éstas

Farrant (1965) que el balance de electrólitos es necesario para la recuperación de tejidos crioconservados.

El pH en el que tuvo mejores resultados en la formación de callo fue de 5.7, con un porcentaje del 80%. Generalmente este pH es utilizado en cultivo de tejidos .

5.6 EFECTO DE LA SACAROSA Y ANA SOBRE LA FORMACION DE CALLO EN EMBRIONES CIGOTICOS

Este ensayo reveló que estas dos sustancias son importante para la recuperación de los embriones en forma de callo. La sacarosa es importante tanto para proteger los embriones contra el daño ocasionado por las ultrabajas temperaturas, como para estimular la División celular. El ANA es importante para estimular la formación de callo y embriones somáticos.

Ahora bien, la respuesta de formación de callo se obtuvo cuando se utilizaron bajas concentraciones, de sacarosa (12g/l) y una cantidad intermedia de ANA (3mg/l). La concentración de ANA que dio mejor resultado en este ensayo

son similares a los reportados por Aguilar (1990); Pence (1979) y Duhem *et al.*, (1989).

Con respecto a las concentraciones de sacarosa, aunque la literatura generalmente reporta que las altas concentraciones de sacarosa favorecen la formación de callos embriogénicos (Ammirato *et al.*, 1971); ocurrió lo contrario con embriones cigóticos inmaduros de cacao .

A este respecto Pence *et al.* (1981), reporta que las altas concentraciones de sacarosa estimula el desarrollo y madurez de los embriones con la consecuente pérdida de la capacidad embriogénica de éstos. Este hecho fue observado mediante el análisis histológico realizado.

5.7 CRIOCONSERVACION DE EMBRIONES SOMATICOS

De acuerdo a los resultados obtenidos en ésta investigación, quedó demostrado que la crioconservación de embriones somáticos de cacao , como alternativa para establecer bancos de germoplasma de cacao a largo plazo, es factible.

Cuando se pretrató el genotipo EET-183 con sacarosa y se utilizó la mezcla sacarosa-DMSO como crioprotector se observó la recuperación de los embriones, mediante su germinación directa, tanto cuando se utilizó el método de congelamiento rápido (16% de sobrevivencia) como el congelamiento lento (20% de sobrevivencia).

El período bajo el cual se pudo observar la recuperación de los embriones fue entre 2 a 3 meses y un desarrollo más determinante se presentó después de 5 meses de haber cultivado los embriones en el medio de recuperación. En pocos embriones se pudo observar la formación de embriones auventicios.

Por otra parte, los embriones que germinaron se tornaron color café oscuro y necróticos, sin que se lograra la formación de plantas completas "vitro plantas". A este respecto, Seibert y Wetherbee (1977) observaron un fenómeno similar después del descongelamiento en meristemas de clavel: en los cuales 35% a 45% no lograron formar planta. Sin embargo, se han obtenidos resultados positivos de crioconservación en embriones somáticos, como es el caso de la palma aceitera, en la cual un congelamiento lento permitió una tasa de recuperación más alta que el congelamiento rápido por inmersión directa en nitrógeno líquido.

El hecho que el congelamiento lento permitiera una mayor tasa de sobrevivencia en los embriones somáticos, posiblemente se deba a la forma en que ocurra el proceso de formación de hielo.

Para algunos materiales determinados las tasas de congelamiento en las cuales pueden sobrevivir son muy estrechas. tal parece ser el caso para los embriones de cacao.

Por ejemplo, en el caso de meristemas de fresa la tasa óptima de congelamiento, que asegura un 95% de sobrevivencia es de 0.84 °C/min. La sobrevivencia cae por debajo de 33% cuando se incrementa la tasa de congelamiento a 0.95 °C/min. Así mismo, Embriones somáticos de zanahoria únicamente ha sido posible crioconservarlos mediante la utilización de tasas de congelamiento lentas (Withers, 1979).

La reducida tasa de sobrevivencia de los embriones somáticos de cacao tanto a tasas de congelamiento lento como congelamiento rápido, podría deberse al alto contenido de agua en los embriones, los cuales requieren de un acondicionamiento vital para la sobrevivencia o al hecho de

que una vez que éstas son descongeladas el daño que presentan es tan severo que requieren de una recuperación lenta y no de un medio nutritivo que force una inmediata división celular que ponga de manifiesto el crecimiento y desarrollo de los embriones.

VI CONCLUSIONES

- 1.- La criopreservación, tanto de embriones cigóticos como somáticos, es potencial para la preservación de germoplasma de cacao a largo plazo.
- 2.- El uso de altas concentraciones de sacarosa como regulador osmótico resultó ser benéfico para provocar la deshidratación.
- 3.- La deshidratación al flujo de aire estéril de la cámara de transferencia resultó ser un factor negativo para la preservación de los embriones cigóticos inmaduros de cacao.
- 4.- El contenido de agua de los embriones es muy alto, por lo que es necesario el uso de mecanismos que permitan reducir el contenido de agua en estado libre sin afectar la viabilidad de los embriones.
- 5.- Embriones cigóticos de 2mm y embriones somáticos en estado globular mostraron ser los materiales más adecuados para la criopreservación.
- 6.- El congelamiento lento resultó ser el más adecuado para los embriones somáticos.
- 7.- El pH en el que se obtuvo la mayor formación de callo en los embriones cigóticos inmaduros congelados en nitrógeno líquido fue de 5.7.
- 8.- La utilización de bajas temperaturas en la fase de precultivo resultó ser negativa sobre la recuperación de los embriones congelados por inmersión directa en NL. 20°C temperatura óptima en la fase de precultivo.

9- El DMSO sin mezclar con otros crioprotectora resultó letal para los embriones cigóticos inmaduros.

10.- La exposición de los embriones a 5°C por 30 minutos en la fase de crioprotección incrementó la viabilidad de los embriones cigóticos inmaduros.

VII RECOMENDACIONES

- 1.- Realizar estudios del efecto del DMSO combinado con otros crioprotectores.
- 2.- Ensayar el congelamiento de embriones cigóticos y somáticos de cacao con otros programas de congelamiento lento
- 3.-Realizar estudios que permitan mejorar la obtención de embriones somáticos a partir de los embriones cigóticos inmaduros.
- 4.- Profundizar estudios histológicos en los embriones cigóticos inmaduros y somáticos congelados en nitrógeno líquidos.
- 5.- Estudiar otros medios de cultivo para la recuperación de los embriones cigóticos y somáticos.

