

Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza
Subdirección General Adjunta de Enseñanza
Programa de Estudios de Posgrado

OBTENCION DE PLANTAS DE CACAO (Theobroma cacao L.)
A PARTIR DEL MICROINJERTO DE EMBRIONES SOMATICOS.

Tesis sometida a la consideración del Comité Técnico Académico del Programa de Estudios de Posgrado en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza, para optar al grado de

MAGISTER SCIENTIAE

por:

MARIA ELENA AGUILAR VEGA

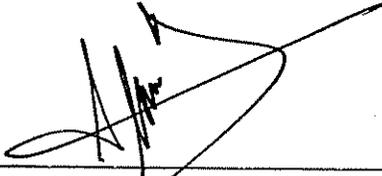
Turrialba, Costa Rica

1990

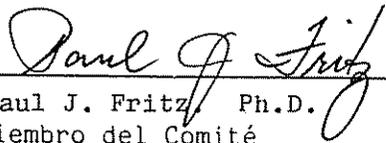
Esta tesis ha sido aceptada, en su presente forma, por la Coordinación del Programa de Estudios de Posgrado en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales Renovables del CATIE, y aprobada por el Comité Asesor del estudiante como requisito parcial para optar el grado de:

MAGISTER SCIENTIAE

COMITE ASESOR:



Víctor M. Villalobos A. Ph.D.
Profesor Consejero



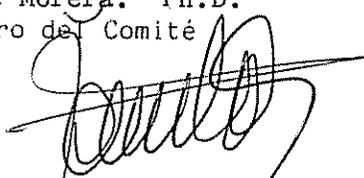
Paul J. Fritz, Ph.D.
Miembro del Comité



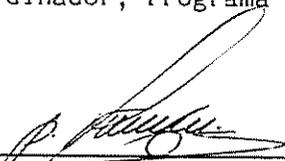
Jean Vincent Escalant. Ph.D.
Miembro del Comité



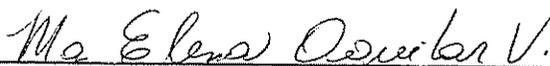
Jorge Morera. Ph.D.
Miembro del Comité



Ramón Lastra Rodríguez, Ph.D.
Coordinador, Programa de Estudios de Posgrado



Dr. José Luis Parisi
Subdirector General Adjunto de Enseñanza



María Elena Aguilar Vega.
Candidato

A mi padre Fernando
por su comprensión y cariño

A los muchachos del Laboratorio:
Edgar, Juan Luis, Galván,
Luis, Gilberth y William.
Por su constante esfuerzo
de superación.

AGRADECIMIENTO

Expreso mi más sincera gratitud a todas aquellas personas que colaboraron para que esta investigación se realizara.

- A Víctor Villalobos A. Ph.D., Jefe del Programa de Mejoramiento de Cultivos Tropicales del CATIE y profesor consejero por depositar su confianza en mí, por todas sus enseñanzas, estímulo y apoyo constante en mi trabajo y en mi condición de estudiante.
- A Jean Vincent Escalant Ph.D. y Jorge Morera Ph.D., del CATIE por sus acertadas sugerencias en la revisión del presente trabajo.
- A Paul Fritz Ph.D., de Penn State University por su valiosa colaboración en el aporte de recomendaciones durante la revisión del escrito.
- A Ramón Lastra Ph.D., Coordinador de Posgrado y al Sistema de Estudios de Posgrado del CATIE por darme la oportunidad de realizar estudios en la condición de trabajador-estudiante.
- A mi gran amigo Jorge Sandoval F., por su incondicional amistad y apoyo constante en mi trabajo y en mi carrera de estudiante.
- A Edgar, Juan Luis, Galván, Luis, Gilberth, William, Ana, Lissette, Dora y demás compañeros de la Unidad de Biotecnología del CATIE por su gran cooperación y sincera amistad.

- A Silvana Alvarenga mi mejor compañera de estudio y sincera amiga, por su amplia colaboración y constante apoyo moral.
- A Nelly Vásquez por su valiosa amistad y su colaboración en la realización del estudio histológico.
- A mis amigos y compañeros de estudio Vicente, Gabriel, Emilio y Alejandra por los valiosos momentos compartidos.
- A Jorge Arce M.Sc., por todas sus enseñanzas como compañero y profesor y la ayuda en la revisión del anteproyecto de tesis.
- A Ludwing Müller Ph.D., con gran respeto y admiración por todas sus enseñanzas.
- A Ingrid Salazar M., por su excelente desempeño secretarial y eficiente labor en la digitación del trabajo escrito.
- A Maritza Loaiza, Ana Guerrero y Lissette Vega por su diario apoyo secretarial.
- A Kenneth Royo y Leopoldo Gómez por su ayuda en la programación y análisis de los datos.
- A los señores Eddie Salazar S. y Edwin Castillo de la Colección de Cacao del CATIE por el aporte de germoplasma para la realización de la investigación.
- A los señores Antonio Salas y Omar Vega por su asistencia en todos los trámites administrativos.

- Al Sr. Francisco Solano por su eficiente labor en la toma y revelado de fotografías.
- A Domingo Loaiza por el aporte de sugerencias, la elaboración de diagramas y la amistad brindada.
- Al señor Rigoberto Aguilar y demás personal de la Biblioteca Orton por su colaboración en la obtención y reproducción de la información.

CONTENIDO

RESUMEN	x
SUMMARY	xii
LISTA DE CUADROS	xiv
LISTA DE FIGURAS	xix
I. INTRODUCCION	1
II. REVISION DE LITERATURA	4
1. EL CULTIVO IN VITRO EN CACAO	4
1.1. Cultivo de Apices.	4
1.2. Cultivo de Microestacas.	5
1.3. Embriogenesis Somática.	6
1.4. Cultivo de Embriones Cigóticos.	11
2. ANTECEDENTES DE LA MICROINJERTACION.	13
2.1. El Microinjerto en Cítricos.	14
2.2. Microinjerto en Rosáceas.	15
2.3. Microinjerto en Especies Maderables. ...	16
3. EVENTOS HISTOLOGICOS ASOCIADOS AL INJERTO. ..	17
III. MATERIALES Y METODOS	22
1. CULTIVO DE PORTAINJERTOS.	22
1.1. Variables Evaluadas.	24
2. INDUCCION DE RAICES ADVENTICIAS EN LOS PORTAINJERTOS.	24
2.1. Variables Evaluadas.	24
2.2. Condiciones Físicas de Cultivo.	25
2.3. Análisis de Resultados.	25
3. EMBRIOGENESIS SOMATICA.	26
3.1. Frecuencia de Subcultivos.	27
3.2. Efecto del ABA en la Embriogénesis Somática.	27
3.3. Efecto de las Concentraciones de Azúcar en la Embriogénesis Somática.	27
3.4. Variables Evaluadas.	28
4. MICROINJERTACION.	28
4.1. Edad de los Portainjertos.	29
4.2. Presencia o Ausencia de los Cotiledones del Embrión Somático.	29
4.3. Efecto del AIB en el Desarrollo del Injerto.	29
4.4. Aclimatación.	30
4.5. Variables Evaluadas.	30

5.	ESTUDIO HISTOLOGICO.	31
IV.	RESULTADOS	32
1.	EVALUACION DEL PORTAINJERTO IMC-67.	32
1.1.	Emergencia de la Radícula.	32
1.2.	Desarrollo de Raíces Secundarias.	32
1.3.	Desarrollo del Eje Hipocotilo- radicular.	33
1.4.	Desarrollo del Epicotilo.	34
1.5.	Número de Hojas.	35
1.6.	Formación de Callos en el Tallo.	35
2.	INDUCCION DE RAICES ADVENTICIAS EN LOS PORTAINJERTOS.	39
2.1.	Sales de Murashige y Skoog (1962) Diluidas en Diferentes Proporciones de su Concentración Original.	39
2.2.	Sales MS Diluidas al 50%, y Diferentes Concentraciones de AIB.	43
3.	EMBRIOGENESIS SOMATICA.	47
3.1.	Frecuencia de los Subcultivos.	51
3.2.	Efecto del Acido Abscísico.	54
3.3.	Efecto de las Diferentes Concentraciones de Azúcar.	61
4.	MICROINJERTACION.	65
4.1.	Microinjertación Utilizando Patrones de Diferentes Edades.	65
4.2.	Efecto de la Presencia o Ausencia de los Cotiledones del Embrión Somático en el Desarrollo del Injerto.	67
4.3.	Efecto del AIB en el Desarrollo del Injerto.	75
5.	ESTUDIO HISTOLOGICO.	79
V.	DISCUSION	85
1.	EVALUACION DEL CRECIMIENTO DE LOS PORTAINJERTOS DE CACAO IMC-67.	85
2.	LA INDUCCION DE RAICES ADVENTICIAS EN LOS PORTAINJERTOS.	88
3.	EMBRIOGENESIS SOMATICA.	90
3.1.	Efecto de la Frecuencia de Subcultivos, Acido Abscísico y Concentraciones de Azúcar en la Embriogénesis Somática de Diferentes Genotipos de Cacao.	94
4.	MICROINJERTACION.	99

5. ESTUDIO HISTOLOGICO.	104
VI. CONCLUSIONES	108
VII. RECOMENDACIONES	110
VIII. LITERATURA CITADA	112
IX. APENDICE	120

AGUILAR, M.E. 1990. Obtención de plantas de cacao (Theobroma cacao L.) a partir del microinjerto de embriones somáticos. Tesis Mg.Sc., Turrialba, Costa Rica, CATIE. 131 p.

Palabras claves: Theobroma cacao L., microinjerto, embriones somáticos, portainjertos, histología.

RESUMEN

Las posibilidades de regenerar plantas de cacao in vitro han sido muy limitadas. La embriogénesis somática a partir de células cotiledonares está bien documentada, sin embargo son pocos los logros alcanzados en el desarrollo de estos embriones a plantas. El microinjerto de embriones somáticos sobre plántulas cultivadas in vitro constituye entonces una alternativa para la obtención de plantas de cacao. Con base a esto se plantearon los siguientes objetivos: determinar el potencial embriogénico de diferentes genotipos de cacao, establecer eficientemente la técnica de microinjertación de embriones somáticos y conocer los eventos histológicos y morfogénicos asociados.

Para la embriogénesis somática se utilizaron los genotipos CC-18, EET-400, POUND-12 y UF-613. Se probaron tiempos de subcultivo, concentraciones de ABA y concentraciones de azúcar. En la microinjertación se utilizaron plántulas IMC-

como patrones y como injertos embriones somáticos UF-613. Se ensayaron diferentes condiciones de cultivo, edad de los portainjertos, embriones somáticos con o sin cotiledones, medios de cultivo simples o enriquecidos. El estudio histológico se realizó con microscopía de luz.

Se determinó que el potencial embriogénico en cacao está estrechamente relacionado al genotipo, siendo el EET-400 el más embriogénico y el UF-613 el menos embriogénico. En la microinjertación los mejores resultados se obtuvieron utilizando medios de cultivo simples, portainjertos de tres semanas de edad y embriones somáticos son cotiledones. Se observaron los eventos histológicos que caracterizan la unión injerto-portainjerto. Células principalmente del portainjerto sufren divisiones celulares en diferentes sentidos hasta producir una masa de callo en la zona de unión. Posteriormente algunas de estas células se diferencian en parénquima medular, xilema y floema hasta establecer la conexión vascular en el injerto a los 40 días de cultivo.

El proceso completo desde la microinjertación hasta el desarrollo de plantas en invernadero tardó aproximadamente 10 meses.

Los resultados de este estudio prueban que la técnica de microinjertación es un método confiable para la regeneración de plantas de cacao a partir de embriones somáticos.

AGUILAR, M.E. 1990. Obtention of cocoa plants (Theobroma cacao, L.) through micrografting of somatic embryos. Tesis Mg.Sc., Turrialba, Costa Rica, CATIE. 131 p.

Key words: Theobroma cacao L., micrografting, somatic embryos, rootstock, histology.

SUMMARY

The possibilities to regenerate in vitro cocoa plants are very scarce. Even though the information about somatic embryogenesis from cotyledonary cells is extensive, achievements in the development of embryos into plants are limited. Micrografting somatic embryos on in vitro plantlets is a viable alternative for the obtention of cocoa plants. Based on this, the following objectives were proposed: to determine the embryogenic potential of different cocoa genotypes; to establish a micrografting technique for somatic embryos; and to learn more about the histological and morphological events associated to this technique.

The genotypes used for somatic embryogenesis were CC-18, EET-400, POUND-12, and UF-613. Different subculture periods were tested as well as ABA and sugar concentrations. IMC-67 plantlets were used as micrografting rootstocks and UF-613 somatic embryos were used as grafting. Different aspects were evaluated such as culture conditions; rootstocks' age; somatic

embryos with or without cotyledones; and simple or enriched culture media. The histologic study was conducted using microscopy of light.

It was determined that cocoa's embryogenic potential is closely related to the genotype, being EET-400 and UF-613 the most and less embryogenic genotypes, respectively.

Regarding micrografting, best results were obtained using simple culture medium, three weeks old rootstocks, and somatic embryos without cotyledons. Histological events characterizing the union grafting-rootstock were also observed. Cells, mainly of the rootstock suffered different kinds of division forming a callus mass at the union area. After 40 days of culture some cells were differentiated in parenquima, xylem, and phloem to establish a vascular connection in the grafting.

The complete process from micrografting to the development of plants at a greenhouse level lasted about 10 months.

The results reported in this study, prove that micrografting technique is a reliable method for plant regeneration from cocoa somatic embryos.

LISTA DE CUADROS

En el Texto

Cuadro No.	Página
Cuadro 1. Concentraciones de Caseína Hidrolizada y valores de pH utilizados en el desarrollo de portainjertos de cacao.	23
Cuadro 2. Cultivo de portainjertos en diferentes combinaciones de caseína hidrolizada y valores de pH.	36
Cuadro 3. Medias de las variables analizadas en el cultivo de portainjertos con respecto al tiempo de cultivo.	37
Cuadro 4. Medias de las variables analizadas en el cultivo de semillas enteras y disectadas para la obtención de portainjertos.	38
Cuadro 5. Inducción de raíces adventicias en portainjertos de cacao en el medio de MS diluido al 50%.	41
Cuadro 6. Inducción de raíces adventicias en portainjertos de cacao con MS al 50 % y AIB.	45
Cuadro 7. Frecuencias embriogénicas de cuatro genotipos de cacao en relación al tiempo de subcultivo /2.	52
Cuadro 8. Frecuencias de la formación de callo en los diferentes genotipos de cacao en relación al tiempo de subcultivo /1.	52
Cuadro 9. Frecuencias de la oxidación de los explantes en cuatro genotipos de cacao en relación al tiempo de subcultivo.	53

Cuadro 10.	Frecuencias embriogénicas de diferentes genotipos de cacao en presencia de ABA.	59
Cuadro 11.	Porcentajes de la formación de embriones anormales en diferentes genotipos de cacao y en presencia de ABA.	59
Cuadro 12.	Frecuencias de la formación de callo en los diferentes genotipos de cacao y en presencia de ABA.	60
Cuadro 13.	Frecuencias de oxidación de los explantes en cuatro genotipos de cacao y en presencia de ABA.	60
Cuadro 14.	Frecuencias embriogénicas de diferentes genotipos de cacao cultivados en diferentes concentraciones de azúcar.	63
Cuadro 15.	Frecuencias de la formación de callo en cuatro genotipos de cacao en diferentes concentraciones de azúcar.	63
Cuadro 16.	Frecuencias de la oxidación de los explantes en cuatro genotipos de cacao en diferentes concentraciones de azúcar.	64
Cuadro 17.	Desarrollo de microinjertos de cacao utilizando patrones de diferentes edades (%).	66
Cuadro 18.	Número de hojas en porcentaje por planta para cada tratamiento	66
Cuadro 19.	Efecto de la presencia o ausencia de los cotiledones del embrión somático en el desarrollo del injerto (%).	73
Cuadro 20.	Porcentajes del número de hojas por planta para cada tratamiento.	74
Cuadro 21.	Porcentajes para el desarrollo de microinjertos de cacao en un medio MS al 50% y 1,0 mg.l ⁻¹ de AIB.	77

Cuadro 22. Porcentajes del número de hojas por planta para cada tratamiento. 78

Cuadro 23. Porcentajes del número de raíces por planta para cada tratamiento 78

APENDICE

Cuadro #		Página
Cuadro 1A.	Cultivo de portainjertos en diferentes combinaciones de caseína hidrolizada y valores de pH, utilizando semillas disectadas /1.	121
Cuadro 2A.	Cultivo de portainjertos en diferentes combinaciones de caseína hidrolizada y valores de pH, utilizando semillas enteras /1.	122
Cuadro 3A.	Cultivo de portainjertos en diferentes combinaciones de caseína hidrolizada y valores de pH, utilizando semillas disectadas /1.	123
Cuadro 4A.	Cultivo de portainjertos en diferentes combinaciones de caseína hidrolizada y valores de pH, utilizando semillas enteras /1.	124
Cuadro 5A.	Cultivo de portainjertos en diferentes combinaciones de caseína hidrolizada y valores de pH, utilizando semillas disectadas /1.	125
Cuadro 6A.	Cultivo de portainjertos en diferentes combinaciones de caseína hidrolizada y valores de pH, utilizando semillas enteras /1.	126
Cuadro 7A.	Cuadrados medios, coeficientes de variación y significancia de las variables de crecimiento analizadas en portainjertos cultivados en diferentes concentraciones de caseína hidrolizada y valores de pH.	127
Cuadro 8A.	Cuadrados medios, coeficientes de variación y significancia de las variables estudiadas en la inducción de raíces adventicias, en portainjertos de cacao en diferentes concentraciones de MS (15 días decultivo).	127

Cuadro 9A.	Cuadrados medios, coeficientes de variación y significancia de las variables estudiadas en la inducción de raíces adventicias en portainjertos de cacao en diferentes concentraciones de MS (22 días del cultivo).	128
Cuadro 10A.	Cuadrados medios, coeficientes de variación y significancia de las variables estudiadas en la inducción de raíces adventicias en portainjertos de cacao en diferentes concentraciones de MS (30 días de cultivo).	128
Cuadro 11A.	Cuadrados medios, coeficientes de variación y significancia de las variables estudiadas en la inducción de raíces adventicias en portainjertos de cacao en diferentes concentraciones de AIB (15 días de cultivo).	129
Cuadro 12A.	Cuadrados medios, coeficientes de variación y significancia de las variables estudiadas en la inducción de raíces adventicias en portainjertos de cacao en diferentes concentraciones de AIB (22 días de cultivo).	129
Cuadro 13A.	Desarrollo de diferentes tipos morfológicos de embriones somáticos de cacao en el genotipo CC-18 1/.	130
Cuadro 14A.	Desarrollo de diferentes tipos morfológicos de embriones somáticos de cacao en el genotipo EET-400 1/.	130
Cuadro 15A.	Desarrollo de diferentes tipos morfológicos de embriones somáticos de cacao en el genotipo POUND-12 1/.	131
Cuadro 16A.	Desarrollo de diferentes tipos morfológicos de embriones somáticos de cacao en el genotipo UF-613 1/.	131

LISTA DE FIGURAS

Figura No.	Página
Figura 1. Número de raíces por planta en cada concentración de MS diluido (%).	42
Figura 2. Número de raíces por planta para cada concentración de AIB (%).	46
Figura 3. Diferentes estados de la diferenciación y desarrollo de los embriones.	49
Figura 4. Desarrollo de embriones somáticos secundarios a partir de los cotiledones de un embrión primario.	49
Figura 5. Clasificación de embriones somáticos basados en su morfología.	50
Figura 6. Sumatoria de las frecuencias embriogénicas de cuatro genotipos de cacao subcultivados en diferentes tiempos.	56
Figura 7. Sumatoria de las frecuencias embriogénicas de cuatro genotipos de cacao en presencia de ABA.	56
Figura 8. Morfología de los embriones somáticos según el número de cotiledones.	57
Figura 9. Embriones somáticos que muestran diferentes anomalías.	58
Figura 10. Sumatoria de las frecuencias embriogénicas de cuatro genotipos de cacao en varias concentraciones de azúcar.	62
Figura 11. Microinjertos mostrando el desarrollo de hojas y raíces.	70
Figura 12. Microinjerto en la fase de aclimatación.	71

Figura 14.	Planta microinjertada en condiciones de suelo después de 10 meses desde la microinjertación:	72
Figura 15.	Zona de unión en el injerto mostrando divisiones celulares en varios sentidos (X 900).	81
Figura 16.	Formación de callo a partir de células del injerto y del portainjerto.	81
Figura 17.	Regeneración de parénquima en la médula del portainjerto.	82
Figura 18.	Células de xilema mostrando el inicio de diferenciación vascular en el injerto.	83
Figura 19.	Unión vascular continua entre el patrón y el injerto a los 40 días de cultivo.	84

I. INTRODUCCION

Theobroma cacao L. es una especie originaria de América Tropical, su centro de origen se supone está situado al noroeste de Suramérica en los bosques ecuatoriales de la región amazónica. Según Pound, Cheesman citado por Enriquez (1985), el área de origen comprende países como Colombia, Ecuador, Perú y Brasil, donde se ha encontrado la mayor variabilidad de la especie. Sin embargo existen otros centros importantes de dispersión de la especie como Mesoamérica (Enriquez, 1985). Es cultivado extensivamente en Africa y América del Sur, donde se propaga por semilla o por estacas (Pence, et al., 1979). La producción de híbridos derivados de cruces trinitarios son con frecuencia muy heterocigotas, éstos han constituido la base de los programas de mejoramiento genético en cacao (Lanaud, 1987). Como consecuencia se tienen poblaciones altamente heterogéneas, aún cuando procedan de individuos seleccionados. Lo anterior ha obligado a los fitomejoradores a buscar sistemas de propagación que garanticen la estabilidad genética de las plantaciones con características conocidas (Pence, et al., 1979; Lanaud, 1987). Plantas en estas condiciones se han obtenido a partir de estacas de ramas ortotrópicas. Sin embargo el método tiene el inconveniente de que el número de plantas es muy limitado. Según Pence, et al., (1979) la propagación por cultivo de tejidos puede ser una alternativa para superar estos problemas.

En los últimos 30 años se han realizado estudios en cultivo de tejidos en cacao con diferentes objetivos. Se considera que el desarrollo de técnicas de micropropagación en esta especie son necesarias para satisfacer el incremento en la demanda de cultivares de calidad, así como desarrollar mecanismos de mejoramiento que permitan la incorporación de genes deseables en forma eficiente. Los resultados señalan que el cacao es una especie difícil de propagar in vitro; su hábito leñoso, la presencia de contaminantes endógenos, como bacterias y hongos, la producción de grandes cantidades de exudados y sustancias fenólicas limitan su manipulación (Yidama, et al., 1987).

Se ha intentado propagar cacao cultivando diferentes tipos de explantes como cambium vascular, ápices, hojas, partes de embriones sexuales y anteras, entre otros. La mayoría de los resultados se limitan a la inducción de callos no morfogénicos o a la producción de embriones somáticos sin capacidad para continuar su crecimiento (Archibald, 1954; Ibañez, 1964; Hall y Collin, 1975; Esan, 1975; Orchard, et al., 1979; Pence, et al., 1979; Kononowicz, et al., 1984; Novak, et al., 1985; Ampomah, et al., 1988).

Diferentes investigadores han comprobado que la embriogénesis somática directa e indirecta es posible a partir de embriones cigóticos inmaduros y de ejes embrionales. (Esan, 1975; Pence, et al., 1979; Kononowicz, et al., 1984; Novak, et

al., 1985; Ampomah et al, 1988 y Duhem, et al., 1989). Aun cuando la regeneración de plantas se ha logrado al remover los cotiledones de los embriones somáticos y cultivar los ejes en medio líquido; el número de plantas obtenidas ha sido muy limitado (Ampomah et al, 1988, Duhem, et al., 1989). Con el mismo interés se ha ensayado la posibilidad de producir plantas por medio de microestacas, pero al igual que en la embriogénesis somática, el éxito en la obtención de plantas ha sido parcial (Dufour y Dublin, 1985; Bertrand, 1987). En base a lo señalado anteriormente es claro que no existe a la fecha un método efectivo para regenerar plantas de cacao.

La siguiente investigación pretende justificar el uso del microinjerto de embriones somáticos de cacao, como un método original de micropropagación para individuos con características genéticas superiores. El estudio propone los siguientes objetivos:

- Determinar el potencial embriogénico de algunos genotipos de cacao y el comportamiento de los embriones somáticos bajo condiciones controladas de cultivo.
- Establecer la técnica de microinjerto de embriones somáticos con la finalidad de regenerar plantas de cacao de manera eficiente.
- Estudiar los eventos histológicos de la microinjertación.

II. REVISION DE LITERATURA

1. EL CULTIVO IN VITRO EN CACAO

1.1. Cultivo de Apices.

En muchas especies los ápices en crecimiento muestran periodos cíclicos de actividad y latencia determinados por condiciones ambientales. En especies tropicales como el cacao esta actividad puede repetirse varias veces al año en contraste con especies de zonas templadas donde el fenómeno es anual (Orchard, et al., 1979). Alvin, et al., (1984) estudiaron los niveles hormonales en ápices de cacao, bajo condiciones de estrés hídrico, observando que las citocininas y el ácido abscisico (ABA) son importantes en el control de la actividad de yemas. Las citocininas parecen estar relacionadas con el rompimiento de la latencia de yemas y es posible que el ácido giberélico (GA_3) participe activamente en esta función y en el control de la expansión foliar. Concentraciones de $5mg \cdot l^{-1}$ de citocinina y $1mg \cdot l^{-1}$ de GA_3 permitieron la recuperación del crecimiento en un 45% de los ápices cultivados in vitro. Cantidades de 5 a $10 mg \cdot l^{-1}$ de GA_3 estimularon la apertura de yemas y el crecimiento foliar en un 75% de los casos (Orchard, et al., 1979). La proliferación de brotes y expansión foliar fue más efectiva utilizando concentraciones de 10^{-6} M de bencil adenina (BA) y 10^{-5} M de zeatina y ribósido de zeatina.

Ampomah, et al., (1987) trabajaron en cacao con diferentes concentraciones de ácido naftalenoacético (ANA) y GA₃ en medios sólidos y líquidos. Demostraron que una relación de 3:1 de GA₃ y ANA respectivamente estimuló el crecimiento de los ápices. Altas concentraciones de ambos incrementaron la formación de callo a expensas del desarrollo de brotes.

1.2. Cultivo de Microestacas.

De acuerdo con Dufour y Dublin (1985), la propagación por microestacas es ventajosa porque aumenta el coeficiente de multiplicación con respecto a otras metodologías, mejora el enraizamiento y permite la reversión del crecimiento plagiotrópico a ortotrópico. Sin embargo, la asepsia del material y la oxidación fenólica son factores limitantes para la aplicación extensiva de este método. Bertrand (1987) sugiere que la mejor época de recolecta de explantes coincide con el inicio del reposo vegetativo de yemas. El rompimiento de este reposo se logra con la aplicación de BA y el alargamiento de las yemas se obtiene con el incremento en los niveles exógenos de auxinas y giberilinas. Tasas de brotación entre el 80 y 100% se lograron utilizando concentraciones de BA de 0,44 uM y de ANA de 5,0 uM. Bertrand, 1987.

Flynn, et al., (1990), lograron el crecimiento de brotes en el medio de cultivo de Mc Cown's (Lloyd y Mc Cown's; 1980) sin la aplicación de reguladores del crecimiento. Un 85% de

los explantes mostraron desarrollo de yemas y producción de hojas. Estos investigadores consideran que hay muchos factores involucrados en esta respuesta.

1.3. Embriogenesis Somática.

La embriogénesis somática o asexual es el desarrollo de embriones a partir de células somáticas que no son producto de la fusión de los gametos. Este fenómeno ocurre en forma natural en tejidos embrionarios de muchas especies. En cultivos in vitro la embriogénesis también ocurre estando asociada a diferentes tejidos como epidermis, parénquima y tejido vascular. Los embriones somáticos tienen la capacidad de desarrollarse en plantas, sin embargo en muchas especies esto no se ha logrado (Ammirato, 1983). En los últimos años se han obtenido algunos resultados en especies forestales, cereales, leguminosas de grano, cultivos tropicales recalcitrantes como banano, yuca, mango y cacao (Ammirato, 1989).

Buchheim, et al., (1989) han encontrado que existe una gran similitud entre la embriogénesis somática y la sexual identificando como los principales estados morfogénéticos: el globular, el de corazón y el de torpedo, este último con dos subestados adicionales. El primero consiste en la transición del callo al estado globular, con un período de activa división, que culmina con la formación de grupos celulares y el segundo se orienta hacia la formación del estado de corazón

que comprende el desarrollo de una hendidura en el embrión globular (Sung, 1985). En la embriogénesis somática es común la presencia de anomalías en el desarrollo llamadas "neomorfos", asociados a cualquier tipo de aberración morfogénica. Su origen puede ser la alteración de un programa de diferenciación o la presencia de condiciones desfavorables para la expresión de un programa determinado (Ranch y Pace, 1988).

El nivel de organización de las células depende del ambiente químico y físico del medio de cultivo (Ranch y Pace, 1988). Por ejemplo, bajo condiciones de alta presión osmótica, los embriones somáticos pueden desarrollarse directamente de los cotiledones en ausencia de reguladores del crecimiento. El estrés osmótico causa plasmólisis separando las células adyacentes, lo cual podría ser un mecanismo que favorece la expresión del estado embriogénico (Sung, 1985).

La embriogénesis somática en cacao ha sido estudiada desde hace 15 años utilizando diferentes explantes como ápices, hojas y otros sin éxito (Esan, 1975; Pence, et al., 1979). Más recientemente, al emplear tejidos de embriones cigóticos maduros e inmaduros se ha logrado la diferenciación de embriones adventicios tanto por la vía directa (Pence et al., 1979; Novak, et al., 1985; Rao y Lee, 1986; Duhem, et al., 1989; como la indirecta (Kononowicz, et al., 1984; Novak, et al., 1985; Ampomah et al., 1988; Duhem, et al., 1989).

Hay antecedentes de que los embriones somáticos de cacao se originan de embriones cigóticos inmaduros a partir de dos vías; un proceso de desarrollo en el cual las células epidérmicas pasan a través de una serie de etapas de desarrollo similares a la embriogénesis sexual, desde el estado globular hasta la formación de un suspensor y una segunda vía de diferenciación de células meristemáticas subepidérmicas de los cotiledones (Esan, 1975; Pence, et al., 1979; Kononowicz, et al., 1984; Rao y Lee, 1986).

Evidencias histológicas muestran diferencias en el origen y desarrollo de embriones somáticos de cacao. Algunos investigadores coinciden en que se originan de células epidérmicas cotiledonares, hipocotilares o de capas celulares subepidérmicas por divisiones anticlinales que dan origen a la formación del suspensor y divisiones periclinales para el desarrollo de la estructura globular (Rao y Lee, 1986; Ampomah, et al., 1988). Otras observaciones sugieren un origen directo a partir de tricomas glandulares (Esan, 1975; Pence, et al., 1979).

La formación de zonas meristemáticas en capas subepidérmicas, consiste de células alargadas con citoplasma denso y ricas en taninos (Rao y Lee, 1986). Observaciones similares se han hecho en la organogénesis de Pinus radiata, donde la formación de meristemoides ocurre a partir de una sola célula subepidérmica del cotiledón en contacto con el medio y se cree que otros sistemas de diferenciación tienen un

origen similar (Villalobos, et al., 1985). En general las células embriogénicas poseen un denso citoplasma granular, son pequeñas y tienen núcleos con prominentes nucleolos. Pero, usualmente su existencia es precaria y pueden perder rápidamente su capacidad embriogénica principalmente si proceden de suspensiones celulares (Ranch y Pace, 1988).

Se cree que en algunas plantas las células epidérmicas mantienen el estado embriogénico a pesar de su propio estado de diferenciación celular, lo que permite el desarrollo de embriones somáticos sin una etapa intermedia de callo. Esto indica que el estado embriogénico es estable y que se mantiene a través del tiempo, a pesar de la división y diferenciación celular (Sung, 1985).

Dependiendo del genotipo se pueden dar diferentes estímulos para la iniciación del estado embriogénico. En zanahoria el estímulo de la embriogénesis es el subcultivo de células a medio fresco, más que la remoción de los inhibidores. Para muchas especies, el 2,4-Dicloro fenoxiacético (2,4-D) parece ser esencial en la inducción de embriones, pero su actividad es pasiva o inhibitoria en la expresión embriogénica (Sung, 1985). En cacao, si bien es cierto que la auxina exógena no es esencial para la inducción de embriones, la baja concentración del 2,4-D (10^{-3} - 10^{-2} mg/l) indujo la máxima frecuencia embriogénica (Kononowicz, et al., 1984). Ampomah y col., (1988) trabajaron con diferentes auxinas y determinaron que el efecto del ANA fue superior a

las otras auxinas ensayadas. Los embriones en presencia de ANA fueron más desarrollados, lo que incrementó la probabilidad de regenerar plantas completas. Otros autores coinciden con estos resultados (Esan, 1975; Pence, et al., 1979; Rao y Lee, 1986; Novak, y col., 1985). Los autores argumentan que la caseína hidrolizada y el agua de coco son buenos aditivos al medio de cultivo, aún cuando otras investigaciones contradicen estos resultados (Duhem, et al., 1989) y afirman que la embriogénesis somática en cacao es inducida en un medio rico en citocininas y no en auxinas y que el agua de coco y la caseína hidrolizada no son esenciales.

Los estudios de Sung (1985) y Buchheim, et al., (1989) han encontrado que los embriones somáticos de diferentes especies presentan anormalidades morfológicas cuando se emplean altas concentraciones de 2,4-D. Igualmente Ammirato y Steward, (1971) encontraron que las altas concentraciones de azúcar estimulan la formación de callos embriogénicos, reducen la frecuencia de anormalidades en el desarrollo, e inhiben la germinación precoz. Además altos niveles de sacarosa, sorbitol e inositol elevan la osmolaridad del medio de cultivo estimulando la inducción embriogénica y la maduración de embriones (Ranch y Pace, 1988; Ammirato, 1989). En cacao, las altas concentraciones de sacarosa (5-7%) estimularon el desarrollo de embriones somáticos, el alargamiento y

engrosamiento de los cotiledones, acentuando su coloración púrpura, y semejando embriones cigóticos maduros (Rao y Lee, 1986).

Las mayores interrogantes de la embriogénesis somática en cacao están relacionadas con el proceso de maduración del embrión y la regeneración de las plantas completas. Se sabe que disminuyendo la concentración de auxinas y citocininas y adicionando pequeñas concentraciones de GA_3 se promueve la germinación (Kononowickz, y col., 1984; Ampomah et al., 1988). El carbón activado también tiene su efecto precipitando sustancias inhibitorias (Duhem, et al., 1989). Por otro lado, se ha observado que la remoción de los cotiledones puede ser un factor determinante para el desarrollo del embrión (Novak, et al., 1985 y Duhem, et al., 1989).

1.4. Cultivo de Embriones Cigóticos.

Hu y Wang (1986) señalan que el cultivo in vitro de embriones sexuales ha sido estudiado en un gran número de especies pertenecientes a unos 72 géneros de plantas con diferentes aplicaciones. Por ejemplo, se ha utilizado para estudiar los requerimientos nutricionales y físicos de la embriogénesis, para romper la dormancia de las semillas ortodoxas; para acortar los ciclos en los programas de mejoramiento, para el rescate de embriones provenientes de hibridaciones interespecíficas e intergenéricas, así como para el rescate de embriones inmaduros de cruces incompatibles,

facilitar la recolección y conservación de material genético y el establecimiento de bancos de germoplasma, para incrementar la tasa de germinación de semillas y para determinar la viabilidad (Hu y Wang, 1986; Lanaud, 1987; Yidama y Withers, 1987).

En cacao, particularmente el cultivo in vitro de embriones tiene gran relevancia por ser una especie recalcitrante lo que invalida la recolecta de material por los métodos comunes para especies ortodoxas. Usualmente se recolectan estacas leñosas y frutos maduros, pero estos se deterioran rápidamente debido al ataque de patógenos y estrés fisiológicos por lo que necesitan ser incorporados rápidamente a las colecciones de campo, como la opción más accesible de conservación (Yidama y Withers, 1987). Esan (1975) encontró que las semillas pierden la viabilidad en periodos menores de 30 días aún cuando estén almacenadas bajo condiciones artificiales.

Los primeros intentos para el cultivo in vitro de embriones cigóticos de cacao los realizó Ibañez (1964), quien determinó el efecto de diferentes azúcares como sacarosa, dextrosa, maltosa, lactosa y sorbosa, sobre la tasa respiratoria de embriones maduros sin cotiledones. Se encontró que la dextrosa y la sorbosa se metabolizaban ligeramente, seguido por la sacarosa; pero la lactosa y maltosa parecían más bien inhibir la respiración. Esan (1975) determinó que a concentraciones muy bajas de sacarosa y de GA₃

el crecimiento es lento, sucediendo lo mismo a concentraciones muy altas ($10 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$) o muy bajas ($10 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$) de triptona. El mejor resultado se obtuvo en presencia de $10,0 - 60,0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de GA_3 y de 5 - 20% de sacarosa.

Pence, y col., (1979) cultivaron embriones sexuales inmaduros de cacao en el medio básico de Murashige y Skoog (MS, 1962) con agua de coco ($100 \text{ ml}\cdot\text{l}^{-1}$) y ANA ($1,5 \text{ ml}\cdot\text{l}^{-1}$) y fueron capaces de germinar. Existe un bajo número de semillas aplanadas en las mazorcas de cacao, las cuales son poliembriónicas. Estos embriones tienen la peculiaridad de que por su origen pueden ser haploides (Lanaud, 1987; Palma, 1989). Para el crecimiento de estos embriones, Lanaud (1987) propuso un medio de cultivo MS complementado con los microelementos de Heller, vitaminas de Morel, ácido etilendiamina tetra acético (EDTA) y el pH ajustado a 5,5. La autora utilizó diferentes concentraciones de glucosa y reguladores del crecimiento.

2. ANTECEDENTES DE LA MICROINJERTACION.

Moore, (1984) define al injerto como el acoplamiento de tejidos de dos individuos, de tal manera que la unión se de y el crecimiento se produzca. El éxito del injerto depende de la unión funcional de los dos componetes a fin de que el prendimiento se de.

En plantas con poca capacidad morfogénica, se han ensayado sistemas que permitan superar los problemas asociados con juvenilidad, oxidación, pérdida de la estabilidad genética, deterioro clonal, inhibición del enraizamiento entre otros (Bonga, 1982; Mosella y Ascui, 1984).

Navarro fue el primer investigador que aplicó la técnica del microinjerto, inicialmente para obtener cítricos libres de virus (Navarro, et al., 1975).

2.1. El Microinjerto en Cítricos.

Los productores de cítricos en España enfrentaron serios problemas debido a que sus plantaciones eran atacadas por enfermedades virales, entre las que cabe destacar la exocortis, la tristeza, la psoriasis y la xyloporosis que en conjunto causaban graves pérdidas económicas (Murashige et al., 1972; Navarro, et al., 1975). En la lucha contra estas enfermedades se usaron tres métodos: la termoterapia que permite la limpieza de ápices de ciertos virus como la tristeza y la psoriasis, pero que es ineficaz contra exocortis. El cultivo de plantas nucelares es otro método que permite la obtención de plantas libres de virus; sin embargo tiene el inconveniente de que las plantas resultantes tienen caracteres juveniles. El cultivo de meristemas ha sido la solución en otras especies para la obtención de plantas libres de virus, pero en cítricos no ha tenido aplicación. El microinjerto de ápices sobre patrones provenientes de semilla

permitió la obtención de plantas sanas, libres de virus y sin caracteres juveniles (Murashige, et al, 1972; Navarro, et al., 1975).