VIII BIBLIOGRAFIA

- ABDELNOUR-ESQUIVEL, A.; MORA, A. Y VILLALOBOS, V. 1992a.
Cryopreservation of zygotic embryos of *Musa acuminata* (AA)
an *M balbisiana* (BB). *Cryo Letters* 13:159-164.
- ABDELNOUR-ESQUIVEL, A.; VILLALOBOS, V. Y ENGELMANN, F. 1992b
Cryopreservation of zygotic embryos of *Coffea spp.* *Cryo*
Letter 13:159-164.
- ADU-AMPOMAH, Y., NOVAK, F.J., AFZA, R., VAN DUREN, M. 1987.
Embryoid and plant production from cultured cocoa
explants. *In International Cocoa Research Conference* (10,
1987, Santo Domingo, Republica Dominicana). PP 129-142.
- AGUILAR, M.E. 1990. Obtención de plantas de cacao (*Theobroma*
cacao L.) a partir del microinjerto de embriones
somáticos. Tesis Mag. Sc. Turrialba, Costa Rica. 131 p.
- AL-MADENI, M. A. Y TISSERAT, B. 1986. Survival of palm seed
uder cryogenic conditions. 1986. *Seed-Sci & Technol.*
14:79-85.
- ALLEN, J.B. and LASS, R.A. 1983. London cocoa trade Amazon
project: Report, phase 1. *Cocoa Growers Bulletin*, no. 34.
- AMMIRANTO, P.V. 1989. Recent progress in somatic
embryogenesis. *Newsletter, International Association for*
Plant Tissue Culture 57:1-27.
- ANG, B.B. 1976. Problem of rubber seed storage. *In seed*
technology in the tropics. Eds Chin H.F., Enoch i.c. y
Raja Harun R.M. University Pertanian Malaysia, Malaysia.
pp 117-122.
- BAJAJ, Y.P.S. 1976. Regeneration of plants from cell
suspensions frozen at -20°C , -70°C , and -196°C .
Physiol.Plan. 37: 263-268.

- BAJAJ, Y.P.S. 1981. Regeneration of plant from ultra-low frozen anthers of *Primula obconica*. *Sci. Hor.* 14:93-35.
- BAJAJ, Y.P.S.(1984) The regeneration of plants from frozen pollen embryos and zygotic embryos of wheat and rice. *Theor, Appl. Gen.* 67:525-528.
- BAJAJ, Y.P.S.; RATHORE, V.S.; WITWER, S.H. Y ADAMS, M.W. 1970. Effects of dimethyl sulfoxide on zinc⁶⁵ uptake, respiration and RNA and protein metabolism in bean (*Phaseolus vulgaris*) tissue. *An. J. Botany.* 57:794-799.
- BAJPAI, P.N. and TRIVEDI, R.K. 1961. Storage of mango seed stone. *Horticultural Advances* 5:228-229.
- BARTON, L.V. 1945. Respiration and germination studies of seed in moist storage. *Annals of New York Academy of Science* 46:185-200.
- BARTON, L.V. 1965. Viability of seed of *Theobroma cacao* L. *Contributions from the Boyce Thompson Institute* 23:109-122.
- BERG, B.O. 1975. Avocados. *In* advances in fruit breeding. Eds. J. Janick and J.n. Moore, pp 541-567.
- BOROUGHES, H. and HUNTER, J.T. 1961. Efecto de la temperatura sobre el crecimiento de semillas de cacao. *Turrialba* 11:160.
- BOROUGHES, H. and LABARCA, C. 1962. Factors affecting cacao germination. *Turrialba* 12:210-212
- BOROUGHES, H. and HUNTER, J.R. 1963. The effect of temperature on the germination of cocoa seed. *Proceedings of the American Society for Horticultural Science* 82:222.
- BOUHARMONT, P. 1971. La conservation des graines de cafeir destinees a la multiplication au cameroun. *Cafe, Cacao, The* 3:202.

- BUCHEIM, J.A., COLBURN, S.M., RANCH, J.P. 1989. Maturation of soybean somatic embryos and the transition to plantlet growth. *Plant Physiology* 89:768-775.
- BUTTON, J., BORNMAN, C.H. Y HACKLAND, B.A. 1971. Effect of some presowing treatments on the germination of *Poncirus trifoliata* and Troyers citrange seeds. *The Citrus and Subtropical Fruit Journal*. 45:9-11.
- CHACKO, E.K. and SINGH, R.N. 1971. Studies on the longebity of papaya, phalsa, guava and mango seeds. *Proceedings of International. Seed Testing Association*. 36:147-158.
- CHIN, H.F. 1975. Germination and storage of rambutan (*Nephelium lappaceum* L) seed. *Malaysian Agricultural Research*. 4:173-180.
- CHIN, H. F.; KRISHNAPILLAY, B. Y ALANG, Z.C. 1988. Cryopreservation of Veitchia and Howea palm embryos: Non-development of the haustorium. *Cryo Letters* 9:372-379.
- CHRISTENSEN, C.M. 1972. Microflora and seed deterioration. In "viability of seeds". Eds. E.H. Roberts, Chapman and Hall Limited, London. pp 59-93.
- CONGER, B.V. 1982. Cloning agricultural plants *in vitro* technique. Boca Raton, Florida, CRC PRESS. pp 1-41.
- CUBILLOS, G. 1990. Producción y consumo. El cacaotero colombiano. 13:5-11.
- DUHEM, K., LE MERCIER, N., BOXUS, P. 1989. Données nouvelles sur l'induction et le developpement d'embryons somatique chez *Theobroma cacao* L. *Café, Cacao, The* 33:9-14.
- ESAN, E.B. 1975. Tissue culture studies on cacao (*Theobroma cacao* L.). A supplementation of current research. pp. 116-125. V. International cocoa research conference, Ibadan, Nigeria.

- ESQUINAS ALCAZAR, J. 1983. Los recursos fitogenéticos: una inversión segura para el futuro. Instituto Nacional de Investigación Agraria, Madrid, España. 44 p.
- EVANS, H. 1953. The preservation of cacao seed for transport purposes. *In* A Report of Cacao Research, 1945-1951, p 79. Imperial college of Tropical Agriculture, Sn. Augustine, Trinidad.
- FALCONER, D.S. 1964. Introduction to quantitative genetics. Oliver and Boyd, London. 365 p.
- FAO. 1990. Estado mundial de la agricultura y la alimentación. 223 p.
- FARRANT, J. 1965. Mechanism of cell damage during freezing and thawing and its prevention. *Nature*, Lond. 205: 1284-1937.
- FEDOSENKO, V.A. 1974. Pollen and seed storage at negative temperatures. *Bulletin of Applied Biology, Genetics and Plant Breeding* 51:202-209.
- FINKLE, B.J. Y ULRICH, J.M. 1983. Protocols of criopreservación. *In* Handbook of Plant Cell Culture. Ed. por Evan, d.a., Sharp, w.r, Ammiranto, P.V. y Yamada, Y. McMillan Publishing, New York, v.1, pp 806-815.
- FRANKEL, O.H. 1970. Genetic consevation in: "Perspective. *In* genetic resources in plants". Eds. Frankel O.H. and Bennett E. IBP Handbook no.11, Blackwell Sc Pub. pp 469-489.
- FRIEND, R.J. 1964. Some experiments on the storage of cacao seed in a viable condition. *Papua and New Guinea Agricultural Journal*. 17 (1):12-18.
- GARDENER, R.C.B. 1937. Storage of acorns. *Quaterly Journal of Forestry* 31:32-33.

- GROUT, B.W.W. 1986. Embryos culture and cryopreservation for the conservation of genetic resources or species with recalcitrant seed. *In* plant tissue culture and its agricultural applications. Eds. L. A. Withers and P.G. Alderson. London. pp 303-309.
- GROUT, B.W.W., HENSHAW, G.G. 1978. Freezen-preservation of potato shoot-tip culture. *Annals Botany* 42: 1227-1229.
- GROUT, B.W.W., SHELTON, K. and PRITCHARD, H.W. 1983. Orthodox behaviour of oil palm seed and cryopreservation of the excised embryo for genetic conservations. *Ann. Bot.* 52: 381-384.
- GROUT, B.W.W. 1979. Low temperature storage of imbibed tomato seed: a model for recalcitrant seed storage. *Cryolett* 1: 71-76.
- HAALAND, P. D. 1989. Experimental design in biotechnology. Marcel Dekker, New York, E.U. 259 p.
- HARDON, J.J. 1974. Oil palm (*Elaeis guinensis*). *In* handbook of plant introduction in tropical crops. Plant Production and Protection, Division, Food and Agriculture Organisation of the United Nation, Roma. no 93.
- HARRINGTON, J. F. 1963. Practical advice and intructions on seed storage. *Proceeding of the International Seed Testing Association* 28: 989-994.
- HAWKES, J.G. 1979. Genetics poverty of the potato in Europe. *in* Proc. Conf. (Broadening the genetics base of Crops). Eds. Seven, A.C. y Van Harten, A.M. PUDOC, Wageningen: 19:28.
- HENSHAW, G.G. and GROUT, B.W.W. 1977. Conservattion the long-term storage or plant tissues by means of meristem culture and others *in vitro* techniques. 139th. Annual meeting of the British Association for the advancement of Science. University of Aston, England.

- HU, C.; WANG, P. 1986. Embryo culture: Technique and applications. In Handbook of plant cell culture. Eds. D.A. Evans; W.R. Sharp y P.V. Ammirato. New York, Macmillan Publishing company. Vol. 4. pp 43-95.
- HUNTER, J.R. 1959. La germinación de *Theobroma cacao*, Costa Rica, Turrialba 4:1-9.
- HUXLEY, P.A. 1964. Investigation on the maintenance of viability of robusta coffee seed in storage. Proceedings of the International Seed Testing Association 29:423-444.
- IBANEZ, M.L. 1964. The cultivation of cacao embryos in sterile culture. Tropical Agriculture (Trin.) 41 :325-328.
- IBANEZ, M.L. and CASO, I.A. 1965. The pause effect in cold death of cacao seed. Turrialba 15(2):140-141.
- IBPGR. 1976. Report of IBPGR working group on engineering, design and cost aspects of long-term seed storage facilities. AGP:IBPGR/76/25, FAO, Roma. 19 p.
- IBPGR. 1979. The storage of recalcitrant seed. Achievements and possible approaches. AGP/IBPGR/79/44, FAO, Roma.
- IBPGR. 1980. Working group on genetic resources of cocoa. AGP/IBPGR/80/56, FAO, Roma.
- IBPGR. 1983. IBPGR Advisory committee on *in vitro* storage: Report of the first meeting. IBPGR/AGP/82/84, FAO, Roma.
- IBPGR. 1983. IBPGR Advisory Committee on *in vitro* Storage: Report of the first meeting. AGP\IBPGR\82\84, IBPGR, Roma.
- ICCO. 1992. Boletín trimestral de estadísticas de cacao. 18:2.
- JAYNES, R.A. 1969. Long term storage of chestnut seed and scion wood. 6th Annual Report of the Northern Nut Growers Association, East Lansing, Michigan, 38-42.

- JENSEN, L.A. 1971. Observation on the viability of borneo camphor *Dryobalanops aromatica* Gaertn. Proceedings of the International Seed Testing Association. 36(1):141-146.
- KARTHA, K.K., LEUNG, N.L. Y GAMBORG, O.L. 1979. Freeze preservation of pea meristems in liquid nitrogen and subsequent plant regeneration. *Plant Science Letters* 15:7-15.
- KARTHA, K.K. 1981. Meristem culture and cryopreservation: Methods and applications. *In plant tissue culture: Methods and applications in agriculture*. Ed. por Thorpe T.A. Academic Press, New York. pp 181-211.
- KARTHA, K.K., LEUNG, N.L, GLAUDET-LA PRAIRIE, P. Y CONSTABEL, F. 1982. Cryopreservation of periwinkle, *Catharanthus roseus* cell cultured *in vitro*. *Plant Cell Reports* 1:135-138.
- KARTHA, K.K., LEUNG, N.L. Y PAHL, k. 1980. Cryopreservation Strawberry meristems and mass propagation of plantlets. *J. Ame. Soc. Hort. Sci.* 105:481-484.
- KONONOWICZ, H., JANICK, J. 1984. Response of embryogenic callus of *Theobroma cacao* L. to gibberelic acid synthesis. *Zeitschrift Fur Pflanzphysiologie* 113:359-366.
- KORSTIAN, C.F. 1930. Acorn storage in the southern state. *Journal of Forestry* 28:258-263.
- KUROKAMI, T., EBIHARA, T. Y TAKEMATSU, T. 1947. Studies on development of keeping quality of chesnut fruits by delaying their germination with phytohormone treatments. *Journal of the Japanese Horticultural Association* 16:129-136.
- LANAUD, C.L. 1987. Origine génétique des plantes à phénotype maternal issues de croisements intra ou interspécifiques des fèves plates ou graines polyembryonnées chez *Theobroma cacao* L. *Café, Cacao, The (Francia)* 31:3-14.

- LARGE, J.R., TERNHOLZ, D.F., MERRIL, S. JR. Y POTTER, G.F. 1947. Longevity of tung seed as affected by storage temperatures. Proceeding of the American Society of Horticultural Science 49:147-150.
- LATTA, R. 1971. Preservation of suspension cultures of plant cell by freezing. Can. J. Botany 49:1253-1254.
- LEON, J. 1974. Coffee *Coffea spp.* In handbook of plant introduction in tropical crops. Plant Production and Protection, Division Food Agricultural Organisation of the United Nations, Roma, no 93.
- LERNER, I.M. 1958. The genetic basis of selection. John Wiley, New York. 299 p.
- LITZ, R.E. y JARRET, R.L. 1991. Regeneración de plantas en el cultivo de tejidos: Embriogénesis somática y organogénesis. In Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones. Ed. por William M. Roca y Lus A. Mroginski. CIAT, Colombia. pp 143-172.
- LOCKWOOD, G. 1985. Genetic resources of the cocoa plant. SPAN 28,14, 16.
- LOVELOCK, J.E. 1954. The protective action of solutes against haemolysis by freezing and thawing. Biochemical. J. 56:265.
- LOVELOCK, J.E. 1957. The denaturation of lipid-protein complexes a cause of damage by freezing. No.929 vol 147, 427-433.
- LOVELOCK, J.E., BISHOP, M.H.W. 1959. Prevention of freezing damage to living cells by dimethylsulphoxide. Nature (London) 183:1394-1395.
- MARIN, M.L, MAFLA, G., ROCA, W.M. Y WITHERS, L.A. 1990. Cryoconservation of cassava zygotic embryos and whole seed in liquid nitrogen. Cryo Letters 11:257-264.