2.2. Microinjerto en Rosáceas.

En rosáceas la técnica del microinjerto se ha aplicado para obtener plantas sanas a partir de plantas madres infectadas con el virus "Plum Pox" y "Prunus Necrotic Ringspot", así como una nueva opción para la micropropagación de estas especies (Jonard, et al, 1983; Mosella y Ascui, 1984). Inicialmente esta técnica se aplicó a especies como el durazno y más tarde en manzano, damasco y vid (Mosella y Ascui, 1984). La técnica inicial de microinjertación utilizada en cítricos fue modificada en rosáceas, donde se utilizaron diferentes pretratamientos para estimular el desarrollo de los ápices. Esto consistió en colocar los ápices sobre papel filtro humedecido con las soluciones minerales de MS, suplementado con auxinas y citocininas. La nutrición de los microinjertos también fue mejorada al colocar una pieza de agar con BA y zeatina entre el patrón y el injerto (Jonard, et al; 1983). Otra técnica propuesta fue la microinjertación in vivo de ápices pretratados in vitro, esto permitió la obtención de plantas sanas en forma más sencilla que la técnica in vitro anteriormente utilizadas (Mosella y Ascui, 1984).

2.3. Microinjerto en Especies Maderables.

Debido a las conocidas limitaciones de la reproducción sexual, el mejoramiento genético de especies forestales se realiza mediante la selección clonal. Sin embargo la propagación vegetativa de individuos adultos tiene varios inconvenientes como la plagiotropía y la pérdida de la capacidad morfogénica a medida que los árboles son más adultos (Biondi y Thorpe, 1981; Bonga, 1982 y Villalobos, et al., 1983). El cultivo in vitro de estas especies no supera las limitaciones de los métodos de propagación convencional, por lo que se ha recurrido a técnicas más complejas. El microinjerto in vitro permite aprovechar la estabilidad genética y características morfogénicas de los ápices y al mismo tiempo evita los problemas asociados a juvenilidad y al enraizamiento de los tejidos adultos (Bonga, 1982). En Pinus pinaster, Sequoiadendron giganteum y Cedrela odorata el microinjerto se ha utilizado para el rejuvenecimiento de meristemas y la posterior aplicación en mejoramiento genético (Monteuuis, 1986; Ojeda, 1986).

Ojeda (1986) logro microinjertar ápices de Cedrela odorata en patrones de la misma especie con fines de mejoramiento. No obstante la ventaja evidente de la técnica, este autor considera que el microinjerto es una herramienta válida para las especies forestales, sin embargo no puede aplicarse extensivamente por las características peculiares de las diferentes especies.

3. EVENTOS HISTOLOGICOS ASOCIADOS AL INJERTO.

Se ha demostrado que durante la unión de un injerto compatible se dan tres eventos: 1) la cohesión entre el injerto y el portainjerto como resultado de la deposición de materiales de la pared celular y polimerización de los mismos; 2) proliferación de callo y 3) rediferenciación vascular entre los haces vasculares de las partes involucradas, probablemente en respuesta a la liberación de auxinas (Moore, 1984).

Cuando las superficies del patrón y el injerto están en contacto, se establece un estado dinámico de comunicación para desarrollar una unión continua, la cual es imprescindible para la organización y funcionamiento de la planta completa. En los tejidos adyacentes a la unión con el injerto, se da un incremento en el número de células, producto de la intensa actividad mitótica, que es la condición básica para que se de la unión (Yeoman y Brown, 1976). Por ejemplo en microinjertos de Prunus se observó que las células del callo proliferaron principalmente del parénquima medular del patrón y del injerto. La coalescencia de las paredes celulares del callo se observó siete días después de haberse realizado el injerto (Gebhardt y Goldbach, 1988). Estos cambios se manifiestan con un engrosamiento de las superficies patrón-injerto, debido a la activación de la división celular en las zonas meristemáticas, se aceleran los mecanismos de síntesis de polisacáridos y otras macromoléculas las que son depositadas

en la superficie de contacto y difundidas a través de la pared celular, para asegurar la unión (Yeoman y Brown, 1976).

Las comunicaciones intercelulares se dan por medio del plasmodesmata existente en las células de ambos patrones, también ocurre por conexiones citoplasmáticas entre protoplastos no relacionados y por puentes celulares que se forman posteriormente en células que no están en división (Kollmann y Glockmann, 1985). En el injerto la ocurrencia del plasmodesmata en la región donde se interconecta el tejido vascular tiene un significado funcional. Kollmann, et al (1985) indican que las conexiones celulares tempranas son necesarias, particularmente donde se interrumpe el transporte de sustancias. El ápice vegetativo es considerado la fuente natural de auxinas que determina la extensión y polaridad de la diferenciación vascular. En un injerto el transporte basípeto de la auxina es bloqueado y los haces vasculares se convierten en receptores de la misma, por lo tanto es necesario la formación de nuevos elementos vasculares a fin de garantizar la conexión (Gebhardt y Goldbach, 1988). La compatibilidad de los injertos ha sido claramente demostrada con relación directa a las conexiones vasculares establecidas en la unión; debido a que éstas restauran el flujo de agua y nutrimentos en el injerto y establecen la fuerza mecánica suficiente para sostener el injerto (Parkinson, y col., 1987). Debido a la diferenciación de células del callo y la activación del cambium vascular, se producen nuevos elementos

de xilema y floema. Estos elementos de ambos sistemas se fusionan por disolución de sus paredes celulares (Monzer y Kollmann, 1986). Los primeros elementos del xilema se diferencian cerca del corte, son formados del patrón y se desarrollan en forma acrópeta, usualmente son elementos cortos. Las células del xilema que estaban en proceso de diferenciación antes de realizarse el injerto, permanecen en ese estado y nunca forman engrosamientos secundarios lignificados. El procambium se forma por divisiones periclinales de células del parénquima, posteriormente estas células dan origen a los elementos vasculares primarios y al cambium vascular.

En microinjertos de Prunus se determinó que el desarrollo del cambium vascular en una zona del tejido interfascicular, no es un requisito para el establecimiento de conexiones vasculares, sino que los nuevos elementos del xilema son formados en el brote injertado alrededor de la región medular (Gebhardt y Goldbach, 1988). La presencia de poros cribosos continuos entre elementos cribosos del injerto-portainjerto, demuestran la continuidad simplástica de la unión (Kollmann, y col., 1985). Existen evidencias de que los poros cribosos se originan en aquellas áreas donde inicialmente habían plasmodesmata, por lo que su presencia en la unión, puede significar el desarrollo de nuevas células del floema (Monzer y Kollmann, 1986). Kollmann, et al., (1985) sugieren la existencia de un sistema de reconocimiento celular y

coordinación funcional que permita el desarrollo de los injertos en plantas superiores. Es posible que la formación de áreas cribosas en el floema, puntuaciones y placas perforadas en el xilema y plasmodesmata en el parénquima dependen de algún mecanismo de comunicación celular entre las partes involucradas (Moore y Walker, 1981). Se ha pensado que las auxinas son las moléculas de reconocimiento celular en injertos compatibles. Contrario a estas ideas otros investigadores argumentan que todos los eventos que ocurren en la unión de un injerto compatible tienen explicación sin que haya tal sistema de reconocimiento. Sin embargo, en los injertos compatibles la diferenciación vascular de las células del callo está estrechamente correlacionada con la presencia de auxinas (Moore, 1984). Mediante la aplicación de reguladores del crecimiento se ha demostrado, que estos pueden afectar el número de uniones vasculares y la formación del callo (Parkinson y Yeoman, 1982).

Las condiciones in vitro pueden alterar favorablemente la maquinaria metabólica de la interfase patrón-injerto. Por ejemplo, los niveles de carbohidratos endógenos requeridos para la xilogenesis y la formación de paredes celulares, pueden alterarse en relación a la concentración de sacarosa del medio de cultivo. La deposición de pectinas, responsables de la adhesión inicial de las paredes celulares, puede ser promovida durante la regeneración in vitro. Además la liberación de fenoles y otros compuestos perjudiciales para la

cicatrización pueden ser más fácilmente controlados bajo condiciones in vitro (Gebhardt y Goldbach, 1988).

A la fecha no se había intentado la microinjertación de embriones somáticos ni gaméticos. Esta modalidad de la microinjertación abre importantes perspectivas para la obtención de plantas a partir de embriogénesis, particularmente en aquellas especies que han mostrado problemas en la germinación de embriones como es el caso de muchas especies tropicales arbóreas, ejemplo, Enterolobium, mango y el cacao.

La microinjertación de embriones somáticos de cacao permitirá ampliar el conocimiento acerca de los fenómenos involucrados en la respuesta de explantes de cacao al cultivo in vitro.

III. MATERIALES Y METODOS

La presente investigación se realizó en la Unidad de Biotecnología del Programa de Mejoramiento de Cultivos Tropicales, CATIE, Turrialba, Costa Rica, durante noviembre de 1989 a octubre de 1990.

El material vegetal se obtuvo de la colección de cacao mantenida en el CATIE, Turrialba, Costa Rica. Para el desarrollo de portainjertos se cultivaron embriones sexuales maduros de 5 a 6 meses de edad del clon IMC-67 y como fuente de explantes para la embriogénesis somática, se utilizaron embriones sexuales de 4 a 5 meses de edad de los clones CC-18, EET-400, POUND-12, UF-613. En todos los experimentos se emplearon medios de cultivo semisólidos con $7 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ de Difco-agar y sacarosa al 3% como fuente de carbono, excepto en el experimento de concentraciones (Sección 3.3.).

1. CULTIVO DE PORTAINJERTOS.

A fin de obtener los portainjertos, se emplearon frutos maduros de 180 días de edad del clon IMC-67, se llevaron al laboratorio, se lavaron superficialmente con agua y detergente y se flamearon tres veces en la campana de flujo laminar. Las semillas se aislaron y se disectaron eliminando la sarcotesta y dos tercios de los cotiledones.

Para su germinación en condiciones asépticas se utilizó el medio básico de MS suplementado con hierro, vitaminas e inositol. Los medios se distribuyeron en tubos de ensayo de 15 por 2,5cm, en un volumen de 15 ml por tubo. Los medios se esterilizaron en autoclave a 121°C (1,05 Kg de presión/cm²) durante 20 minutos.

Se ensayaron cinco concentraciones de caseína hidrolizada, 0, 250, 500, 750, 1000 mg·l⁻¹ con tres valores de pH ajustados a 5,7 - 6,7 y 7,7 (Cuadro 1). Para este experimento se utilizaron semillas enteras y semillas disectadas al eliminarseles parte de sus cotiledones.

Cuadro 1. Concentraciones de Caseína Hidrolizada y valores de pH utilizados en el desarrollo de portainjertos de cacao.

DOSIS DE CASEINA HIDROLIZADA mg·l ⁻¹	pH		
	5,7	6,7	7,7
0	1	2	3
250	4	5	6
500	7	8	9
750	10	11	12
1000	13	14	15

1.1. Variables Evaluadas.

Los portainjertos se evaluaron durante tres semanas de cultivo. Como variables se consideraron las siguientes:

- Porcentaje de germinación.
- Desarrollo de raíces secundarias.
- Longitud del eje hipocotilo radicular.
- Longitud del epicotilo.
- Numero de hojas.
- Formación de callo en el eje.

2. INDUCCION DE RAICES ADVENTICIAS EN LOS PORTAINJERTOS.

Para inducir las raíces adventicias se emplearon plántulas de tres semanas de cultivo eliminandose las raíces y se cultivaron en medio MS diluído en diferentes proporciones: 100, 50 y 25 %. Con el mismo objetivo se empleó el medio básico MS diluído al 50%, suplementado con diferentes concentraciones de ácido indol butírico (AIB): 0,5; 1,0; 1,5 y 2,0 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$.

2.1. Variables Evaluadas.

Se realizaron cuatro observaciones cada 7 días considerando los siguientes parámetros:

- Desarrollo de raíces adventicias.
- Número de raíces por planta.
- Longitud promedio de raíces (medidas desde el extremo proximal hasta el ápice de la raíz).

- Grosor promedio de las raíces (medidas en el extremo proximal de la raíz).
- Oxidación de la raíces.
- Desarrollo de callos en el hipocotilo.

2.2. Condiciones Físicas de Cultivo.

Todos los cultivos se incubaron en cámaras de ambiente controlado a un fotoperíodo de 16 horas, una temperatura de $27 \pm 2^{\circ}\text{C}$ y a una intensidad lumínica aproximada de 1700 lux.

2.3. Análisis de Resultados.

Con el propósito de seleccionar un medio de cultivo adecuado para el desarrollo de portainjertos, se utilizó un diseño completamente al azar evaluándose 14 tratamientos que combinaban concentraciones de caseína hidrolizada y valores de pH. En este ensayo se utilizaron 10 repeticiones por tratamiento.

En los experimentos de inducción de raíces adventicias en portainjetos se utilizó un diseño completamente al azar. En el ensayo con concentraciones del MS diluido se utilizaron tres tratamientos con 10 repeticiones cada uno.

En el segundo ensayo con concentraciones del AIB se utilizaron cuatro tratamientos con 10 repeticiones cada uno.

Los análisis de varianza se realizaron utilizando el programa micro-sas.

El modelo estadístico para todos los ensayos fue el siguiente:

$$Y_{ij} = u + M_i + E_{ij}$$

En donde

Y_{ij} = Variable de respuesta

u = Medio general

M_i = Efecto del medio de cultivo

E_{ij} = Error experimental

El análisis de varianza se estructuró de la siguiente forma:

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD
M Medio de cultivo	(M-1)
E Error Experimental	M(r-1)

La significancia estadística entre las medias de cada variable se determinó utilizando la prueba de Duncan al 0,05% de probabilidad.

3. EMBRIOGENESIS SOMATICA.

Los frutos se desinfectaron según lo indicado en el inciso 1. Para la embriogénesis somática los embriones se aislaron del fruto, se dividieron en secciones transversales y se inocularon en el medio de cultivo MS semisólido suplementado con $3 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de BA, $1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ANA. El pH se ajustó a 6,7 antes de la esterilización en autoclave.

3.1. Frecuencia de Subcultivos.

Se realizaron siete tratamientos variando la frecuencia de subcultivos a medio fresco durante los primeros 30 días de cultivo (0, 5, 10, 15, 20, 25 y 30). Se utilizaron, como explantes secciones transversales de cotiledones de embriones cigóticos de 180 días después de la polinización.

3.2. Efecto del ABA en la Embriogénesis Somática.

Para analizar el efecto de ABA se utilizó el medio de inducción antes mencionado, (sección 3) suplementado con las siguientes concentraciones 0,0; 0,25; 0,50; 0,75 y 1,0mg-l⁻¹. Como explantes se emplearon secciones transversales de cotiledón de embriones sexuales de 180 días de edad.

3.3. Efecto de las Concentraciones de Azúcar en la Embriogénesis Somática.

Se analizó el efecto de tres concentraciones de azúcar en la embriogénesis somática en los cuatro genotipos estudiados. Se utilizó el medio básico de inducción suplementado con azúcar al 3, 4 y 5%.

Todos los medios se distribuyeron en tubos de ensayo de 2,3 por 12 cm en un volumen de 10 ml por tubo y se esterilizaron como ya se indicó en la sección 1. Los cultivos se mantuvieron en la oscuridad durante dos meses antes de ser evaluados.

3.4. Variables Evaluadas.

Las variables evaluadas para todos los experimentos se indican a continuación:

- Frecuencia de explantes embriogénicos.
- Frecuencia de callo.
- Frecuencia de oxidación.

4. MICROINJERTACION.

Como portainjerto se utilizaron plántulas del genotipo IMC-67 (sección 1) con hipocotilos rectos y con el sistema radicular bien desarrollado. Las plántulas fueron disectadas a nivel del hipocotilo donde se realizó una incisión longitudinal de aproximadamente 0,5 cm para la inserción del embrión somático.

Los embriones somáticos del genotipo UF-613 se subcultivaron por un mes en un medio sin reguladores del crecimiento que contenía $500 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ de caseína hidrolizada. Para la inserción en el patrón se eliminaron los cotiledones del embrión y se realizó un corte a ambos lados de la radícula a fin de facilitar la unión con el portainjerto.

El embrión somático se acopló al portainjerto mediante una unión tipo hendidura y como soporte de la unión del microinjerto se utilizaron cintas de papel aluminio estéril.

Los microinjertos se cultivaron en el medio básico MS en tubos de ensayo de 2,5 x 15,0 cm con un volumen final de medio de 15 ml. Todos los cultivos se incubaron en presencia de luz con un fotoperíodo de 16 horas y una temperatura de $27 \pm 2^{\circ}\text{C}$.

4.1. Edad de los Portainjertos.

Para determinar el estado más adecuado de desarrollo de los portainjertos, se evaluó el comportamiento de los microinjertos realizados con plántulas de 2, 3 y 4 semanas de edad.

4.2. Presencia o Ausencia de los Cotiledones del Embrión Somático.

Se realizaron 54 microinjertos utilizando embriones somáticos con cotiledones completos, medio cotiledón y sin cotiledones.

4.3. Efecto del AIB en el Desarrollo del Injerto.

Se estudió el efecto de $1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de AIB en la inducción de raíces, comparándolo con la ausencia de este regulador. En este experimento se evaluó tanto el desarrollo de la parte aérea como del sistema radical. Se consideró el número de raíces por planta en tres categorías:

- X : de 1 a 5 raíces.
- XX : de 5 a 10 raíces.
- XXX : más de 10 raíces.

4.4. Aclimatación.

Para el endurecimiento de los microinjertos se sacaron de los tubos de ensayo y se transplantaron a pequeños recipientes que contenían suelo estéril compuesto por diferentes substratos. Los recipientes fueron cubiertos por bolsas plásticas que al cabo de una semana se perforaron en diferentes partes y después de dos semanas se eliminaron para ser cultivados en condiciones de invernadero.

4.5. Variables Evaluadas.

En los experimentos de microinjertación se consideraron las siguientes variables:

- Formación de callo en la unión.
- Desarrollo de injertos.
- Desarrollo de hojas.
- Desarrollo de nudos y entrenudos.
- Formación de hojas irregulares.
- Inducción de raíces.
- Supervivencia.
- Plantas en aclimatación.
- Plantas en suelo.

5. ESTUDIO HISTOLOGICO.

Se fijaron cinco muestras de microinjertos cada 5 días de cultivo durante los primeros 40 días. Estas 45 muestras consistieron en secciones de 1,0 cm de longitud aproximadamente comprendiendo la zona de unión injerto-portainjerto. El fijador empleado fue Formalina-Alcohol-Acido acético (F.A.A.) y los tejidos se mantuvieron en fijador por 48 horas.

Las muestras se deshidrataron a intervalos de una hora en una serie ascendente de etanol de 70 - 100°, permaneciendo los especímenes en etanol al 100% durante 24 horas.

Para la impregnación se utilizó tolueno y para la infiltración Paraplast plus® (CIRAD, 1989). Las muestras se cortaron a 10 um de grosor y se tiñeron utilizando la técnica de cuádruple coloración con safranina, violeta cristal, "fast green" FCF y "orange" G (CIRAD, 1989).

IV. RESULTADOS

1. EVALUACION DEL PORTAINJERTO IMC-67.

1.1. Emergencia de la Radícula.

La emergencia de la radícula ocurrió entre el tercero y quinto día de cultivo, no existiendo diferencias entre tratamientos empleando caseína hidrolizada y condiciones de cultivo (pH). Después de la emergencia de la radícula, los cotiledones comenzaron a expandirse y cambiaron su coloración de púrpura a pardo y en algunos casos se tornaron verdes. Fue frecuente el desarrollo de tricomas en la superficie de los cotiledones y algunas veces hubo formación de callos.