- MCFARLANE, A.S. Metabolic products of 3;4 Benzpyrene. 1942. London, Nature 149:439-440.
- MEHTA, K.L., ARORA, T.K. and WADHIM, 1982 S.R. Plant exploitation and collection. NBPGR SC. Monografia no.3. New Delhi.
- MERYMAN, H.T. 1966. Review of biological freezing: *In* cryobiology. Ed.by Meryman, H.T. London, Academic press. pp 2-206.
- MOK, C.K. and HOR, Y.L. 1977. The storage of oil palm (*Elaeis guineensis*) seed after high temperature treatment. Seed Science and Technology. 5:499-508.
- MOONEY, P.R. 1979. Semillas de la tierra ¿Un recurso público o privado? Canadian Council for International Cooperation, Ottawa, Canada. 138 p.
- MORA, M. A. 1990. Estudio del uso de la crioconservación de embriones cigóticos de *Musa balbisiana* y *Musa acuminata*. Tesis Mag. Sc. Turrialba, Costa Rica. 109 p.
- MOREL, G. 1975. Meristem culture technique for the long term storage of cultivated plants. *In* "Crop Genetic resources for today and tomorrow". Eds. Frankel O. H. y Hawkes J.G. Cambridge University Press, Cambridge, London, New York, Melbourne. pp 327-332.
- MROGINSKI, L.A., ROCA, W.M., KARTHA, K.K. 1991. Crioconservación del germoplasma. *In* cultivo de tejidos en la agricultura: fundamento y aplicaciones. Ed. por William M. Roca y Luis A. Mroginski. CIAT, Colombia. pp 715-730.
- MUNGOMERY, W.V., AGNEW, G.W.S. and PRODONOFF, E.T. 1967. Maintenance of citrus seed viability. Queensland Journal of Agriculture and Animal Science 23:103-120.
- MURASHIGE, T. and Skoog, F. 1962. Arevised medium for rapid growt and biosays with tobacco tissue culture. Phisiolo. Plant. 15:473-479.

- NAG, K.K. and STREET, H.T. 1973. Carrot embryogenesis from frozen cultured cell. *Nature* (London) 245:70-72
- NAG, K.K. Y STREET, H.E. 1975. Freeze-preservation of cultured plant cells; I: The pretreatment phase. *Physiologia Plantarum* 34:254-260.
- NAS. 1972. Genetic vulnerability of mayor crops. National Academy of Sciences Committee on Vulnerability of mayor crops. Wshington, U.S.A. 307 p.
- NIETO, C., REA, J., CASTILLO, R. Y PERALTA, E. 1984. Guía para el manejo y preservación de recursos fitogenéticos. Publicación miscelanea. Est. Expo. Santa Catalina, Quito, Ecuador. 60 p.
- NITZCHE, W. 1983. Germplasm preservation. *In Handbook of Plant Cell Culture*. Ed. por Evan, d.a., Sharp, w.r, Ammiranto, P.V. y Yamada, Y. McMillan Publishing, New York, v.1. pp 782-805.
- NOVAK, F.J., DONI, B., DWUSO, G. 1985. Somatic embriogenesis and *in vitro* plant development of cacao (*Theobroma cacao* L.). *In International Symposiun on Nuclear Technique and in vitro Culture for Plant Improvement* (1985, Vienna, Austria). Procceding. Vienna, International Atomic Energy Agency. pp. 443-449.
- OMURA, M., SATO, Y. and SEIKE, K. 1978. Long term preservation of japanese pear seed under extra low temperatures. *In Long term preservation of favourable germplasm in arboreal crops*. Eds. T. Akihama an K. Nakajima. pp 26-30. Fruit Tree Research Station, M.A.F. Japan.
- ORTIZ, CERECERES, J. 1978. Enfoque para la utilización de los recurso genéticos disponibles a México. Ed. Tarciso Cervantes. Sociedad Mexicana de Fitogenética, Chapingo, México.
- PALMA, T. 1988. Estudio morfogenético de cacao (*Theobroma cacao* L.) empleando embriones haploides. Tesis Mag. Sc. Turrialba, Costa Rica, Programa Universidad de Costa Rica/CATIE. 111 P.

- PENCE, V.C., HASEGAWA, P., JANICK, J. 1979. Asexual embryogenesis in *Theobroma cacao* L. J. Ame. Soc. Hort. Sci 104:145-148.
- PENCE, V.C., HASEGAWA, P., JANICK, J. 1981. *In vitro* cotyledonary development and anthocyanin synthesis in zygotic and asexual embryos of *Theobroma cacao* L. J. Ame. Soc. Hort. Sci 104:145-148.
- POEHLMAN, J.M. 1965. Mejoramiento genético de las cosechas. Limusa, México. 453 pp.
- POLGE, C., SMITH, A.U., PARKERS, A.S. 1949. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. Nature (London) 164:666.
- PRITCHARD, H.W. Y PRENDERGAST, F.G. 1986. Effects of desiccation and cryopreservation on the *in vitro* viability of embryos of recalcitrant seed species *Araucaria hunsteinii* Schum. Journal of Experimental Botany 37(182):1388-1397.
- PRITCHARD, H.W.; GROUT, B.W.W. Y SHORT, K.C. 1986. Osmotic stress as a pre-growth procedure for cryopreservation; 2 water relations and metabolic state of sycamore and soy bean cell suspensions. Annals of Botany 57:371-378.
- PURSEGLOVE, J.W. 1968. Tropical crops dicotyledons. Longman Group. U.k. pp 570-597.
- PYKE, E.E. 1935. On the germination of cocoa beans with special reference to storage and transport problems. Imperial Collage of Tropical Agricultural. Forurth Annual Report on cocoa Research, Government Printing office, Trinidad. pp 34-40.
- QUATRANO, R.S. 1968. Freeze-preservation of cultured flax cell utilizing DMSO. Plant Physiology 43:2057-2061.
- QUEROL LIPCOVICH, D. 1988. Recursos genéticos, nuestro tesoro olvidado. Industria Gráficas, Lima, Perú. 218 pp.

- RANCH, J., PACE, G.M. 1988. Science in the art of plant regeneration from cultured cell: an essay and a proposal for a conceptual framework. *Iowa State J. of Research* 62(4):537-569.
- RAD, A.N., LEE, S.K. 1986. An overview of the *in vitro* propagation of woody plant and plantation crops. *In plant tissue culture and its agricultural applications*. Ed. by L.A. Withers y P.G. Alderson. London, Buter Worths. pp 123-138.
- REED, G.A. 1947. The 1946 Statuto of Chinese chestnut growing in the Eastern United States. *Proceeding of the American Society of Horticultural Science* 49:139.
- ROBERTS, E.H. 1972. Storage enviroment and the control of viability. *In viability of seed*. Eds. E.H. Roberts . Chapman and Hall , London. pp 44-58
- ROBERTS, E.H. 1973. Loss or seed viability:chromosomal and genetical aspects. *Seed Science and Technology*. 1:516-527.
- ROBERTS, E.H. 1973a. Prodicing the sotorage life of seed. *Seed Science and Technology* 1:499-514.
- ROBERTS, E.H. 1975. Problem of long term storage of seed and pollen for resources genetic consevation. *In crop genetic resources for today and tomorrow, International Biological Programme Handbook no.2*. Eds. Frankel O.H. and Hawkes J.G. . Cambbridge University Press Cam-bridge, London, New York, Melbourne. pp 269-296.
- ROBERTS, E.H. and ELLIS, R.H. 1977. Prediction of seed longevity at sub-zero temperatures and genetic resources conservation. *Nature*, London 268:431-432.
- ROBERTS, E.H., DING, M.W. and ELLIS, R.H. 1984. Recalcitrants seeds their recognition and storage. *In crop genetics resources: conservation and evaluation*. Eds. Holden J. H. W. and Williams J.T. George Allen and Unwin, LONDON. pp 38-52.