Según el análisis de varianza no existieron diferencias significativas excepto cuando se utilizó $250 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ de caseína hidrolizada y un pH de 5,7 donde la media varió con respecto a los otros tratamientos (Cuadro 2).

1.2. Desarrollo de Raíces Secundarias.

El desarrollo de las raíces fue similar en todos los tratamientos. Cuando se utilizaron semillas disectadas la mayoría de las plántulas formaron raíces secundarias desde la primera semana de cultivo, pero cuando se utilizaron semillas enteras el desarrollo de raíces secundarias fue más lento (Apendice 1 y 2). En la tercera semana casi la totalidad de las plantas formaron raíces (Cuadro 3).

Después de la emergencia de la radícula se observó el alargamiento de la raíz principal, formación y engrosamiento del cuello de la raíz y a partir de éste se inició el desarrollo de raíces secundarias. Posteriormente también hubo desarrollo de raíces en el extremo proximal del hipocotilo. Después de la tercera semana de cultivo el sistema radicular consistió de numerosas raíces secundarias y terciarias con abundantes pelos radiculares, principalmente en las raíces que estaban fuera del medio de cultivo.

El análisis de varianza determinó que no hubo diferencias significativas entre los tratamientos (Cuadro 2), pero si entre semillas disectadas y semillas enteras (Cuadro 4) y con respecto al tiempo de cultivo (Cuadro 3).

1.3. Desarrollo del Eje Hipocotilo-radicular.

Inicialmente el eje hipocotilo-radicular fue blanco sin delimitación entre el hipocotilo y radícula. Después de la formación del cuello de la raíz, se desarrolló rápidamente el eje hipocotilar y logró diferenciarse del sistema radicular al adquirir la coloración verde característica. El desarrollo del eje hipocotilar fue bastante uniforme en todos los tratamientos y condiciones de cultivo (Apendice 1-6). Pero la longitud varió en relación a los diferentes tratamientos. Los longitudes mayores se observaron a pH de 6,7 y 7,7 con diferentes concentraciones de caseína hidrolizada. La

longitud promedio mayor fue de 8,02 cm cuando se utilizó 250 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de caseína hidrolizada y pH de 6,7. A pH de 5,7 y concentraciones de caseína de cero y 1000 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ respectivamente, se observaron los valores más bajos (Cuadro 2). La longitud del eje fue mayor en semillas disectadas (Cuadro 4) y aumentó considerablemente según el tiempo de cultivo (Cuadro 3).

1.4. Desarrollo del Epicotilo.

El desarrollo y crecimiento del eje epicotilar fue más lento que el eje hipocotilar. Se inició en la segunda semana de cultivo y para la tercera todos los embriones disectados se desarrollaron en plántulas. En contraste, cuando se utilizaron semillas enteras el desarrollo fue más lento y en la tercera semana no todos los embriones formaron el eje epicotilar. El crecimiento acelerado del epicotilo se inició hasta la tercera semana de cultivo (Cuadro 3).

No se observaron diferencias significativas con respecto a los tratamientos con caseína hidrolizada; sin embargo la media mayor para la longitud del epicotilo correspondió al tratamiento sin caseína hidrolizada y pH de 6,7 y la media menor a 1000 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de caseína hidrolizada y pH de 6,7 (Cuadro 2).

1.5. Número de Hojas.

El desarrollo de las hojas se inició a partir de la segunda semana. El número mayor de hojas se observó en el medio sin caseína y pH ajustado a 6,7; el número menor se presentó con $1000 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de caseína hidrolizada y pH de 5,7 con valores intermedios en los otros tratamientos (Cuadro 2).

Las plántulas con cotiledones disectados tuvieron un valor medio de 2,5 hojas, mientras que en las plántulas con cotiledones enteros la media fue de 1,7. Estos resultados mostraron diferencias estadísticamente significativas (Cuadro 4). El desarrollo de hojas se acentuó a partir de la tercera semana de cultivo con incrementos en la longitud y ancho de la lámina foliar.

1.6. Formación de Callos en el Tallo.

La formación de callos fue bastante frecuente a lo largo del eje hipocotilo-radicular; el callo fue generalmente blanco y de consistencia pulverulenta. Según el análisis de varianza existieron diferencias significativas para algunos tratamientos (Cuadro 2). Sin embargo, esta variable pudo estar más relacionada al tiempo de cultivo ya que la formación de callo se incrementó en la tercera semana (Cuadro 3). Los porcentajes para cada una de estas variables en semillas enteras y semillas disectadas se muestran en los cuadros del Apéndice (Apéndice 1 al 6).

Cuadro 2. Cultivo de portainjertos en diferentes combinaciones de caseína hidrolizada y valores de pH.

TRATAMIENTOS CH/2 + pH mg·l ⁻¹	NUMERO SEMILLAS GERMINADAS/ ³	DESARROLLO RAICES SE- CUNDARIAS	LONGITUD EJE HIPO- RADIC cm	LONGITUD EPICOTILO cm	NUMERO HOJAS	CALLO TALLO	
0	+ 5,7	5,00 a	3,50 a	5,96 c	3,50 a	2,05 abc	2,25 a
	+ 6,7	5,00 a	4,17 a	7,26 ab	3,84 a	2,55 a	1,75 ab
	+ 7,7	5,00 a	4,33 a	7,93 a	3,51 a	2,40 ab	1,25 ab
250	+ 5,7	4,50 b	4,00 a	7,04 ab	3,31 a	1,84 bc	1,50 ab
	+ 6,7	5,00 a	4,17 a	8,02 a	3,47 a	2,05 abc	1,50 ab
	+ 7,7	5,00 a	4,33 a	7,15 ab	3,51 a	1,75 bc	1,75 ab
500	+ 5,7	5,00 a	3,83 a	7,92 a	3,47 a	2,00 abc	2,00 ab
	+ 6,7	5,00 a	3,83 a	7,46 ab	3,79 a	2,15 abc	2,00 ab
	+ 7,7	5,00 a	4,00 a	7,05 ab	3,26 a	2,18 abc	2,25 a
750	+ 5,7	5,00 a	3,83 a	7,21 ab	3,43 a	2,15 abc	2,00 ab
	+ 6,7	5,00 a	4,17 a	7,14 ab	3,64 a	2,25 abc	1,75 ab
	+ 7,7	5,00 a	4,00 a	7,42 ab	3,25 a	2,10 abc	0,75 b
1000	+ 5,7	5,00 a	3,50 a	6,59 bc	3,19 a	1,70 c	1,75 ab
	+ 6,7	5,00 a	3,67 a	7,79 a	3,17 a	2,30 abc	1,25 ab
	+ 7,7	5,00 a	4,33 a	7,63 a	3,57 a	2,15 abc	1,50 ab

1. Prueba Duncan, en donde las medias con la misma letra no difieren estadísticamente entre sí ($P \leq 0,05$).
2. Caseína hidrolizada.
3. El número total de semillas por tratamiento fue de 15, pero se hicieron evaluaciones semanales de 5 semillas.

Cuadro 3. Medias de las variables analizadas en el cultivo de portainjertos con respecto al tiempo de cultivo.

DIAS EN CULTIVO	NUMERO SEMILLAS GERMINADAS	DESARROLLO RAICES SECUNDARIAS	LONGITUD EJE HIPO-RADIC	LONGITUD EPICOTILO	NUMERO HOJAS	CALLOS EN EL EJE
7	5,00	2,37 b	4,60 c	---	---	---
14	5,00	4,63 a	6,28 b	0,59 b	0,99 b	0,13 b
21	5,00	4,93 a	11,04 a	6,33 a	3,23 a	3,23 a

1. Prueba Duncan en donde las medias con la misma letra no difieren estadísticamente entre sí ($P \leq 0,05$).
2. El número total de semillas por tratamiento fue de 15, pero se hicieron evaluaciones semanales de 5 semillas.
3. La longitud para todos los tratamientos fue medida en cm.

Cuadro 4. Medias de las variables analizadas en el cultivo de semillas enteras y disectadas para la obtención de portainjertos.

TRATAMIENTOS TIPO EXPLANTE	NUMERO SEMILLAS GERMINADAS/2	DESARROLLO RAICES SE- CUNDARIAS	LONGITUD EJE HIPO- RADIO cm	LONGITUD EPICOTILO cm	NUMERO HOJAS	CALLO TALLO
SEMILLAS DISECTADAS	5,00 a	4,64 a	7,98 a	3,76 a	2,52 a	1,77 a
SEMILLAS ENTERAS	4,93 a	3,31 b	6,63 b	3,16 b	1,70 b	1,60 a

1. Prueba Duncan en donde las medias con la misma letra no difieren estadísticamente entre sí ($P \leq 0,05$).
2. El número total de semillas por tratamiento fue de 1,5, pero se hicieron evaluaciones semanales de 5 semillas.
3. La longitud para todos los tratamientos fue medida en cm.

2. INDUCCION DE RAICES ADVENTICIAS EN LOS PORTAINJERTOS.

2.1. Sales de Murashige y Skoog (1962) Diluidas en Diferentes Proporciones de su Concentración Original.

Las raíces adventicias de las plántulas de cacao no difieren mucho morfológicamente del sistema de raíces embrionario. Inicialmente se formó un anillo de callo alrededor de la superficie cortada del patrón en contacto con el medio de cultivo. Esta zona se engrosó y comenzaron a desarrollarse las raíces nuevas.

De los datos obtenidos en los primeros 15 días de cultivo no se observaron diferencias significativas entre las diluciones del medio (Cuadro 5). Sin embargo el mayor porcentaje de formación de raíces se observó a concentraciones de 25 y 50% de MS con una media de 7,0 y 6,7 raíces por planta, respectivamente. En la figura 1 se muestra la relación del número de raíces por plántula. Se observó que en los primeros 15 días de cultivo, el 90% de la plántulas cultivadas en las sales diluidas al 25 y 50% desarrollaron desde una hasta 19 raíces. Mientras en el tratamiento con el MS completo, un 80% de las plántulas desarrollaron de una a 10 raíces. En 22 días de cultivo, un 100% de las plántulas presentaron raíces en el medio MS al 50%. En este período de cultivo el 10% de las plántulas en el medio MS diluido al 25% tenían de 20 a 30 raíces.

En el Cuadro 5 se muestran los resultados obtenidos para los 15, 22 y 30 días de cultivo. Según el análisis de varianza no hubo diferencias significativas entre tratamientos. Sin embargo, a los 30 días de cultivo, el número de raíces por planta en los tratamientos con MS al 50% y MS al 100% se incrementó significativamente con medias de 11,6 y 11,0 respectivamente.

La longitud promedio de raíces por planta aumentó con el tiempo de cultivo. A los 30 días, las raíces en el primer tratamiento mostraron longitudes promedio de 2,8 cm y en el segundo tratamiento de 3,3 cm. El grosor promedio de las raíces osciló de 0,09cm a 0,12 cm en la mayoría de los tratamientos independientemente del tiempo de cultivo (Cuadro 5).

La oxidación de las raíces se presentó en la mayoría de las plántulas durante los tres periodos de evaluación. Sin embargo, su ocurrencia no causó daños aparentes. La formación de callo se observó de manera esporádica a lo largo del hipocotilo desde la primera evaluación.

Cuadro 5. Inducción de raíces adventicias en portainjertos de cacao en el medio de MS diluido al 50%.

15 días de cultivo.

TRATAMIENTOS SALES MS/2	% PRESENCIA RAICES	NUMERO PLANTA	LONGITUD RAICES /3 (cm)	GROSOR RAICES /4 (cm)	% OXIDACION	% CALLO HIPOCOTILO
15 días de cultivo.						
MS 100%	80,0 a	4,2 a	1,14 a	0,09 a	80,0 a	80,0 a
MS 50%	90,0 a	6,7 a	1,12 a	0,09 a	90,0 a	80,0 a
MS 25%	90,0 a	7,0 a	1,11 a	0,10 a	90,0 a	90,0 a
22 días de cultivo.						
MS 100%	80,0 a	6,8 a	1,35 b	0,09 a	80,0 a	80,0 a
MS 50%	100,0 a	8,1 a	2,38 a	0,12 a	100,0 a	90,0 a
MS 25%	90,0 a	10,5 a	2,41 a	0,12 a	90,0 a	100,0 a
30 días de cultivo.						
MS 100%	100,0 a	11,0 a	2,81 a	0,12 a	100,0 a	100,0 a
MS 50%	100,0 a	11,60a	3,20 a	0,12 a	100,0 a	100,0 a
MS 25%	90,0 a	10,90a	2,20 a	0,09 a	90,0 a	90,0 a

1. Prueba Duncan en donde las medias con la misma letra no difieren estadísticamente entre sí ($P \leq 0,05$).
2. Sales de Murashige y Skoog (1962) diluidas en diferentes proporciones de su concentración original.
3. Longitud desde el extremo proximal hasta el meristemo apical de la raíz.
4. Grosor, medida en el extremo proximal de la raíz.

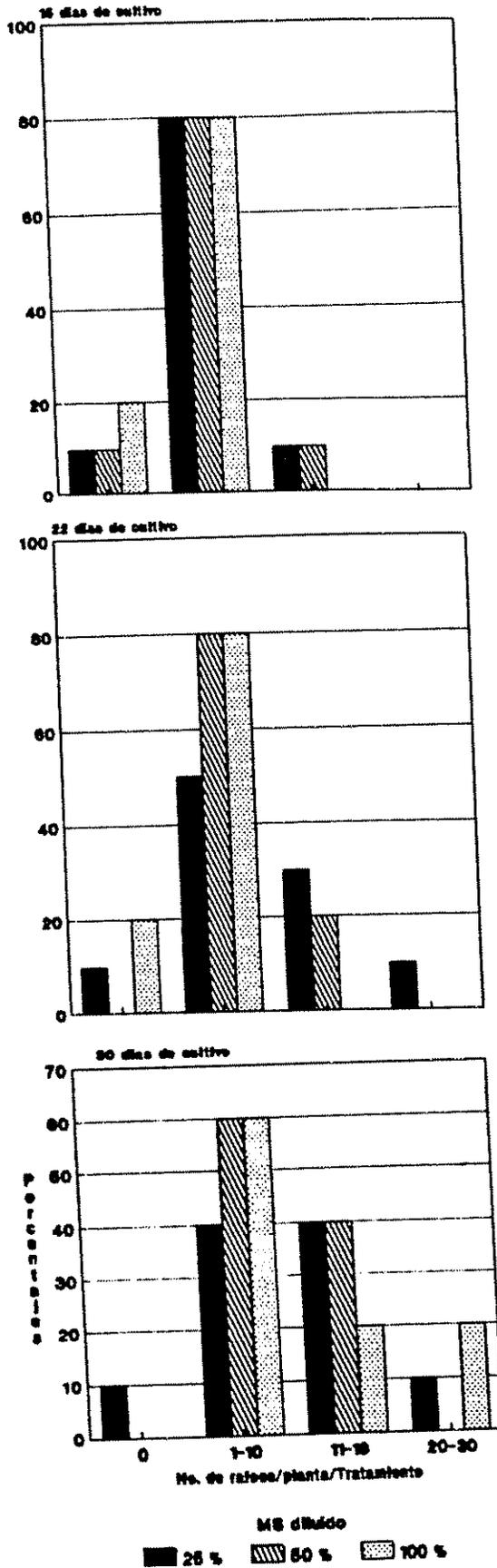


Figura 1. Número de raíces por planta en cada concentración de MS diluido (%).

2.2. Sales MS Diluidas al 50%, y Diferentes Concentraciones de AIB.

EL mejor tratamiento del experimento anterior (Sales MS al 50%), se combinó con diferentes concentraciones de AIB. A los primeros 15 días de cultivo, se observó un marcado efecto entre las concentraciones de AIB. Cuando se utilizó $0,5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de AIB no hubo producción de raíces mientras que con $2,0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de AIB el 40% de las plántulas desarrollaron raíces. Valores intermedios se observaron para las concentraciones de $1,0$ y $1,5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$. Según el análisis de varianza existieron diferencias significativas en estos resultados (Cuadro 6). En el mejor de los casos, la media para el número de raíces por planta fue de 4,7. Un 30% de las plantas presentaron de una a 10 raíces y un 10% de 20 a 30 raíces (Fig 2). La longitud de las raíces varió entre 0,3 y 0,8 cm y el grosor fue de 0,01 y 0,02 cm para todos los casos (Cuadro 6).

Los resultados observados después de 22 días de cultivo fueron diferentes con relación a los anteriores y según el análisis estadístico no hubo diferencias significativas entre los tratamientos (Cuadro 6). El mayor porcentaje de plántulas con desarrollo de raíces (50%), se observó a concentraciones de $0,5$ y $1,0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de AIB; pero en el primer tratamiento, el número promedio de raíces por planta fue de 6,8, mientras que en el segundo fue de 2,3. Cuando se utilizó $2,0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de AIB sólo el 30% de las plántulas desarrollaron raíces con un valor medio de 8,8 raíces por planta. En el tercer tratamiento

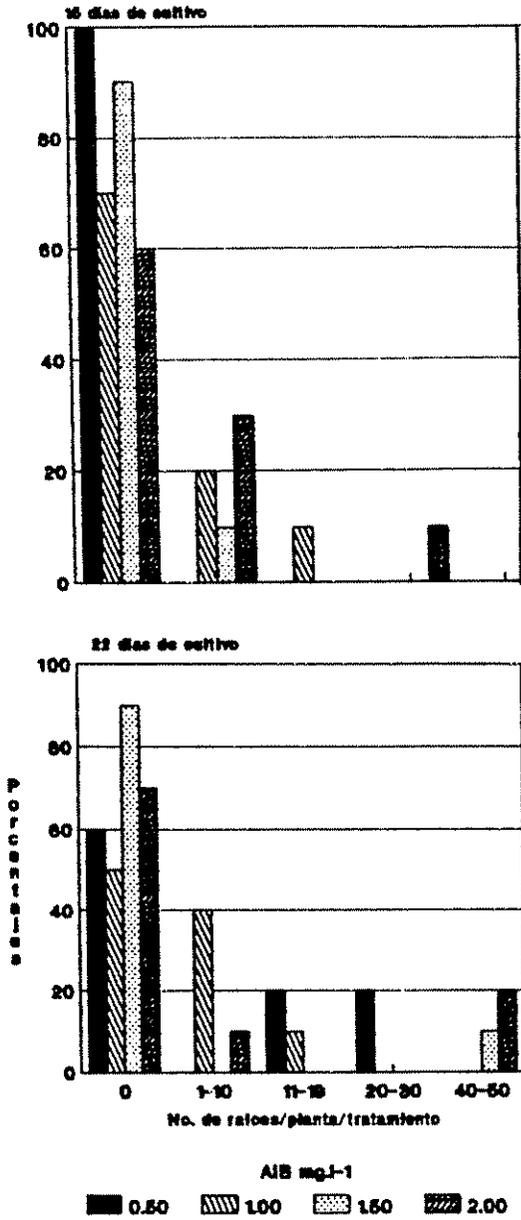
todos los valores fueron inferiores. En la figura 2 se muestra el porcentaje que corresponde al número de raíces por planta para cada una de las categorías dadas. Como se observa en el Cuadro 6 la longitud y grosor de las raíces tampoco mostraron diferencias significativas. La longitud máxima fue de 0,7 cm en presencia de $1,0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de AIB y la mínima fue de 0,1 cm con una concentración de $1,5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ del mismo regulador. El grosor de las raíces osciló entre 0,01 y 0,08 cm en todos los casos y la oxidación de las raíces se presentó en un porcentaje muy bajo y sólo en el tratamiento con $1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de ABA.

El desarrollo de callo en el hipocotilo se incrementó después de 22 días de cultivo y aparentemente fue independiente de la concentración de AIB presente en el medio.

Cuadro 6. Inducción de raíces adventicias en portainjertos de cacao con MS al 50 % y AIB.