- SAKAI, A. and NOSHIRA, M. 1975. Some factors contributing to the survival of crop seeds cooled to the temperature of liquid nitrogen. In "Crop genetic resources for today and tomorrow", International Biological Programme Handbook no.2. Eds. Frankel O.H. and Hawkes J.G. Cambridge University Press, Cambridge, London, New York, Melbourne. pp 317-326.
- SAKAI, A. Y YOSHIDA, S. 1968. The role of sugar and related components in variation of free zinc resistance. *Criobiology* 5:160-175.
- SAKAI, A., SUGAWARA, Y. 1973. Survival of poplar callus at super-low temperatures after cold acclimation. *Plant Cell Physiology* 14:1201-1204.
- SASAKI, S. 1976. The physiology storage and germination of timber seed. In seed technology in the tropics. Eds. Chin H. F. and Raja Harun R.M. University pertonia. pp 11-115.
- SCHERER, W.F., HOOGASIAN, A.C. 1954 Preservation at sub-zero temperatures of mouse fibroblast (strain L) and human epithelial cell (strain Hela). *Proc. soc. exp. Biol. Med.* 87:480-487.
- SEIBERT, M. Y WETHERBEE, P.J. 1977. Increased survival and differentiation of frozen herbaceous plant organ cultured through cold treatment. *Plant Physiology* 59:1043-1046.
- SIMON, E.W., MINCHIN, A., Mc MENAMIN, M.M. and SMITH, J.M. 1976. The low temperature limit for seed germination. *New Phytologist* 77:301-311.
- SORIA V., J. 1975. Recent cocoa collecting expeditions. *Crop Genetic Resources for today and tomorrow. International Biological Programa (Great Britain)* 2:175-179.
- STRUSHNOFF, C. and JUNTILA, O. 1978. Resistance to low temperature injury in hydrated lettuce seed by supercooling. In *Plant cold hardiness and freezing stress. Mechanisms and Crop Implications*. Eds. P.H. Li and A. Sakai. Academic Press, New York, San Francisco, London. pp 241-248.

- SUN, C.N. 1958. The survival of excised pea seedling after drying and freezing in liquid nitrogen. *Bot.Gaz.* 119: 234-236.
- SWABRICK, J.T. 1965. Storage of cocoa seed. *Experimental Agriculture.* 1:201.
- SWABRICK, J.T. 1964. Studies of germination and growth of cocoa seed. *Annual Reports of the West African Cocoa Research Institute, Nigeria.* pp 75-77.
- SYKES, J.T. 1978. The conservation of crop genetic resources. International actions in long-term seed storage. *Seek Science and technology.* 6:1053-1058.
- TAMARI, C. 1976. Phenolgy and seed storage trials of Dipterocarps. Forest Research Institute, pamphlet no.69, Kepong, Malaysia.
- TANG, H.T. and TAMARI, C. 1973. Seed description and storage tests of some dipterocarps. *The Malaysian Forester.* 36(2):38.
- TISSERAT, B., ULRICH, B.J. and FINKLE, B.J. 1981. Cryogenic preservation and regeneration of date palm tissue. *Hort Sci.* 16:47-48.
- TOUMEY, T.W. Y KORSTIAN, C.F. 1942. Seedling and planting in the practice of forestry. John Winley, New York.
- TUMANDOV, I.I.; BUTENKO, R. G. Y OGOLEVETS, I.V. 1968. Application of isolated tissue culture tecchique for studing hardening process in plant cells. *Fiziol. Rast.* 15:649-756.
- VILLIERS, T.A. 1975. Genetics maintenance of seed in imbibed storage. *In "Crop genetic resources for today and tomorrow". International Biological Programme. Eds. Frankel O. H. y Hawkes J.G. Cambridge University Press, Cambridge, London, New York, Melbourne. pp 297-316.*

- WANG, B.S. P. 1974. Tree-seed storage department of the environment. Canadian Forest Service. Publication no.1335.
- WANG, B.S. P. 1975. Tree and shrub seed. *In* advances in research and technology of seed. Ed. W.T. Bradnock. Centre for Agricultural Publishing and Documentation, Wageningen, Netherlands. pp 34-43.
- WIDHOLM, J.M. 1972. The use of fluorescein diacetate and phenosafranin for cultured plant cell. *Stain Technology* 47:189-194.
- WITHERS, L.A. 1980. Tissue culture storage for genetic conservation. IBPGR Technical report. International Board for Genetic Resources (IBPGR), Roma. 91 p.
- WITHERS, L.A. 1980b. The cryopreservation of higher plant tissue and cell cultures an overview with some current observation and future thoughts. *Cryolett* 1:239-250.
- WITHERS, L.A. 1983. Germplasm preservation through tissue culture: A overview. *In* cell a tissue culture techniques for cereals crop improvement. Science Press, Beijing, China, International Rice Research institute, Manila, Filipinas. pp 315-341.
- WITHERS, L.A. 1982. The development of cryopreservation techniques for plant cell tissue and organ culture in plant tissue culture.
- WITHERS, L.A. 1985. Cryopreservation of cultured cells and meristems. *In* cell culture and somatic cells genetics of plants. Ed. Vasil I.K. Academic Press, Florida, pp 253-315.
- WITHERS, L.A. 1986. Cryopreservation and genebanks. *In* Plant Cell culture technology. Ed. M.M. Yeoman. blackwell, Oxford, pp. 96-140.

- WITHERS, L.A. y KING, P.J. 1979. Proline a novel cryoprotectant for the freeze-preservation of *Zea mays*. *Plant Physiology* 64:675-678.
- WITHERS, L.A. y STREET, H.E. 1977. The freeze-preservation of plant cell cultures. *In* plant tissue culture and its biotechnical applications. Ed. pro Barz, W. Springer-Verlag, New York, E.U. pp 226-244.
- WOLFE, J. 1978. Chilling injury in plants the role of membrane lipid fluidity. *Plant Cell and Environment* 1 241-247.
- YIDAMA, J.A., WITHERS, L.A., IVINS, J.D. 1987. Development of simple methods for collecting and propagating cacao germplasm *in vitro*. *Acta Horticulturae* (Holanda) 212:95-97.

APENDICE A

Cuadro 1A. Análisis de varianza para la sobrevivencia, en forma de callo, de embriones precultivados en tres temperaturas de incubación y congelados por inmersión directa en NL.

Fuente de variación	gl	SC	CM	Pr>F
Temperatura	2	10058.02	5029.01	0.0025
Lineal	1	4664.01	4664.01	0.0089
Cuadrático	1	4303.77	4303.77	0.01
Error	11	5106.82	464.26	
Total	13	15164.84		

Cuadro 2A. Análisis de varianza para el porcentaje de embriones viables tratados con DMSO, tiempo de incubación, tiempo de exposición a 5°C y deshidratación.

R ²	0.97
R ² .ajustado.....	0.96
C.V.....	14.24

Fuente de variación	gl	SC	CM	Pr>F
Regresión	7	25885.43	3697.92	0.0001
Error	20	782.43	39.12	
Total ajustado	27	26677.86		

Efecto	Coefi.	Error estandar	Pr>T
Intercep	82.26	6.169	0.0001
TEXPFRI	2.27	0.259	0.0001
TEXPFRI*TEXPFRI	-0.031	0.004	0.0001
TEXPFRI*cCONDMSO	-0.029	0.0104	0.01
CONDMSO	-12.95	1.551	0.0001
CONDMSO*CONDMSO	0.68	0.149	0.0044
TIMSO	-18.084	5.639	0.0044
TIMSO*TIMSO	3.014	0.9318	0.0042

Cuadro 3A. Análisis de varianza para la sobrevivencia de embriones, en forma de callo, precultivados en varias concentraciones de sacarosa y varios niveles de ANA en el medio de recuperación

R ²	0.97
R ² .ajustado.....	0.96
C.V.....	14.24

Fuente de variación	gl	SC	CM	Pr>F
Regresión	7	25885.43	3697.92	0.0001
Error	20	782.43	39.12	
Total ajustado	27	26677.86		

Efecto	Coefi.	Error estandar	Pr>T
Intercep	265.848	40.849	0.0006
Sacarosa	-7.824	1.509	0.002
ANA	- 31.268	8.281	0.0092
Sacarosa*Sacarosa	0.049	0.016	0.0214
Sacarosa*ANA	0.625	0.195	0.0185

Cuadro 4A. Análisis de varianza para la sobrevivencia de tres tamaños de embriones cigóticos inmaduros de cacao congelados por inmersión directa en NL.

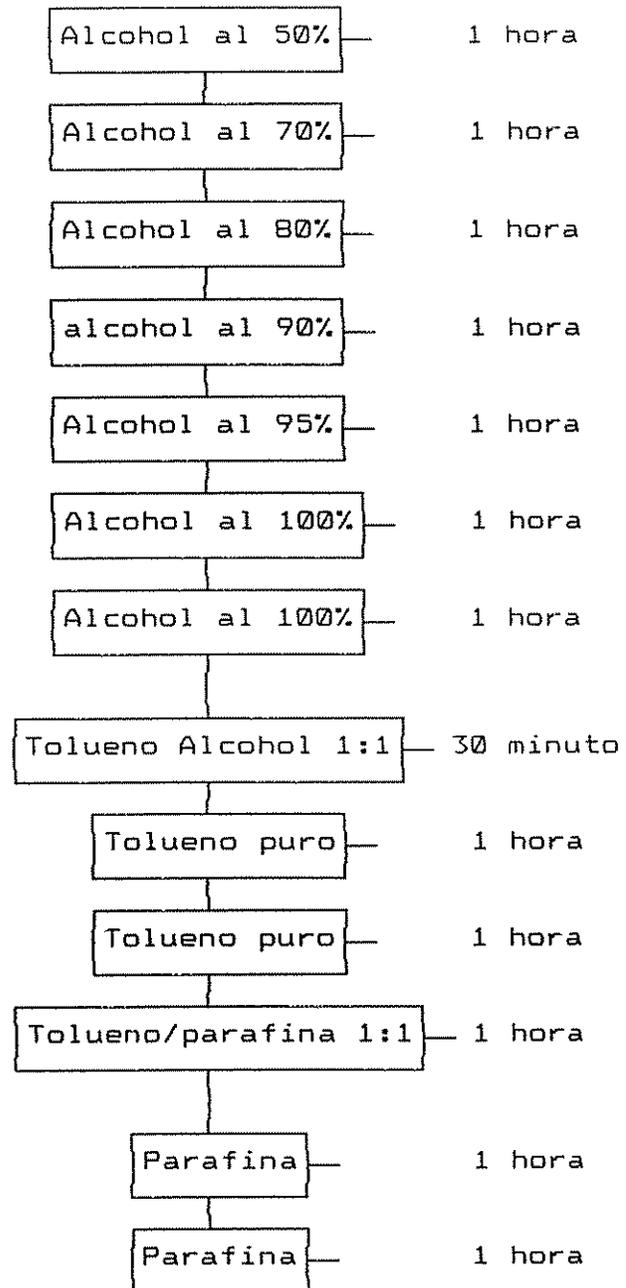
R ²	0.897
R ² .ajustado.....	0.891
C.V.....	6.28

Fuente de variación	gl	SC	CM	Pr>F
Regresión	1	3826.99	3826.99	0.0001
Error	16	439.5	27.47	
Total ajustado	17	4266.49		

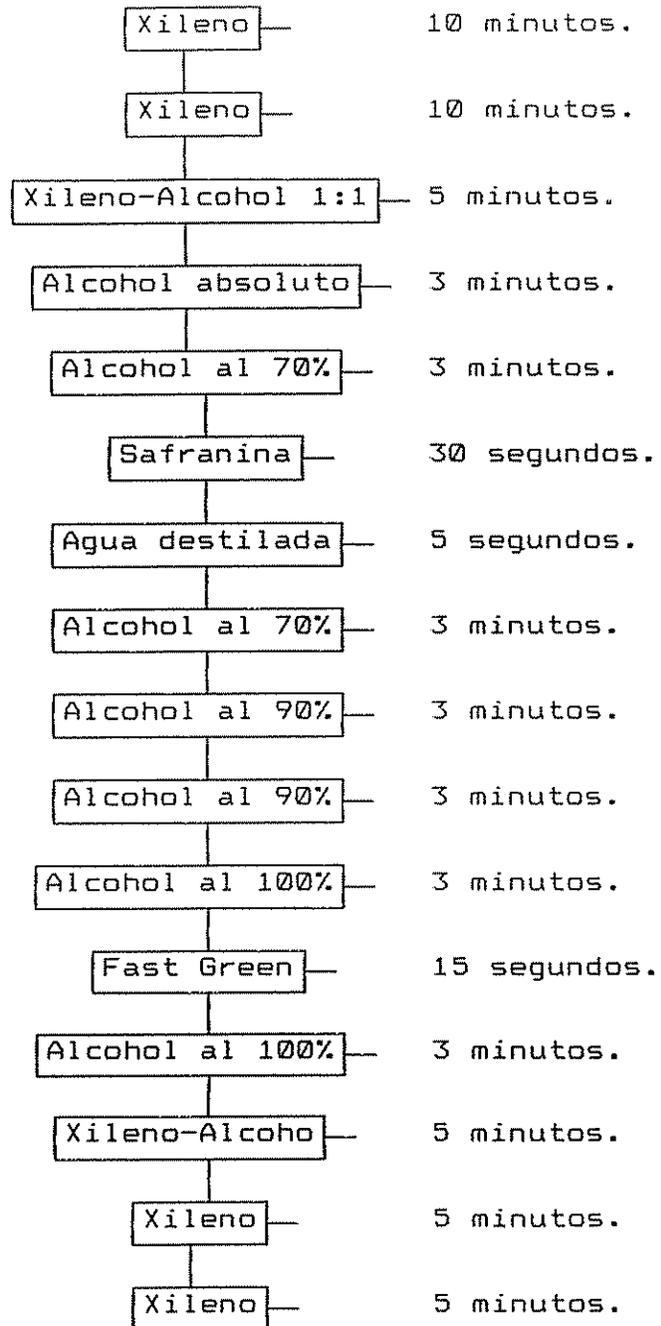
Efecto	Coefi.	Error estandar	Pr>T
Itercep	110.93	2.63	0.0001
Tamaño embrión	-6.17	0.52	0.0001