15 días de cultivo						
TRATAMIENTO AIB $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ SALES MS^2	PRESENCIA RAICES %	NUMERO PLANTA	LONGITUD RAICES (cm)	GROSOR RAICES (cm)	OXIDACION %	CALLO HIPOCOTILO %
MS + 0,5 AIB	0,0 b	0,0 a	0,0 a	0,0 b	0,0 b	0,0 b
MS + 1,0 AIB	30,0 ab	2,50 a	0,42 a	0,01 ab	30,0 a	30,0 ab
MS + 1,5 AIB	10,0 ab	0,20 a	0,8 a	0,01 ab	0,0 b	0,0 b
MS + 2,0 AIB	40,0 a	4,70 a	0,3 a	0,02 a	0,0 b	50,0 a
30 días de cultivo.						
MS + 0,5 AIB	50,0 a	6,80 a	0,44 a	0,08 a	0,00 a	80,0 a
MS + 1,0 AIB	50,0 a	2,30 a	0,70 a	0,08 a	10,0 a	90,0 a
MS + 1,5 AIB	10,0 a	5,00 a	0,15 a	0,01 a	0,00 a	20,0 b
MS + 2,0 AIB	30,0 a	8,80 a	0,33 a	0,02 a	0,00 a	10,0 b

1. Prueba Duncan en donde las medias con la misma letra no difieren estadísticamente entre sí ($P \leq 0,05$).
2. Sales de Murashige y Skoog (1962) al 50% de su concentración original.
3. Longitud desde el extremo proximal hasta el meristemo apical de la raíz.
4. Grosor, medida en el extremo proximal de la raíz.



3. EMBRIOGENESIS SOMATICA.

En la embriogénesis somática a partir de cotiledones de cacao, se observaron diferentes cambios en el explante. Los tejidos en contacto con el medio de cultivo se expandieron, la coloración cambió de púrpura a rosado o verdoso, se desarrollaron numerosos tricomas en su superficie y se inició la formación de callo principalmente en las zonas de corte del tejido. Claramente se pudo distinguir entre dos tipos de callo: uno fue friable, cristalino, generalmente disperso en la superficie del explante y el otro compacto y localizado generalmente en las partes donde se cortó el explante inicial.

El desarrollo de embriones de cacao se inició directamente con la aparición de estructuras globulares unidas al explante. No se observó sincronización entre los diferentes estadios de la embriogénesis, sino que en un mismo explante fue evidente las diferentes etapas del desarrollo embriogénico (Fig. 3). La formación de embriones secundarios fue muy frecuente sobre los cotiledones de los embriones primarios (Fig. 4). Así mismo, la coloración de los embriones varió desde embriones de cotiledones verde claro cuando eran muy jóvenes, hasta cotiledones verde oscuro en la madurez. También se observaron cotiledones de color rosado o púrpura. El tamaño de los embriones fue bastante variable independientemente del estado de madurez, para lo cual se observaron embriones en estado globular muy grandes y embriones bien formados (dicotiledoneos) de tamaño muy

pequeño. Normalmente los embriones somáticos de cacao fueron dicotiledonares sin embargo, también se observaron otros tipos morfológicos, los cuales fueron considerados como anormales. La figura 5 muestra diferentes tipos de embriones diferenciados en este estudio.

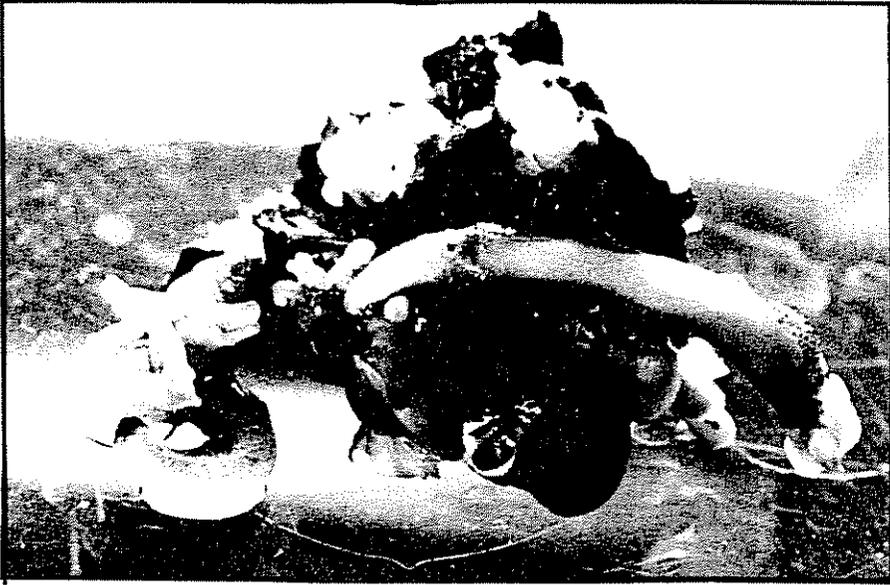


Figura 3. Diferentes estados de la diferenciación y desarrollo de los embriones.



Figura 4. Desarrollo de embriones somáticos secundarios a partir de los cotiledones de un embrión primario.

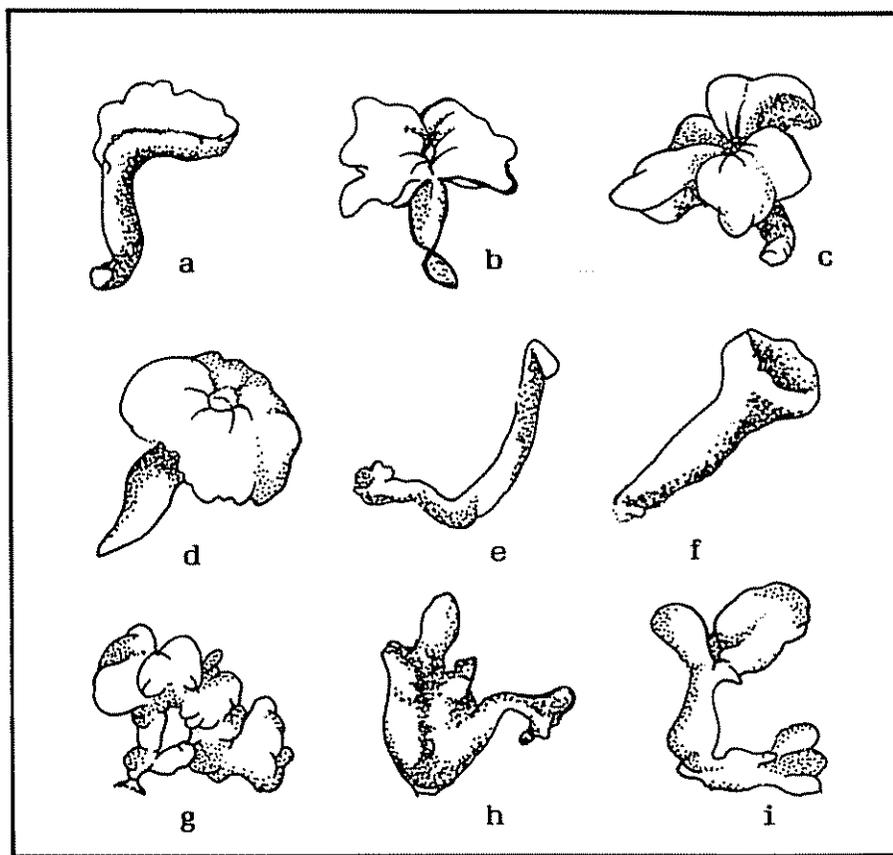


Figura 5. Clasificación de embriones somáticos basados en su morfología. a. Monocotiledon; b. Dicotiledon; c. Policotiledon; d. Cotiledones fusionados; e. Hipocotilos alargados; f. Trompeta; g. Moderadamente fasciados; h. Fuertemente fasciados; i. Fusión diaxial proximal (Buchheim, *et al*; 1989).

3.1. Frecuencia de los Subcultivos.

El resultado del experimento en subcultivos, demostró que existía una relación inversamente proporcional entre la frecuencia de los subcultivos y la frecuencia embriogénica (Cuadro 7). Para todos los genotipos estudiados la mayor frecuencia embriogénica se observó en el tratamiento A (sin subcultivos). En este experimento el genotipo POUND-12 mostró el valor más alto, con una frecuencia de 0,7 explantes con embriones. A mayor frecuencia de subcultivos (B y C), la respuesta embriogénica fue casi nula para todos los genotipos. Sin embargo ésta se incrementó en todos los genotipos cuando los explantes se subcultivaron cada 15 días (D) excepto para el genotipo POUND-12. El genotipo más embriogénico fue el EET-400, seguido por el POUND-12 y el menos embriogénico fue el CC-18 (Fig 6).

El desarrollo de callos en el explante varió entre los genotipos, pero no con respecto al tiempo de los subcultivos. El genotipo POUND-12 fue el que mostró más desarrollo de callos con una frecuencia de 3,0 mientras que en el UF-613 la frecuencia fue de 0,85 (Cuadro 8).

Este callo presentó una coloración oscura después de dos semanas de cultivo. La oxidación de los cultivos varió entre genotipos pero no entre tratamientos. Los resultados permiten indicar que la oxidación no es un factor crítico para la embriogénesis somática en cacao (Cuadro 9).

Cuadro 7. Frecuencias embriogénicas de cuatro genotipos de cacao en relación al tiempo de subcultivo ¹².

FRECUENCIA SUBCULTIVO/2	CC-18	EET-400	POUND-12	UF-613
A	0,2	0,5	0,7	0,3
B	0,0	0,0	0,05	0,0
C	0,0	0,0	0,05	0,0
D	0,1	0,2	0,05	0,2
E	0,1	0,1	0,05	0,1
F	0,1	0,4	0,05	0,05
G	0,0	0,4	0,05	0,0

1 Frecuencia embriogénica

$$FE = \frac{\text{Número de cultivos embriogénicos}}{\text{Total de cultivos iniciados}}$$

- 2 Frecuencias de subcultivo: A = cero días; B = 5 días; C = 10 días; D= 15 días; E= 20 días; F= 25 días; G= 30 días.

Cuadro 8. Frecuencias de la formación de callo en los diferentes genotipos de cacao en relación al tiempo de subcultivo ¹¹.

FRECUENCIA SUBCULTIVO/1	CC-18	EET-400	POUND-12	UF-613
A	0,4	0,4	0,5	0,4
B	0,0	0,0	0,0	0,0
C	0,3	0,7	0,6	0,05
D	0,6	0,4	0,4	0,3
E	0,2	0,1	0,8	0,2
F	0,2	0,1	0,1	0,2
G	0,0	0,5	0,6	0,0
TOTALES	1,7	2,2	3,0	0,85

- 1 Frecuencias de subcultivo: A= 0 días; B= 5 días; C= 10 días; D= 15 días; E= 20 días; F=25 días; G= 30 días.

Cuadro 9. Frecuencias de la oxidación de los explantes en cuatro genotipos de cacao en relación al tiempo de subcultivo.

FRECUENCIA SUBCULTIVO/1	CC-18	EET-400	FOUND-12	UF-613
A	0,0	0,0	0,0	0,05
B	0,1	0,5	0,2	0,0
C	0,1	0,05	0,1	0,0
D	0,0	0,0	0,0	0,0
E	0,05	0,2	0,0	0,3
F	0,1	0,1	0,05	0,0
G	0,0	0,05	0,0	0,0
TOTALES	0,35	0,9	0,35	0,35

1 Frecuencia de subcultivo: A = cero días; B = 5 días;
 (tiempo en días) C = 10 días; D = 15 días;
 E = 20 días; F = 25 días;
 G = 30 días.

3.2. Efecto del Acido Abscisico.

El efecto de ABA en la frecuencia embriogénica de cacao no fue muy evidente en los tratamientos utilizados (Cuadro 10). Sin embargo se observó que en el medio sin ABA o en presencia de $0,25 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ se obtuvo la mayor frecuencia embriogénica en la mayoría de los genotipos. La frecuencia menor se observó a una concentración de $0,75 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de ABA, excepto en el genotipo UF-613, en el cual se dio la mejor respuesta. El potencial embriogénico varió entre los genotipos siendo superior el CC-18, seguido por el EET-400; el genotipo menos embriogénico fue el UF-613 (Fig. 7). Independientemente de la concentración de ABA en el medio de cultivo, el potencial embriogénico de estos explantes fue bastante alto. El desarrollo de embriones secundarios a partir de los embriones iniciales se observó con bastante frecuencia. En la embriogénesis somática de cacao es frecuente la formación de embriones anormales (Fig. 5). Se presume que el ABA contribuye a reducir la frecuencia de estas anomalías. En los resultados obtenidos, los porcentajes para la formación de embriones anormales fueron muy altos aun en presencia de diferentes concentraciones de ABA (Cuadro 11). En los apéndices 13 al 16, se muestran los porcentajes que presentaron los diferentes tipos morfológicos para cada genotipo y en cada concentración de ABA. Se observó que los tipos más frecuentes son aquellos que difieren en el número de cotiledones (Fig. 8a y b), los que presentan hipocotilos

alargados (Fig. 9a) y los embriones moderadamente fasciados (Fig. 9b).

No se observaron diferencias significativas en la formación de callos entre los tratamientos, pero sí entre genotipos, donde el POUND-12 constituyó el genotipo más callogénico y el UF-613 el que mostró menos formación de callos (Cuadro 12). La oxidación de los explantes no fue dependiente de la concentración de ABA en el medio de cultivo, pero sí varió entre los genotipos, donde el EET-400 presentó una frecuencia de explantes oxidados de 1,2, seguido por 1,0 en el genotipo CC-18, en contraste con una frecuencia de 0,05 en el UF-613 (Cuadro 13).

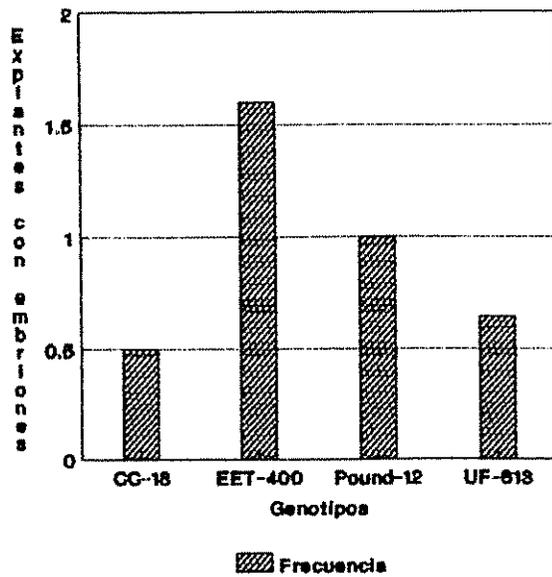


Figura 6. Sumatoria de las frecuencias embriológicas de cuatro genotipos de cacao subcultivados en diferentes tiempos.

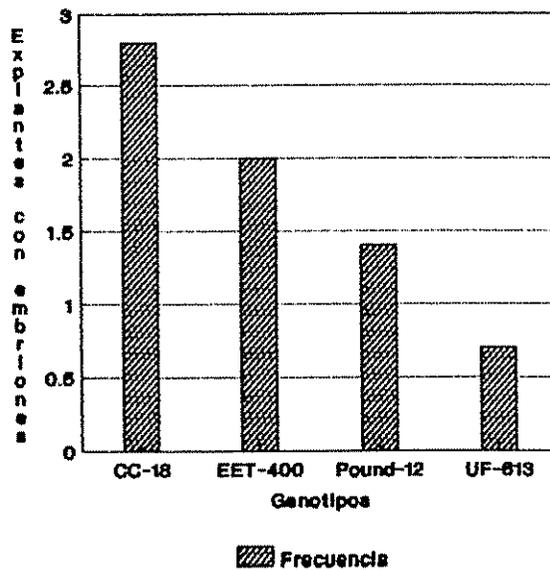


Figura 7. Sumatoria de las frecuencias embriológicas de cuatro genotipos de cacao en presencia de ABA.

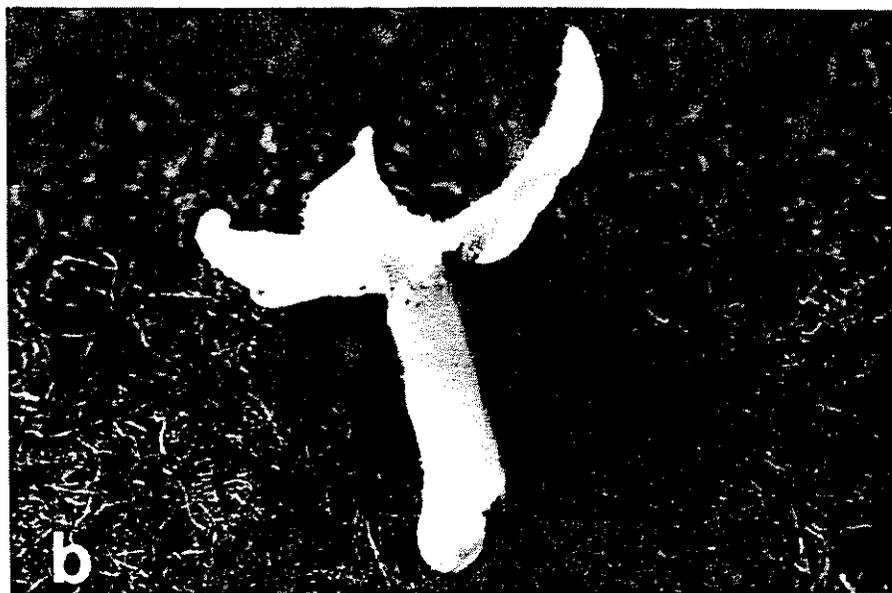
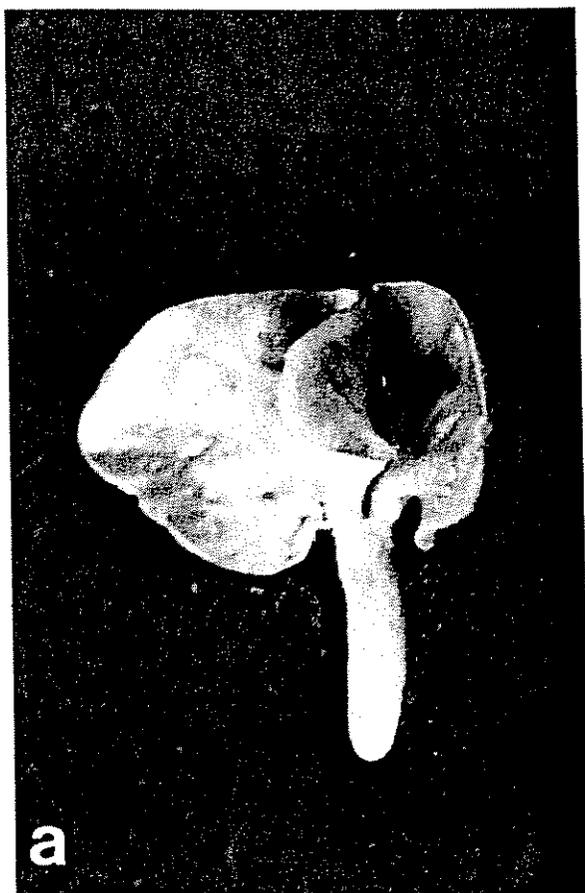


Figura 8. Morfología de los embriones somáticos según el número de cotiledones. a. Dicotiledoneos; b. Policotiledoneos.

**A****B**

Figura 9. Embriones somáticos que muestran diferentes anormalidades. a. Embriones con hipocotilos alargados y cotiledones vestigiales; b. Embriones moderadamente fasciados.

Cuadro 10. Frecuencias embriogénicas de diferentes genotipos de cacao en presencia de ABA.

ABA mg·l ⁻¹	CC-18	EET-400	POUND-12	UF-613
0,00	0,7	0,5	0,4	0,1
0,25	0,6	0,5	0,3	0,2
0,50	0,6	0,25	0,2	0,1
0,75	0,4	0,2	0,2	0,3
1,00	0,5	0,6	0,3	0,0

1 Frecuencia embriogénica

$$FE = \frac{\text{Número de cultivos embriogénicos}}{\text{Total de cultivos iniciados}}$$

Cuadro 11. Porcentajes de la formación de embriones anormales en diferentes genotipos de cacao y en presencia de ABA.

ABA mg·l ⁻¹	CC-18	EET-400	POUND-12	UF-613
0,00	60,0	76,7	50,0	54,5
0,25	73,3	50,0	46,7	100,0
0,50	86,7	100,0	56,7	50,0
0,75	80,0	71,4	58,3	90,0
1,00	73,3	83,3	76,6	0,0

Cuadro 12. Frecuencias de la formación de callo en los diferentes genotipos de cacao y en presencia de ABA.

ABA mg·l ⁻¹	CC-18	EET-400	POUND-12	UF-613
0,00	0,5	0,4	0,5	0,05
0,25	0,6	0,3	0,5	0,2
0,50	0,6	0,6	0,8	0,2
0,75	0,1	0,2	0,6	0,5
1,00	0,3	0,2	0,8	0,3
TOTALES	2,7	1,7	3,2	1,25

Cuadro 13. Frecuencias de oxidación de los explantes en cuatro genotipos de cacao y en presencia de ABA.

ABA mg·l ⁻¹	CC-18	EET-400	POUND-12	UF-613
0,0	0,2	0,3	0,05	0,05
0,25	0,3	0,3	0,05	0,0
0,50	0,1	0,1	0,0	0,0
0,75	0,2	0,2	0,0	0,0
1,00	0,2	0,2	0,0	0,0
TOTALES	1,2	1,2	0,1	0,05

3.3. Efecto de las Diferentes Concentraciones de Azúcar.

En este experimento se encontró que aunque las diferencias entre tratamientos en el desarrollo de los embriones no son muy marcadas, los genotipos no respondieron igual a las mismas concentraciones de azúcar (Cuadro 14).

En el genotipo CC-18 la mayor frecuencia embriogénica fue de 0,7 con 3% de azúcar, en el genotipo EET-400 fue de 0,6 con 5% de azúcar, en el POUND-12 fue de 0,5 en presencia de 3% y 4% de azúcar. El genotipo UF-613 fue el menos embriogénico con una frecuencia de 0,3 en 3% de azúcar. En la Fig. 10 se muestra la relación total para la frecuencia embriogénica en cada genotipo.

El desarrollo del callo en el explante no difiere mucho ni entre tratamientos, ni con respecto a los genotipos; sin embargo las frecuencias fueron ligeramente mayores para todos los genotipos en presencia de 3% de azúcar. El UF-613 presentó las frecuencias menores para todos los tratamientos (Cuadro 15).

La oxidación no parece ser un factor muy importante en la embriogénesis somática de cacao. En medios con diferentes concentraciones de azúcar, se observaron muy bajas frecuencias de explantes oxidados, donde el valor más alto fue de 0,45 en el EET-400 (Cuadro 16).

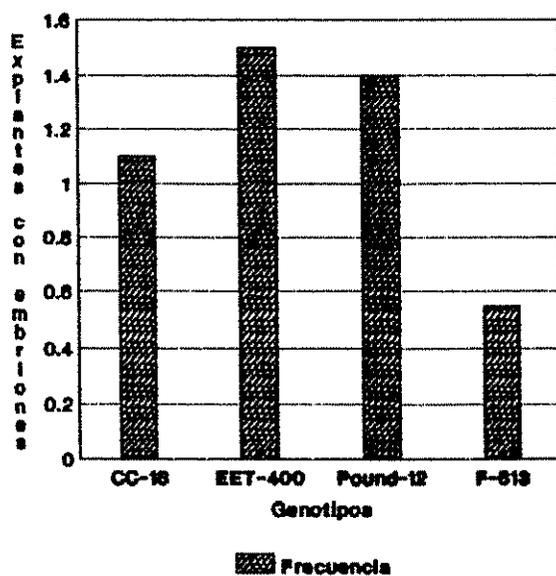


Figura 10. Sumatoria de las frecuencias embriogénicas de cuatro genotipos de cacao en varias concentraciones de azúcar.

Cuadro 14. Frecuencias embriogénicas de diferentes genotipos de cacao cultivados en diferentes concentraciones de azúcar.

AZUCAR mg·l ⁻¹	CC-18	EET-400	POUND-12	UF-613
30,0	0,7	0,4	0,5	0,3
40,0	0,2	0,5	0,5	0,2
50,0	0,2	0,6	0,4	0,05

Frecuencia embriogénica

$$FE = \frac{\text{Número de cultivos embriogénicos}}{\text{Total de cultivos iniciados}}$$

Cuadro 15. Frecuencias de la formación de callo en cuatro genotipos de cacao en diferentes concentraciones de azúcar.

AZUCAR mg·l ⁻¹	CC-18	EET-400	POUND-12	UF-613
30,0	0,9	0,9	0,9	0,9
40,0	0,7	0,8	0,9	0,6
50,0	0,8	0,8	0,8	0,6
TOTALES	2,4	2,5	2,6	2,1

Cuadro 16. Frecuencias de la oxidación de los explantes en cuatro genotipos de cacao en diferentes concentraciones de azúcar.

AZUCAR mg ⁻¹	CC-18	EET-400	POUND-12	UF-613
30,0	0,03	0,2	0,05	0,05
40,0	0,0	0,2	0,05	0,0
50,0	0,05	0,05	0,1	0,1
TOTALES	0,1	0,45	0,2	0,15

4. MICROINJERTACION.

4.1. Microinjertación Utilizando Patrones de Diferentes Edades.

El uso de portainjertos de diferentes edades permitió observar diversas respuestas en el desarrollo de los microinjertos (Cuadro 17). Plántulas de tres semanas de edad constituyeron los mejores portainjertos con un 72.2% de supervivencia. Al utilizar portainjertos de dos semanas de edad sólo el 16,7% de los microinjertos se desarrollaron en plantas con una o dos hojas (Cuadro 18). Aunque la mayoría de los microinjertos desarrollaron callo en la unión y raíces nuevas, la zona del hipocotilo donde se hizo la incisión tendió a oxidarse con el tiempo provocando la muerte del injerto. Al utilizar plántulas de tres semanas de edad, el 100% de los microinjertos formaron callo en la primera semana y el 61,1% desarrollaron desde dos hasta a seis hojas (Cuadro 18). El porcentaje en el desarrollo de los microinjertos con plántulas de cuatro semanas fue de 44,4% las cuales desarrollaron entre una y cinco hojas (Cuadro 18). En este tratamiento, la oxidación y muerte de raíces fue del 80% lo que determinó el bajo porcentaje de plantas en aclimatación (11,1%). En portainjertos de tres semanas la oxidación y muerte de raíces fue inferior (55,6%), sin embargo este fue un factor limitante que determinó que sólo un 27,8% de los

microinjertos alcanzaron la etapa de aclimatación. Ninguna de las plantas sobrevivió hasta condiciones de suelo.

Cuadro 17. Desarrollo de microinjertos de cacao utilizando patrones de diferentes edades (%).

EDAD DE PORTAINJERTOS (SEMANAS) ¹	CALLO UNION	DESARROLLO INJERTOS	FORMACION HOJAS	DESARROLLO RAICES NUEVAS	INJERTOS SIN DESARROLLO	OXIDACION DE RAICES	SUPER-VENCIA	ACLIMATACION DE LAS PLANTAS
2	88,9	16,7	16,7	88,9	0,0	100,0	16,7	0,0
3	100,0	61,1	61,1	72,2	11,1	55,6	72,2	27,8
4	94,4	44,4	44,4	33,3	5,6	80,0	50,0	11,1

1. Plántulas de dos, tres y cuatro semanas de cultivo respectivamente.

2. Se utilizaron 18 repeticiones por tratamiento.

Cuadro 18. Número de hojas en porcentaje por planta para cada tratamiento

EDAD DE PORTAINJERTOS (SEMANAS) ¹	NUMERO DE HOJAS / PLANTA (%)								
	0	1	2	3	4	5	6	7	
2	83,3	5,6	11,1	0	0	0	0	0	
3	38,9	0	16,6	16,6	22,2	0	5,6	0	
4	55,6	16,6	0	22,2	0	5,6	0	0	

1. Plántulas de dos, tres y cuatro semanas de cultivo respectivamente

4.2. Efecto de la Presencia o Ausencia de los Cotiledones del Embrión Somático en el Desarrollo del Injerto.

La primera observación realizada en los microinjertos fue la proliferación de callo en la zona de unión, durante la primera semana de cultivo. La producción de callo ocurrió tanto en el tejido del portainjerto como del injerto, éste callo fue inicialmente cristalino y escaso pero luego se tornó compacto y de coloración blanca y se observó en todos los microinjertos. En algunos casos el callo continuó creciendo hasta cubrir el embrión, impidiendo su desarrollo. En el Cuadro 19 se observa que el tratamiento T3 (embriones sin cotiledones), fue el más significativo donde el desarrollo foliar fue de 83,3% y la formación de raíces nuevas es del 67,7% lo que coincide con el porcentaje de plantas que alcanzaron la fase de aclimatación. En contraste en los tratamientos T1 (embriones con cotiledones completos) y T2 (embriones con cotiledones incompletos) los valores para estas variables fueron inferiores y el T1 no mostró desarrollo de raíces nuevas. La mayor actividad en el desarrollo de los injertos se observó durante la tercera y cuarta semana de cultivo con el inicio del desarrollo del eje del embrión, lo que significó alargamiento del eje de la planta, delimitación de nudos y entrenudos y formación de hojas verdaderas (Fig. 11).

El desarrollo de hojas por planta fue variable en todos los experimentos (Cuadro 20). En el tratamiento T3 las plantas formaron de una hasta ocho hojas, en el tratamiento T2 de una hasta cinco hojas y en la condición T1 de una hasta tres hojas. Se observó la formación de hojas irregulares en un 25% de los casos en el T3 y en un 16,7 en el tratamiento T2. La morfología de estas hojas fue diferente al tipo normal, observandose láminas asimétricas, semilobuladas o trilobuladas, coarrugadas y con áreas cloróticas; sin pecíolos o de pecíolos muy alargados. El número de nudos y entrenudos dependió del número de hojas por planta. Posteriormente nuevos microinjertos se desarrollaron; pero generalmente en éstos ocurre el mayor número de malformaciones.

Fue evidente en algunos embriones la presencia de varios meristemas apicales del vástago. También se observó aunque en forma aislada el desarrollo de varios ejes a partir de un embrión somático. Igualmente ocurrió con frecuencia el desarrollo de embriones secundarios sobre los embriones que no se desarrollaron.

En los tratamientos T1 y T2, el 25% de los injertos alcanzaron la etapa de aclimatación, pero ninguno sobrevivió. Estas plantas inicialmente sufrieron desecación de las hojas y posteriormente del eje completo, además de que tenían muy pocas raíces (Cuadro 19).

En el tratamiento T3 el 67,7% de los microinjertos alcanzaron la etapa de aclimatación (Fig. 12); luego de transferidas estas plantas al invernadero, algunas murieron y sólo el 16,7% sobrevivieron hasta condiciones de suelo. Las plantas sobrevivientes en el invernadero desarrollaron hojas nuevas y se produjo un engrosamiento en la zona de unión con el injerto (Fig. 13). En esta etapa el crecimiento del portainjerto se detiene y la longitud de la planta depende del crecimiento longitudinal del eje del injerto. Después de varios meses en invernadero estas plantas desarrollaron un buen sistema fotosintético, con hojas de morfología normal, de color verde las más viejas y color pardo las nuevas. El sistema radical se mostró en buenas condiciones, lo que permitió el desarrollo normal de las plantas al transferirse a suelo (Fig 14).

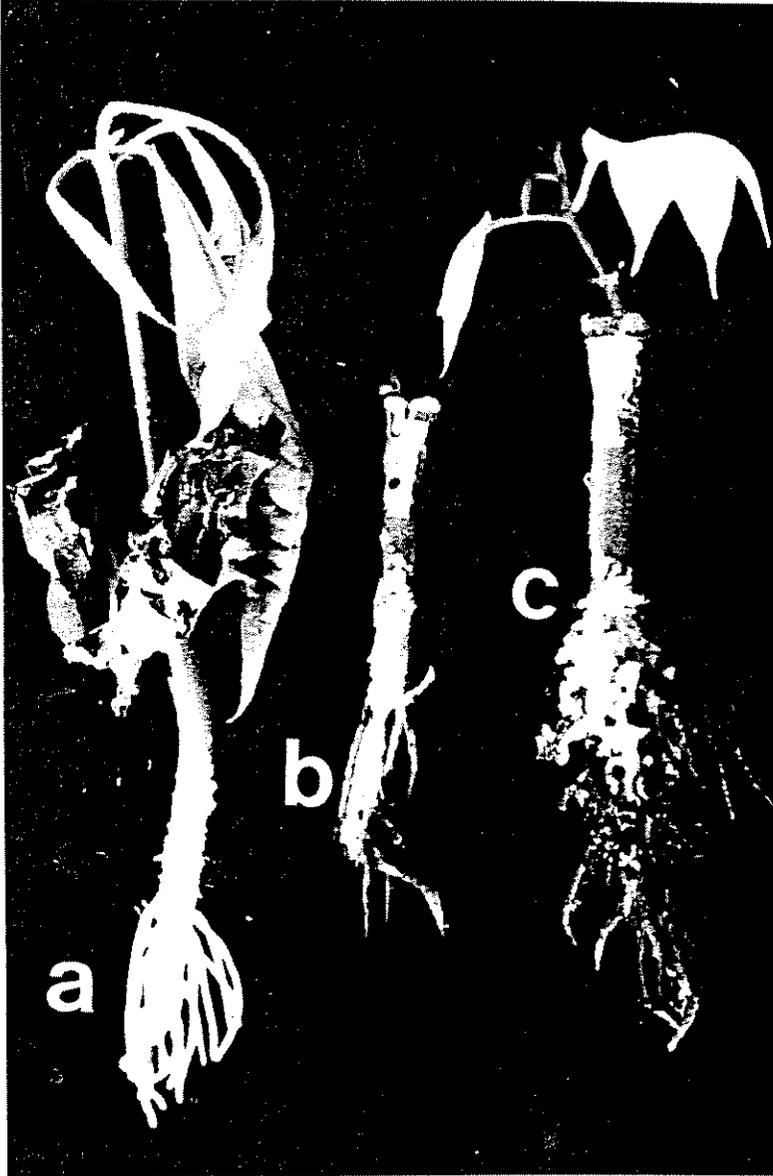


Figura 11. Microinjertos mostrando el desarrollo de hojas y raíces. a. Portainjerto; b. Microinjerto de dos semanas; c. Microinjerto después de cuatro semanas de cultivo.



Figura 12. Microinjerto en la fase de aclimatación.



Figura 13. Planta microinjertada en condiciones de invernadero mostrando la cicatriz en la zona de unión entre el patrón y el injerto.



Figura 14. Planta microinjertada en condiciones de suelo después de 10 meses desde la microinjertación.

Cuadro 19. Efecto de la presencia o ausencia de los cotiledones del embrión somático en el desarrollo del injerto (%).

TRATA- MIENTOS	DESARRO- LLO IN- JERTOS	DESARRO- LLO HO- JAS	DESARROLLO DE NUDOS Y ENTRENUDOS	HOJAS IRREGU- LARES	RAICES NUEVAS	INJERTOS SIN DE- SARROLLO	SUPERVI- VENCIA <i>in vitro</i>	ACLIMA- TACION DE LAS PLANTAS	PLANTAS SUELO
T1	41,7	41,7	16,7	0,0	0,0	50,0	97,7	25,0	0,0
T2	41,7	41,7	25,0	16,7	8,3	41,7	83,4	25,0	0,0
T3	83,3	83,3	41,7	25,0	67,7	8,3	91,6	67,7	16,7

T1 = Embriones con cotiledones completos.

T2 = Embriones con cotiledones incompletos.

T3 = Embriones sin cotiledones.

1. Se utilizaron 12 repeticiones por tratamiento.

Cuadro 20. Porcentajes del número de hojas por planta para cada tratamiento.

TRATAMIENTO	NUMERO DE HOJAS / PLANTA (%)									
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	
T1	58,3	8,3	25,0	8,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
T2	58,3	8,3	8,3	16,7	0,0	8,3	0,0	0,0	0,0	0,0
T3	33,3	16,7	16,7	8,3	16,7	0,0	0,0	0,0	0,0	8,3

T1 = Embriones con cotiledones completos.

T2 = Embriones con cotiledones incompletos.

T3 = Embriones sin cotiledones.

4.3. Efecto del AIB en el Desarrollo del Injerto.

En el presente experimento se trató de demostrar si el AIB utilizado para inducir la formación de raíces adventicias ejercía algún efecto positivo o no sobre el desarrollo del injerto. Se determinó que aunque el porcentaje de supervivencia fue de un 100% en los dos tratamientos, muy pocos injertos se desarrollaron. Sólo un 10% de los microinjertos en el tratamiento con AIB se desarrollaron desde los 22 días de cultivo, este valor se incrementó en un 30% a los 30 días, mientras que el tratamiento sin AIB sólo un 20% de los microinjertos se desarrollaron después de 30 días de cultivo (Cuadro 21). El número de hojas por planta fue muy reducido, en el primer tratamiento un 10% de los injertos desarrollaron una hoja y el mismo valor para dos hojas; cuando se utilizó el medio con AIB se incrementó el porcentaje de plantas con una hoja en un 20% y sólo un 10% formaron dos hojas (Cuadro 22).

El desarrollo de raíces fue excelente en ambos tratamientos con un 90% y 100% respectivamente desde los primeros 15 días de cultivo (Cuadro 21). Sin embargo, el número de raíces por planta fue superior en el tratamiento con AIB desde los primeros 15 días de cultivo. En este caso un 40% de las plantas presentaron de 1-5 raíces, otro 40% de 5-10 raíces y un 20% más de 10 raíces. El número de raíces por

planta se incrementó con respecto al tiempo de cultivo (Cuadro 23).

El porcentaje de oxidación considerado como el número de cultivos que tenían coloración oscura fue de un 50% en el primer tratamiento después de 30 días de cultivo y para el segundo tratamiento fue de un 10% después de 22 días de cultivo, incrementándose al 40% a los 30 días de cultivo (Cuadro 21). También se observó para ambos tratamientos que el porcentaje de formación de callo fue bastante alto desde los primeros 15 días de cultivo. Como se pudo apreciar en este experimento, el desarrollo del vástago fue bastante reducido y no se observaron variaciones morfológicas con respecto al tallo u hojas. Con frecuencia el callo producido en la zona de unión cubrió el injerto después de cuatro o cinco semanas de cultivo.

Cuadro 21. Porcentajes para el desarrollo de microinjertos de cacao en un medio MS al 50% y $1,0 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ de AIB.

TRATAMIENTO	TIEMPO (DIAS)	CALLO UNION	CALLO TALLO	DESARROLLO INJERTOS	DESARROLLO HOJAS	DESARROLLO RAICES	OXIDACION DE RAICES	INJERTOS LATENTES	SUPERVIVENCIA
SALES MS ¹ 50%	15	100	90,0	0,0	0,0	90,0	0,0	100,0	100
	22	100	90,0	0,0	0,0	90,0	0,0	100,0	100
	30	100	90,0	20,0	20,0	90,0	50,0	80,0	100
SALES MS 50% + $1,0 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ AIB	15	100	90,0	0,0	0,0	100,0	0,0	100,0	100
	22	100	100,0	10,0	10,0	100,0	10,0	90,0	100
	30	100	100,0	30,0	30,0	100,0	40,0	70,0	100

1. Sales del medio Murashige y Skoog diluidas al 50% de su concentración original.

Cuadro 22. Porcentajes del número de hojas por planta para cada tratamiento.