APENDICE B

Cuadro 1B. Método de deshidratación e infiltración en para-
parafina utilizado en el estudio histológico de
los embriones cigóticos inmaduros.



Cuadro 2B. Técnica de tinción utilizada para el análisis histológicos de los embriones cigóticos.



APENDICE C

PREPARACION DEL AGUA DE COCO PARA EL MEDIO DE CULTIVO

- 1-. Conseguir cocos maduros y frescos.
- 2-. Abrir perforando 2 ó 3 agujeros en la parte final de la nuez.
- 3-. Drenar separadamente el líquido de cada nuez y examinar su apariencia y olor.
- 4-. Combinar el líquido de cada una de las nueces en un recipiente mayor.
- 5- Cuele el agua de coco utilizando dos o tres capas de algodón para extraer pedacitos de cascara o fibras u otra suciedad.
- 6-. Hierva el total de agua colectada para que precipiten la gran cantidad de proteínas que posee el agua de coco.
- 7-. Dejar que el agua se enfríe completamente y filtrar con papel filtro Whatman No.2.
- 8- Agite y mezcle bien el agua de coco filtrada y colóquela en un recipiente. Almacene los recipientes con el agua de coco en el congelador hasta cuando los necesite.

APENDICE D

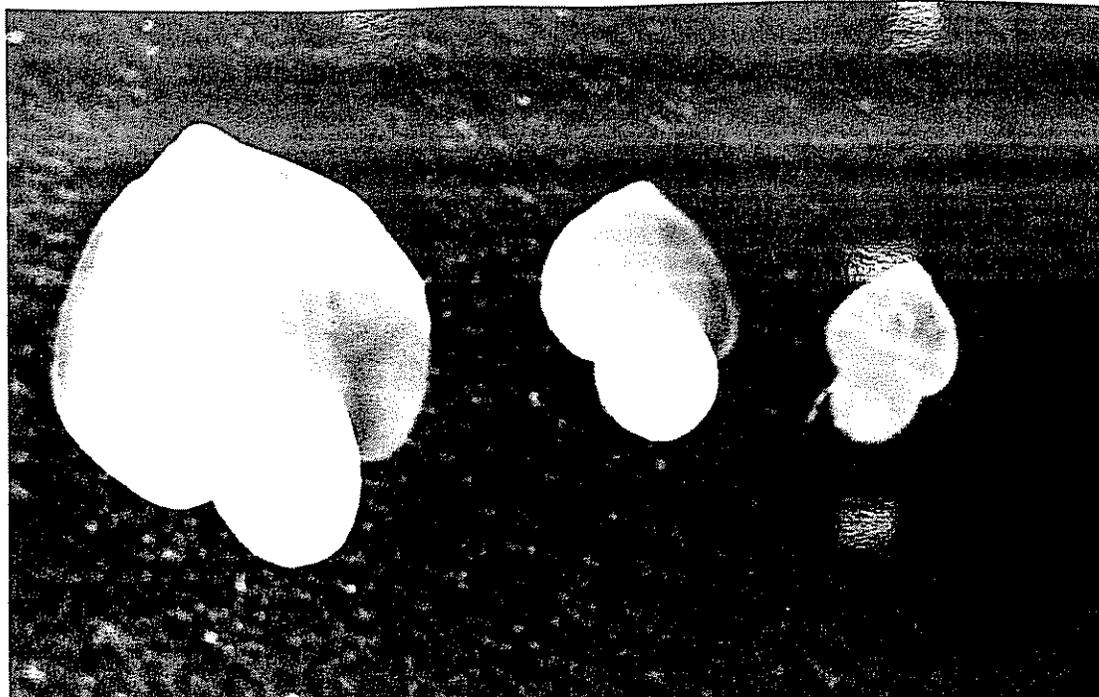


Figura 1D. Tamaño de embriones cigóticos inmaduros de cacao utilizados en los diferentes ensayos de criopreservación (8mm, 4mm y 2 mm).

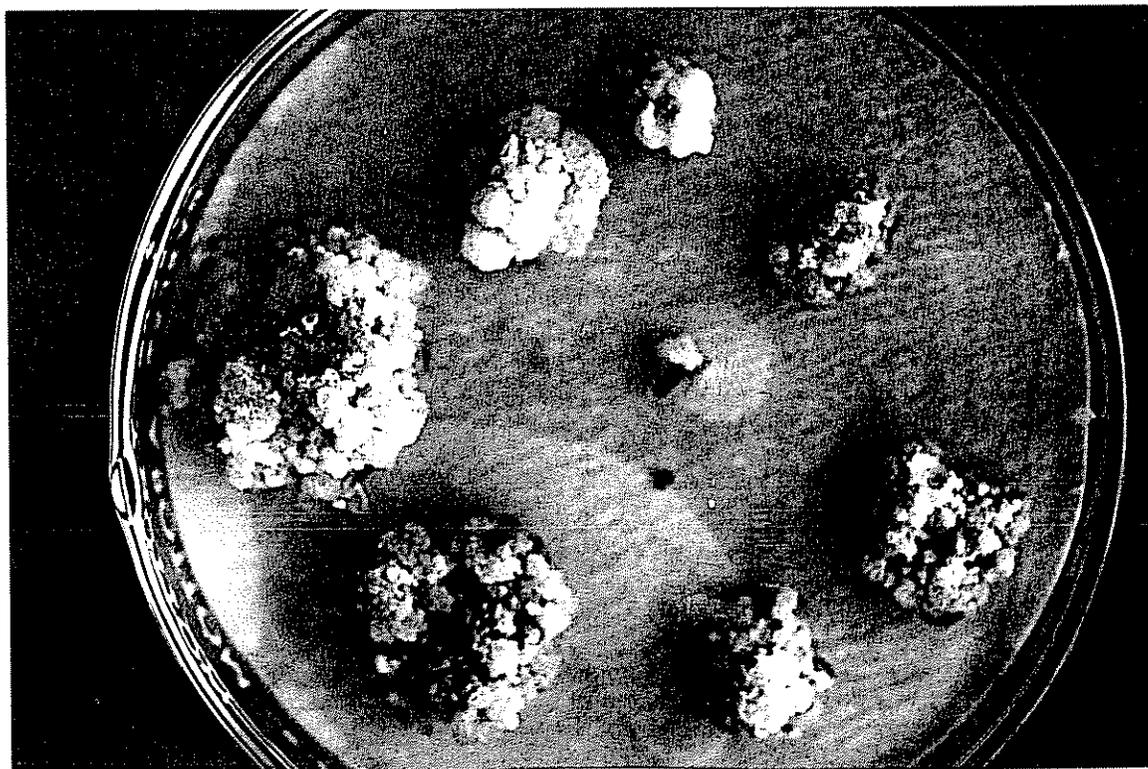


Figura 2D. Formación de callo en embriones cigóticos inmaduros de cacao criopreservados en nitrógeno líquido.