TRATAMIENTO	TIEMPO DIAS	NUMERO DE HOJAS / PLANTA (%)		
		0	1	2
SALES MS ⁻¹ 50%	15	100,0	0,0	0,0
	22	100,0	0,0	0,0
	30	80,0	10,0	10,0
SALES MS 50% + 1,0 mg·l ⁻¹	15	100,0	0,0	0,0
	22	90,0	10,0	0,0
	30	70,0	20,0	10,0
AIB				

1. Sales del medio Murashige y Skoog diluidas al 50% de su concentración original

Cuadro 23. Porcentajes del número de raíces por planta para cada tratamiento

TRATAMIENTO	TIEMPO (DIAS)	NUMERO DE RAICES / PLANTA (%)			
		0	1-5	5-10	+ 10
SALES MS ⁻¹ 50%	15	10,0	80,0	10,0	0,0
	22	10,0	80,0	0,0	10,0
	30	0,0	90,0	0,0	10,0
SALES MS 50% + 1,0 mg·l ⁻¹	15	0,0	40,0	40,0	20,0
	22	0,0	20,0	40,0	40,0
	30	0,0	20,0	30,0	50,0
AIB					

1. Sales del medio Murashige y Skoog diluidas al 50% de su concentración original.

5. ESTUDIO HISTOLOGICO.

La formación de callo en la zona de unión entre el patrón y el injerto se observó claramente en la primera semana de cultivo. Esto coincide con las observaciones realizadas en los cortes histológicos donde se determinó que a los cinco días de cultivo las células de la superficie interna del portainjerto sufren divisiones periclinales. A los 10 días de cultivo, se observaron numerosas divisiones periclinales y anticlinales tanto en las paredes externas como en la parte superior del portainjerto; estas divisiones originan las células de callo que inicialmente permiten la unión entre el patrón y el injerto (Fig. 15). Estas son células sin forma definida de paredes delgadas y con aparente poco contenido intracelular. En los microinjertos de 15 días de cultivo, se observó que las células de callo se formaron tanto del tejido del patrón, posiblemente parénquima medular, como de tejido del injerto (Fig. 16). Se observó incrementos en el número de células en la superficie de unión, producto de divisiones periclinales, anticlinales y también oblicuas. Aún fue evidente el tejido de cicatrización entre el patrón y el injerto; sin embargo las células formadas de novo en la parte inferior de la unión, van adquiriendo la configuración de las células vecinas del patrón y del injerto. Se inició la regeneración de tejido en la región medular del patrón donde se realizó la incisión inicial y que no fue cubierta por el injerto (Fig. 17). En esta zona las células presentaron gran contenido de sustancias fenólicas

y se observaron algunas células de xilema cercanas al punto de unión. Después de 20 días de cultivo las nuevas células adquirieron una forma más esférica y se observó mayor número de células de xilema.

Los primeros indicios de conexión vascular se hicieron evidentes en la parte inferior de la unión a los 25 días. Se observaron elementos de los vasos cortos, con engrosamientos reticulares, paredes terminales transversales, oblicuas y placas de perforación simple (Fig. 18 a y b). Después de 30 días de realizado el injerto, el tejido de cicatrización formado inicialmente entre el patrón y el injerto es menos visible. Grupos de células de xilema se formaron a partir de células de callo en diferentes puntos de la unión.

La unión total se completó hasta los 40 días después de realizado el injerto (Fig. 19). Se desarrollaron numerosas células de xilema a lo largo de toda la unión entrelazando el tejido vascular del portainjerto y el injerto hasta formar una unión vascular continua. En esta zona se observaron elementos secundarios con puntuaciones alternas y también numerosos elementos con ornamentaciones helicoidales, escalariformes y reticulares. Se observaron frecuentemente células rodeando la unión con deposición de fenoles. La línea de cicatrización desapareció por completo a los 40 días de cultivo.

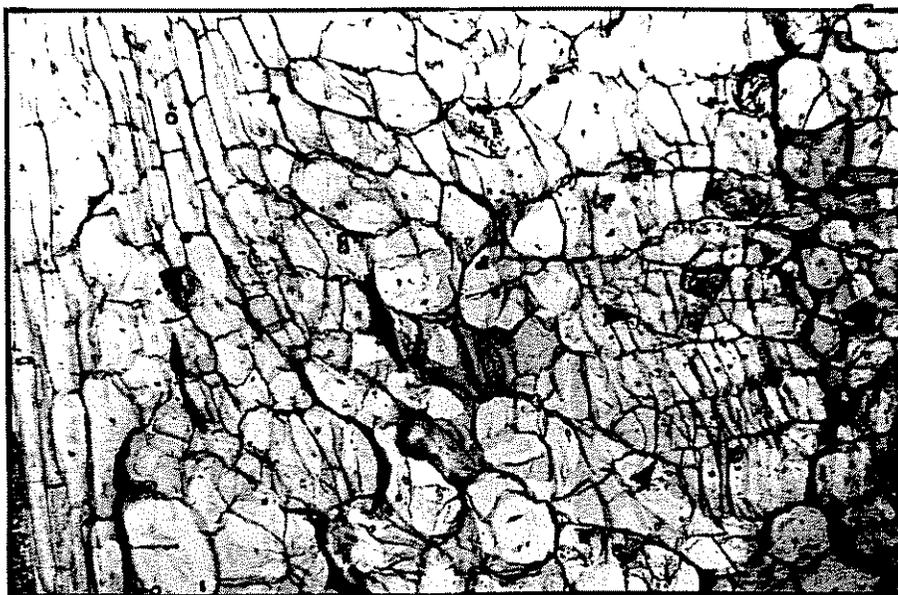


Figura 15. Zona de unión en el injerto mostrando divisiones celulares en varios sentidos (X 900).



Figura 16. Formación de callo a partir de células del injerto y del portainjerto. a. Callo; b. Injerto; c. Portainjerto; d. Sitios de contacto entre el patrón y el injerto (X 180).

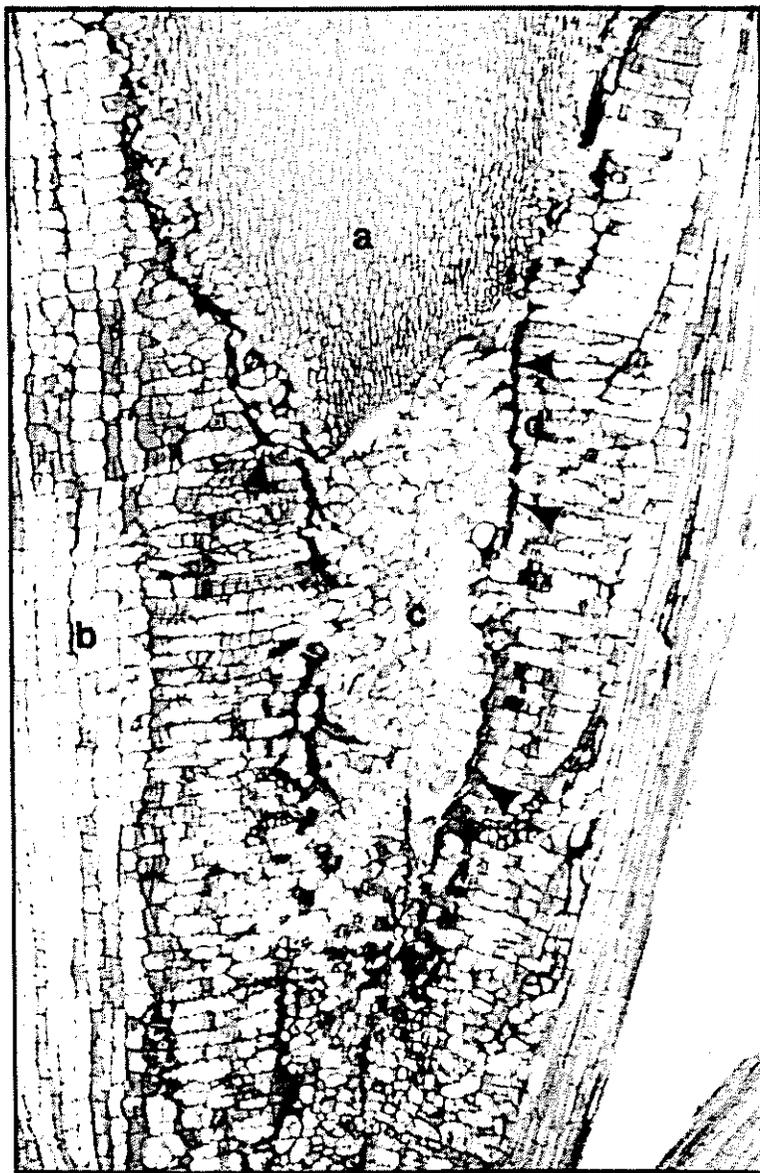


Figura 17. Regeneración de parénquima en la médula del portainjerto. a. Injerto; b. Portainjerto; c. Parénquima medular en el portainjerto; d. Línea de cicatrización a lo largo de la unión.



Figura 18. Células de xilema mostrando el inicio de diferenciación vascular en el injerto. a. Elementos de los vasos cortos con engrosamientos reticulares (X 900); b. Elementos de los vasos mostrando placas de perforación simple (X 1800).



Figura 19. Unión vascular continua entre el patrón y el injerto a los 40 días de cultivo. a. Portainjerto; b. Injerto; c. Células de xilema interconectando el portainjerto y el injerto (X 450).

V. DISCUSION

1. EVALUACION DEL CRECIMIENTO DE LOS PORTAINJERTOS DE CACAO IMC-67.

Los embriones sexuales de cacao están constituidos por un eje que corresponde al epicotilo, el cual tiene el meristemo apical del brote. El hipocotilo, comprende el eje vertical bajo los cotiledones y el sistema radical con el meristemo apical de la raíz. Entre el epicotilo y el hipocotilo se encuentran los cotiledones. Estas estructuras constituyen más del 90% del tejido del embrión, sus células tienen gran contenido de sustancias ergásticas principalmente almidón, pigmentos como las antocianinas y mucilago (Duncan y Todd, 1972).

Los embriones de cacao no mostraron ninguna diferencia a la presencia de caseína hidrolizada, analizada en la germinación y desarrollo de raíces secundarias para los diferentes tratamientos. Esta falta de respuesta se debe posiblemente a que la germinación y el desarrollo de la plántula están intrínsecamente controlados en las semillas maduras. La aparición de pelos radiculares fue evidente únicamente en aquellas raíces que se desarrollaron fuera del medio de cultivo, posiblemente donde hay más aereación. En el crecimiento de embriones de cacao para portainjertos posiblemente existe un efecto ligado entre concentraciones de caseína hidrolizada y pH, ya que en la mayoría de los casos, a

bajas concentraciones de caseína hidrolizada combinados con valores altos de pH, o la relación contraria favorecieron el desarrollo de los embriones.

La caseína hidrolizada (CH) es muy utilizada para estimular el crecimiento de embriones. Los componentes básicos de las preparaciones comerciales son aminoácidos, cloruro de sodio y fosfatos inorgánicos (Raghavan y Srivastava, 1982). La CH además de ser una fuente de nitrógeno, su función principal es mantener el equilibrio osmótico necesario para el crecimiento de las plántulas. Trabajos en gran número de especies han demostrado que la CH aumenta el equilibrio osmótico del medio de cultivo lo que impide la germinación precoz y estimula el desarrollo embriogénico (Narayanaswami y Norstog, 1964; Raghavan, 1976; Yi-Chang y Janick, 1984; Hu y Wang, 1986). Palma (1988) trabajó con semillas aplanadas de cacao para el rescate de haploides y utilizó diferentes concentraciones de caseína hidrolizada y glutamina como suplemento al medio MS. Determinó que $200 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de cada uno de estos componentes es una concentración adecuada para el rescate de embriones, los que mostraron buen desarrollo y ausencia de callos.

En el crecimiento de los embriones de cacao, el equilibrio osmótico proporcionado por la CH posiblemente es modificado de alguna forma por el pH del medio de cultivo. Pocos estudios se han realizado en relación a los valores de

pH óptimos para el crecimiento de plantas in vitro (Valverde, 1989). En la germinación de semillas de tomate se trabajó con rangos entre 4,5 y 8,5, el pH óptimo para la germinación fue de 6,5. En cebada, el crecimiento de embriones varía a diferentes valores de pH, donde el valor óptimo fue de 4,9 (Narayanaswami y Norstog, 1964; Hu y Wang, 1986). En cacao Valverde y Villalobos (Datos no publicados) determinaron un valor óptimo de pH de 6,7 para la inducción de embriones somáticos.

El desarrollo de plántulas de cacao in vivo fue favorecido por el contenido de grasas, aminoácidos y carbohidratos almacenados como sustancias de reserva en los cotiledones (Olofinboba. 1973). Sin embargo, en el cultivo in vitro, los embriones sexuales se desarrollaron mejor cuando se eliminaron parte de sus cotiledones. En embriones disectados, el desarrollo del eje del embrión, así como el crecimiento longitudinal y la formación de hojas y raíces fue superior al comparar con las plántulas que tenían los cotiledones completos.

Estudios en otras especies han demostrado que en el cultivo in vitro, los cotiledones causan un efecto inhibitorio en el desarrollo del eje del embrión (Buchheim, ét al., 1989). Es posible que en los cotiledones del cacao, los cuales almacenan gran cantidad de sustancias como azúcares, pigmentos, fenoles, etc., también se sintetizan compuestos que resulten inhibitorios para el desarrollo y que este proceso se

intensifique con las condiciones de cultivo in vitro. Sin embargo se requiere más estudios que permitan conocer el comportamiento de la embriogénesis sexual de cacao en condiciones in vitro. Estudios al respecto permitirán aclarar muchas de las interrogantes asociadas a la embriogénesis de cacao.

2. LA INDUCCION DE RAICES ADVENTICIAS EN LOS PORTAINJERTOS.

El uso de plántulas de cacao como portainjertos para la microinjertación de embriones somáticos, implicó la existencia de un buen eje vertical con un eficiente sistema radicular. Este estudio fue de gran importancia para el desarrollo de los injertos, y la formación de raíces adventicias en etapas tempranas. Hay una vasta información sobre tratamientos y sustancias utilizadas para estimular el desarrollo de las raíces adventicias; cabe destacar al uso de compuestos fenólicos, concentración de auxinas y tiempo de exposición, carbón activado, consistencia del medio de cultivo, concentraciones de sales y sacarosa, etc (Villegas, 1985). La importancia de las auxinas en la rizogénesis, ha sido bien documentada. Estudios clásicos de Skoog y Miller (1957) indican que el balance auxina-citocinina determina el tipo de extensión de la organogénesis. Sin embargo existe gran variabilidad entre taxas y entre genotipos, acerca de los niveles de reguladores requeridos para la morfogénesis (George y Sherrigton, 1984). En especies "difísiles" de enraizar, además del balance hormonal, se debe distinguir entre las

diferentes etapas de inducción, iniciación y alargamiento de las raíces (Boxus, 1987). Es de esperar que el éxito en el enraizamiento in vitro no depende únicamente de la formación de un medio adecuado, sino también del tipo de explantes y del balance hormonal endógeno de los explantes.

Se ha determinado que el desarrollo de raíces adventicias se da en dos fases, la iniciación de los meristemas radicales favorecido por altas concentraciones de auxina exógena y el crecimiento posterior que demanda una débil aportación de auxinas (Margara, 1988). En la fase inicial, el control de la actividad meristemática en el ápice de la raíz es mediada no sólo por una auxina, sino por el balance entre el número de reguladores del crecimiento y la auxina natural (Butcher y Street, 1964).

En cacao, la mayoría de los sistemas de enraizamiento in vitro se han realizado con medios de cultivo semisólidos, con concentraciones de sales minerales reducidas, más un buen complemento auxínico. Las plántulas de cacao cultivadas en el medio de Murashige y Skoog (1962), respondieron mejor al desarrollo de las raíces en concentraciones del 25 y 50% ya que formaron el mayor número desde los primeros 15 días de cultivo facilitando la absorción de nutrientes. La suplementación de los medios con AIB no aumentó la eficiencia en el desarrollo de raíces, ni en número de raíces por planta, ni tampoco en la longitud promedio de las raíces. Passey y Jones (1983) trabajando con concentraciones de $2,5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de

ANA y AIB lograron un 80% de enraizamiento de brotes de cacao. Mientras que Dufour y Dublin (1985) favorecieron el enraizamiento con soluciones diluidas de macroelementos y azúcar combinado con AIB.

Flynn, et al., (1990) utilizaron en cacao un medio compuesto de 10% de azúcar, $3,0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de AIB y $0,15 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de carbón activado, ellos obtuvieron un 90% de rizogénesis después de 12-14 días de cultivo.

3. EMBRIOGENESIS SOMÁTICA.

Los embriones somáticos de cacao obtenidos a partir de tejido cotiledonar en un medio con ANA y BA fueron el producto de un proceso embriogénico directo entendiéndose éste, como la obtención de embriones sin la fase intermedia de callos. El efecto benéfico de ciertos reguladores del crecimiento en la embriogénesis somática de cacao ya ha sido demostrado. El ANA incrementa el nivel de diferenciación de los embriones, por lo que se producen embriones más grandes con mayor probabilidad de regenerar plantas (Pence, et al., 1979; Ampomah, et al., 1987; Novak, et al., 1985; Ampomah et al., 1988). En otras especies se ha determinado que la BA estimula la formación de embriones somáticos directamente a partir de células epidérmicas del hipocotilo, (Williams y Maheswaran, 1986). El uso de BA en cacao posiblemente también estimuló la embriogénesis directa a partir de células epidérmicas del cotiledón.

Aunque la embriogénesis indirecta ha sido mencionada en cacao por muchos investigadores (Kononowicz, et al., 1984; Novak et al., 1985; Ampomah et al., 1988; Duhem, et al., 1989); en nuestro caso la formación de callo en el explante se produjo como un cambio inicial en respuesta a las condiciones de cultivo y usualmente fue independiente del desarrollo de los embriones. Los embriones se originaron directamente a partir de una célula de la epidermis del cotiledón, la cual sufre múltiples divisiones para formar la estructura globular (Aguilar, Vásquez y Villalobos, datos no publicados). Resultados similares fueron encontrados por otros investigadores (Ampomah et al., 1988), sin embargo también se menciona que los embriones somáticos se originan directamente de tricomas glandulares (Pence, et al., 1981; Rao y Lee; 1986).

Se ha sugerido que la embriogénesis directa se produce en células del explante determinadas pre-embriogénicas, las cuales en presencia de reguladores del crecimiento o condiciones favorables entran en división celular y expresan su potencial morfogénico. Este proceso puede también estar limitado por el estado de desarrollo del explante y el tipo de células (Williams y Maheswaran, 1986; Ammirato, 1989).

Aparentemente una vez iniciado el proceso embriogénico se estimula la formación constante de estructuras embriogénicas en diferentes partes del explante, lo que permite observar embriones en diferentes estados en un mismo explante.

Posiblemente la respuesta a este fenómeno está asociada con mecanismos de regulación génica existentes en las células del cotiledón. En estudios con zanahoria, se determinó que la embriogénesis es gobernada por la expresión selectiva de un grupo de genes de manera secuencial. Se aislaron ciertos genes que aunque presentes en el estado globular están asociados con la formación del estado de corazón, estos genes también se presentan en plantas derivadas de embriones somáticos cultivados in vitro (Borkird et al., 1988).

La falta de sincronía en poblaciones de embriones somáticos, se debe principalmente al desarrollo de embriones secundarios o accesorios a lo largo del eje del embrión (Ammirato, 1974; Duhem, et al., 1989). Estos se producen en ciclos secundarios de formación de embrioides a partir de células epidérmicas o por brotación multicelular de los embrioides primarios. La formación de embriones secundarios en cacao también fue observada por otros investigadores a partir de los cotiledones del embrión somático primario (Rao y Lee, 1986; Ampomah, et al., 1988; Duhem, et al., 1989). Aparentemente no existen diferencias fundamentales entre la embriogénesis directa primaria a partir de embriones cigóticos y la embriogénesis directa secundaria a partir de embriones primarios (Williams y Maheswaran, 1986). Además de la ausencia de sincronía, otro de los problemas asociados a la embriogénesis somática de cacao es el desarrollo de gran número de formas aberrantes que pueden variar desde la

formación de uno a múltiples cotiledones en un embrión, hasta la presencia de varios ejes. Estas anomalías pudieran afectar de algún modo el desarrollo posterior del embrión. Aberraciones similares ya habían sido observadas en cacao (Duhem, y col., 1989) y en gran número de especies (Ammirato, 1983; Ammirato, 1989; Buchheim, y col., 1989).