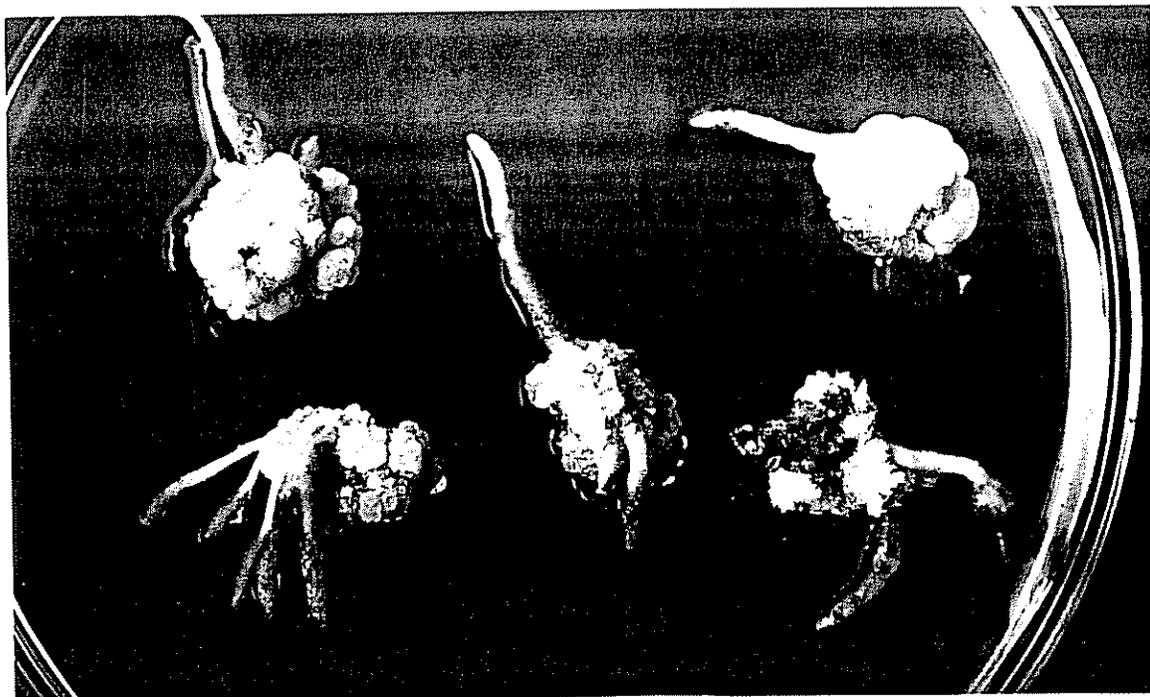


Figura 3D. Formación de raíces en callos de embriones cigóticos inmaduros de cacao criopreservados en nitrógeno líquido.



Figura 4D. Embriones somáticos de cacao obtenidos a partir de embriones cigóticos inmaduros de cacao criopreservados en nitrógeno líquido.



Figura 5D. Embriones somáticos de cacao recuperados a través de germinación directa después de haber permanecido almacenados en nitrógeno líquido.

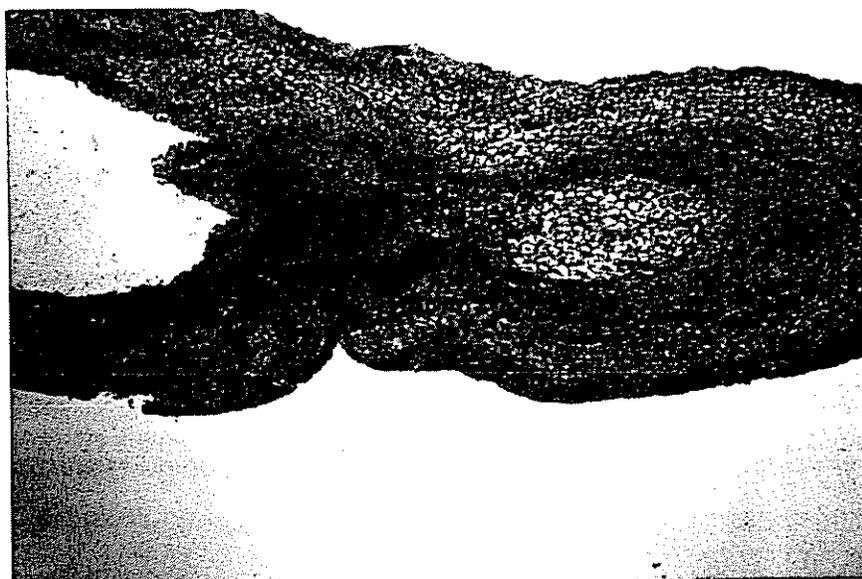


Figura 6D. Corte longitudinal de un embrión cigótico de 4mm precultivado por 3 días en un MS con 3% de sacarosa (4X).



Figura 7D. Formación y desarrollo de los tejidos vasculares en un embrión inmaduro precultivado en altas concentraciones de sacarosa sin congelar (20X).



Figura 8D. Células de un embrión cigótico inmaduro precultivado en altas concentraciones de sacarosa y congelado en nitrógeno líquido, en el cual se puede observar las células están turgentes y sin ningún daño aparente ocasionado por las ultrabajas temperatura(40X).



Figura 9D. Formación de callo a partir de las células de un embrión cigótico precultivado en altas concentraciones de sacarosa después de 2 semanas de haber sido descongelado (20X).



Figura 10D. Corte longitudinal de un embrión cigótico inmaduro deshidratado en la cámara de transferencia por 12 horas (20X)

APENDICE E

PREPARACION DE 100 ml DE UNA SOLUCION DE
3,4,5-TRIFENILTETRAZOLIO

- Tomar en un beaker un volumen de 50 ml de agua destilada.

- Adicionar al volumen de agua las cantidades de 0.89g de fosfato monoácido de sodio y 0.68g de fosfato diácido de potasio, y agitar por 2 a 3 minutos.

- A la solución anterior agregar 0.6g de trifenitetrazolio y agitar por 2 a 3 minutos.

- Agregar nuevamente agua destilada y enrasar a 100 ml.

- Si la solución no va a ser utilizada inmediatamente, ésta se debe depositar en un frasco ámbar o en un recipiente al cual se le recubre con papel de aluminio y se guarda en el refrigerador.