En los cotiledones de los embriones somáticos de cacao se observó una gradación de colores desde el verde hasta el púrpura. Posiblemente esto responde a un gradiente que se establece entre los componentes del medio, principalmente de azúcar. Rao y Lee (1987) trabajando con concentraciones de azúcar del 5% al 10% encontraron que los cotiledones se alargaron, engrosaron y adquirieron la coloración púrpura, semejando los cotiledones de embriones cigóticos maduros. Se ha determinado que aumentos en las concentraciones de azúcar estimulan la síntesis de antocianinas en cotiledones de embriones asexuales de forma similar que en embriones sexuales. Se sugiere que esta respuesta in vitro puede ser similar a los mecanismos de regulación de la maduración del embrión y síntesis de compuestos en los cotiledones de embriones sexuales in vivo, y es posible que estos mecanismos tengan un papel importante en la regulación del desarrollo embriogénico in vitro (Pence, col., 1981).

3.1. Efecto de la Frecuencia de Subcultivos, Acido Abscisico y Concentraciones de Azúcar en la Embriogénesis Somática de Diferentes Genotipos de Cacao.

Las diferencias observadas en cuanto a las frecuencias embriogénicas en cacao, posiblemente están más relacionadas a la alta heterogeneidad genotípica presente en el cultivo, que a los tratamientos utilizados. En los genotipos estudiados para, todos los tratamientos el genotipo EET-400 mostró tener el mayor potencial embriogénico seguido por el CC-18 y la menor frecuencia embriogénica se expresó en el genotipo UF-613. Ampomah, et al (1988) trabajando con genotipos amelonados y alto amazónicos determinaron que hay diferencias en la capacidad embriogénica de los explantes dependiendo del genotipo y del régimen de cultivo. Ellos observaron que al cultivar explantes amelonados durante nueve semanas, éstos producían más callo y menos embriones que los genotipos forasteros alto amazónicos; sin embargo, después del segundo subcultivo la respuesta se invirtió.

Según los resultados observados en los cuatro clones estudiados, la frecuencia embriogénica varía para cada genotipo con respecto a la frecuencia del subcultivo. Así el POUND-12 responde mejor en ausencia de subcultivos mientras que los otros genotipos responden bien en ausencia o a muy baja frecuencia del subcultivo.

En soya trabajando con frecuencia de subcultivos desde los 5 días, se observó que la producción de embriones fue similar en explantes subcultivados varias veces en medio fresco y en los que permanecieron por 30 días en el medio original. Por lo que se sugiere que la acumulación de compuestos deletéreos, ni es limitante, ni promueve la producción de embriones. Posiblemente los eventos que determinan el proceso, ocurren en los primeros 5 días de cultivo (Lazzeri, y col., 1987).

Es claro el efecto morfogénico del ABA para promover el desarrollo embriogénico, estimular la maduración normal y reducir la frecuencia de anomalías en el desarrollo y la germinación precoz (Ammirato, 1974). En cacao los porcentajes de formación de embriones anormales son bastante altos y el uso de ABA aparentemente no redujo la formación de embriones anormales, posiblemente las concentraciones utilizadas no fueron las adecuadas para tal fin. Sin embargo los porcentajes de formación de embriones fueron altos dependiendo del genotipo, aunque la mayoría son anormales..

Se supone que las alteraciones en la morfología de los embriones somáticos son consecuencia del uso de auxinas, citocininas y otras sustancias presentes en las soluciones de cultivo (Ammirato, 1974; Lazzeri, y col., 1987). Los diferentes tipos morfológicos han sido clasificados en nueve categorías dependiendo del número y grado de fusión de los cotiledones y de los ejes. Los embriones pueden ser mono,

dico o policotiledones, estar totalmente fusionados o ser vestigiales con hipocotilos alargados. Varios embriones pueden estar fusionados en diferente grado, por lo que reciben el nombre de fusión diaxial; moderadamente fasciados o completamente fasciados (Buchheim, y col., 1989). En cacao la mayor frecuencia de anomalías fue asociada al número de cotiledones, alargamiento de hipocotilos, asociado a cotiledones vestigiales y embriones moderadamente fasciados. Ha sido de gran interés determinar si la frecuencia de estas anomalías está relacionada al uso de determinados reguladores del crecimiento como es el caso de BA y ANA.

En estudios con soya, se observó que ciertas aberraciones como la pérdida de uno o más cotiledones estaba asociado al uso de ANA en el medio de inducción. Mientras que embriones inducidos con 2,4-D generalmente tienen forma de trompeta y cotiledones fusionados (Lazzeri, et al., 1987). Los medios con auxinas también promueven el desarrollo de embriones accesorios. En zanahoria se observó que los proembriones en presencia de auxinas no crecen, ni maduran y las células conservan su competencia embriogénica por lo que se convierten en centros de crecimiento embriogénico (Ammirato, 1987).

En la embriogénesis de cacao se ha observado que la mayor frecuencia de anomalías coincide con el desarrollo de embriones accesorios que se producen cuando los cultivos son transferidos a condiciones de luz. La proliferación de embriones secundarios ocurre principalmente en los cotiledones

o en el meristemo apical del vástago o de la raíz lo que evidentemente impide el desarrollo del embrión primario.

En trabajos con papaya, pepino y girasol se determinó que altas concentraciones de azúcar incrementaron la producción de embriones y favorecieron la maduración de los mismos (Ammirato, 1989). En zanahoria el potencial embriogénico de las células de callo aumentó cuando éstas se cultivaron en medios con concentraciones de azúcar de hasta el 12% (Wetherell, 1984). Se menciona que altas concentraciones de azúcar producen un efecto similar al ocasionado por el ABA en la regulación del proceso embriogénico; estimulan la formación de callos embriogénicos y reducen la frecuencia de anomalías en el desarrollo (Ammirato y Steward, 1971; Lu, Vasil y Ozias, 1982).

En cacao la frecuencia embriogénica varió en determinadas concentraciones de azúcar pero dependiendo del genotipo. Resultados similares fueron observados por Valverde y Villalobos (Datos no publicados) quienes utilizaron los genotipos UF-613 y CATIE-1000 y concentraciones de azúcar del 2% al 10%. La formación de callo en la mayoría de los casos tendió a incrementarse cuando se realizaron subcultivos con frecuencias de 10 a 15 días. Es posible que estos fueran inferidos por el material genético en estudio; así, se observó el POUND-12 como el más callogénico en todos los experimentos, seguido por el EET-400, siendo el UF-613 el menos callogénico. Hall y Collin (1975) determinaron en cacao que la formación de

callo en cacao varía entre clones y entre tipos de explantes, los órganos de menor desarrollo de callo son los cotiledones y las raíces.

En soya la BA estimuló la formación de callo friable principalmente en sitios de daño mecánico y este callo nunca produjo embriones (Lazzeri, et al., 1987). En cacao la relación fue similar, en los explantes cultivados en presencia de BA; la primer respuesta fue la formación de callo en los bordes del explante que se cortaron con el bisturí y el desarrollo de embriones fue independiente del callo. Aparentemente no hay un efecto directo entre la formación de callo y las diferentes concentraciones de ABA utilizadas así como con respecto a las concentraciones de azúcar en el medio. Aunque el ABA ha sido utilizado en algunas especies tales como rosa y tabaco para inhibir la formación de callo, en otras como cítricos y soya ha mostrado el efecto contrario (Ammirato, 1974).

El presente estudio permite deducir que la oxidación de los explantes no constituye un factor limitante en la embriogénesis somática de cacao. El genotipo EET-400 fue el que presentó el valor más alto de oxidación, sin embargo, eso no afectó su potencial embriogénico, el cual también fue mayor en la mayoría de los experimentos. Jalal y Collin (1977) determinaron que en los cotiledones de cacao se localizan altas concentraciones de fenoles, cantidades intermedias se producen en las hojas y menores en el tallo. En los callos

producto de cultivo de tejidos, se sintetizan otro tipo de fenoles que no se producen en otras partes de la planta.

4. MICROINJERTACION.

El microinjerto de embriones somáticos de cacao sobre plántulas germinadas in vitro constituye una de las pocas vías de regeneración de plantas de cacao a partir de cultivo de tejidos. Esta metodología fue aplicada inicialmente en cítricos (Murashige, et al., 1972; Navarro, et al., 1975) y posteriormente en rosáceas (Jonard, et al., 1983; Mosella y Ascui, 1984) para la obtención de plantas libres de virus.

Los pocos resultados de la aplicación de técnicas de micropropagación en plantas con poca capacidad morfogénica han obligado a la búsqueda de diferentes alternativas. En relación a esto Fritz (1987) sugiere que en cacao posiblemente existen algunos factores genéticos y ciertos genes dominantes que controlan la respuesta morfogénica de los explantes, reprimiendo su expresión.

El microinjerto en cacao como una técnica propuesta por vez primera por este estudio involucra tres sistemas fisiológicos diferentes que merecen atención; el cultivo de portainjertos, la embriogénesis somática y el conjunto patrón-injerto.

Lo más relevante para el desarrollo del injerto es el establecimiento de una unión compatible entre el patrón y el

injerto. Varios factores están involucrados para lograr este objetivo. Como se ha mencionado en cítricos (Murashige, et al., 1972; Navarro et al., 1975) y en rosáceas (Jornard, et al., 1983; Mosella y Ascuí, 1984) la posición que ocupa el injerto entre el tejido del patrón, ya sea en contacto con la corteza o el tejido vascular es vital para que se establezca la unión. En cacao, el mejor sistema de acoplamiento entre el patrón y el injerto consistió en la incisión tipo hendidura en el portainjerto lo que permitió introducir el embrión somático en forma de púa terminal. Este sistema, más las cintas de papel aluminio utilizadas como soporte, favorecieron el proceso de unión. De gran importancia fue la constitución del portainjerto, este debe presentar un eje erecto y una buena relación hipocotilo-radicular, donde el grosor del patrón en la zona de unión debe ser proporcional al grosor del injerto.

La mejor respuesta para el desarrollo de los injertos de cacao se logró utilizando portainjertos de tres y cuatro semanas de edad con un buen eje vertical y un sistema de raíces secundarias en crecimiento activo. Las plántulas de dos semanas de edad, tienen tejidos muy jóvenes con el eje hipocotilo-radicular como una sola estructura aún sin definirse. Además, poseen un alto contenido de sustancias fenólicas lo cual aparentemente perjudica la cicatrización, por lo que el tejido en la zona de unión tiende a necrozarse causando la muerte del injerto. Resultados similares se observaron en microinjertos de cítricos, donde la edad óptima

de los portainjertos fue de dos semanas. Al utilizar plántulas más jóvenes o más viejas, los resultados fueron oxidación y muerte de los ápices, lo cual se debió posiblemente a la formación precoz de callo en las plántulas más jóvenes ó a una humedad inadecuada en las plántulas más viejas (Navarro, et al., 1975).

La eliminación de los cotiledones del embrión somático fue de gran importancia para el desarrollo de los injertos de cacao. Permitió el mayor número de injertos con formación de hojas verdaderas.

Los pocos resultados obtenidos en la regeneración de plantas de cacao se han logrado eliminando los cotiledones del embrión somático (Ampomah, et al., 1988; Duhem, et al., 1989). En los embriones somáticos se cree que los cotiledones bloquean el desarrollo del ápice, ya sea por la presencia de inhibidores o por competencia nutricional. Sin embargo, al cultivar embriones somáticos de cacao con cotiledones en un medio con carbón activado, éstos se desarrollaron. El efecto de esta sustancia sugiere la presencia de inhibidores en los cotiledones (Duhem, y col., 1989). En soya, se determinó una estrecha relación entre la cantidad de tejido cotiledonar y la conversión de embriones somáticos a plantas. Se supone que los cotiledones tienen influencia en el control de la latencia de los embriones somáticos, lo que se debe posiblemente al contenido de ABA, el cual algunas veces es mayor en los

cotiledones impidiendo el desarrollo del eje (Buchhein, et al., 1989).

El desarrollo de embriones secundarios sobre restos de cotiledón del embrión somático o emergiendo del meristemo apical del vástago fue muy frecuente, esto se debe posiblemente a la presencia de células pre-determinadas embriogénicas en esos tejidos y a la fuente natural de auxinas presente.

La alta frecuencia de injertos que no se desarrollaron y la presencia de hojas con malformaciones y coloración variable, posiblemente está relacionado con anomalías en el desarrollo de los embriones somáticos. El reconocimiento y selección de embriones normales puede ser un factor determinante del éxito de la microinjertación. En soya se observó que la eficiencia de la conversión de embriones somáticos a plantas varía considerablemente dependiendo de la normalidad de los embriones (Lazzeri, y col., 1987).

El uso de medios enriquecidos con AIB y otros reguladores no favorecieron el desarrollo de los injertos de cacao, lo que también se menciona para otras especies (Navarro, y col., 1975). Se observó que el desarrollo de raíces nuevas es muy importante para el injerto porque usualmente algunas de las raíces del portainjerto se oxidan y mueren después de la injertación. Esto es muy frecuente en medios de cultivo líquidos lo que se debe posiblemente a las condiciones de

anoxia muy corrientes en esos medios. Resultados similares se observan en microinjertos de diferentes cultivares de Prunus (Jonard, et al., 1983). Los microinjertos constituidos por varias raíces y un par de hojas bien desarrolladas pueden aclimatarse fácilmente.

Es recomendable la inducción de nuevas raíces en el injerto en medios con auxinas u otros componentes particularmente después del desarrollo de las primeras hojas verdaderas, de lo contrario el efecto de estas sustancias sobre el embrión puede ser negativo, impidiendo su desarrollo. Usualmente se produce callo en forma excesiva en la zona de unión, evitando que el eje se desarrolle.

Los resultados obtenidos en el presente estudio son de gran relevancia para el futuro de las investigaciones en cultivo de tejidos en cacao. Esta técnica puede contribuir a futuros estudio de mejoramiento genético, donde la embriogénesis somática sea la principal fuente de germoplasma para la selección de variantes somaclonales de interés y la vía de regeneración más importante en estudios de ingeniería genética.

5. ESTUDIO HISTOLOGICO.

La secuencia de eventos anatómicos en el desarrollo de los microinjertos de cacao ocurre en poco tiempo. En los primeros 5 días de cultivo, los centros meristemáticos se activan en la zona de unión para dar origen a la proliferación de células de callo. Estas células se depositan a lo largo de toda la superficie de contacto entre el patrón y el injerto. Estas observaciones coinciden con los resultados publicados para otras especie como Citrus (Navarro, et al., 1975) Malus (Huang y Millikan, 1980) Lycopersicum - Capsicum (Deloire y Hébant, 1982) Sedun telephoides (Moore, 1984) y Prunus (Gebhardt y Goldbach, 1988). En injertos de cacao de 10 días, las células de callo se originaron del tejido del patrón; sin embargo, a los 15 días éstas células proliferaron tanto del patrón como del injerto, esto evidencia la actividad generada cuando los tejidos entran en contacto. En otras especies se realizaron observaciones similares; en injertos de Sedum telephoides la proliferación de callo en el patrón y el injerto se observó a los tres días de realizado el injerto (Moore y Walker, 1981) como resultado de divisiones celulares periclinales (Moore, 1984). En Prunus el callo se formó siete días después a partir del parénquima medular del patrón y del injerto (Gebhardt y Golbach, 1988). Esta proliferación celular se produce en respuesta a la necesidad de establecer una unión continua entre el patrón y el injerto (Yeoman y Brown, 1976). Se sugiere que es una respuesta mediada por

interacciones extracelulares (Jeffree y Yeoman, 1983; Moore, 1984), como la acumulación de dictiosomas y vesículas asociadas en las paredes celulares adyacentes a la zona cortada (Moore y Walker, 1981) y la consecuente deposición de materiales de la pared celular (Moore, 1982; Moore, 1984). Aparentemente la deposición de polisacáridos y otras macromoléculas en la zona de unión es mediada por agentes catalíticos (Yeoman y Brown, 1976). Parece que la fosfatasa ácida tiene un papel relevante en el transporte celular y la deposición de materiales en la pared en estados tempranos de la injertación, además de que actúa en la reabsorción de células colapsadas en la zona de cicatrización (Moore y Walker, 1981). Fue evidente que la formación de callo es de gran importancia en el injerto porque contribuye a aumentar la fuerza de tensión en la unión, elimina el tejido de cicatrización y provee las células que eventualmente se diferenciarán en tejido vascular (Moore y Walker, 1981; Moore, 1982).

La regeneración del parénquima medular del patrón es rápida y es posible que su duración está relacionada con el tamaño de la herida y la concordancia entre las dos superficies en el momento de la injertación. En microinjertos de cacao al igual que en otras especies la diferenciación de células de xilema se inició muy temprano desde los 20 días de cultivo, en áreas localizadas alrededor de los haces vasculares del patrón. Sin embargo, el establecimiento de una

continuidad vascular en el injerto fue evidente hasta los 40 días de cultivo. Coincidiendo con estos resultados, se ha encontrado que en injertos de Sedum telephoides la actividad vascular se inició desde los 12 días de cultivo a partir de las células de callo del injerto pero fue completado hasta los 21 días (Moore, 1984): En Kalanchoe aunque la rediferenciación vascular se inició a los ocho días de cultivo tanto en las células de callo del patrón como del injerto, la conexión total se realizó hasta los 18 días (Moore, 1982). Independientemente del origen de las células de callo, los nuevos elementos de xilema y floema se producen gradualmente por activación del cambium vascular y rediferenciación de células de callo. Estos elementos se fusionan en la interfase patrón-injerto por disolución de las paredes celulares (Deloire y Hébant, 1982; Monzer y Kollmann, 1986). La estructura anatómica de las nuevas células de xilema formadas en el injerto de cacao fue muy similar a la correspondiente en células del patrón. Estos resultados permiten afirmar que los nuevos elementos de xilema en el injerto derivan de células de callo formadas a partir de células de parénquima del patrón. Monzer y Kollmann (1986) trabajando con heteroinjertos, determinaron que existe alta especificidad en la formación de los nuevos elementos vasculares y que se puede distinguir claramente si estos elementos se originaron a partir de células del patrón o del injerto. Cuando se realiza un injerto el transporte polar de auxinas es bloqueado y los haces vasculares se convierten en sumideros. La formación de

nuevos elementos vasculares es imprescindible porque constituyen la primera señal de compatibilidad entre las partes involucradas y permiten el establecimiento de un puente de comunicación para el transporte de agua y nutrimentos entre el patrón y el injerto; además de que conforman la fuerza mecánica necesaria para sostén (Parkison, et al., 1987; Gebhard y Goldbach, 1988). Se cree que la orientación espacial coordinada de estas células al igual que los sitios de contacto entre células adyacentes debe estar controlado por algún mecanismo de reconocimiento entre las células (Moore y Walker, 1981). La mayoría de los investigadores coinciden en que este mecanismo lo constituyen las auxinas producidas en el ápice del injerto y que viajan en forma basípeta hasta el patrón (Yeoman y Brown, 1976; Moore, 1984; Kollmann, et al., 1985).

En cacao es necesario realizar diferentes investigaciones con el propósito de dilucidar que sustancias son transportadas a través del patrón y el injerto. Esto permitirá aclarar muchas de las interrogantes relacionadas con la conversión de embriones somáticos a plantas.

VI. CONCLUSIONES

Con base en los resultados obtenidos en los diferentes experimentos realizados se plantean las siguientes conclusiones:

1. La técnica del microinjerto en cacao es una alternativa real para el desarrollo de embriones somáticos y la obtención de plantas completas in vitro.
2. El proceso completo desde la regeneración de embriones somáticos hasta la obtención de plantas en condiciones de ser transferidas a suelo tarda aproximadamente 10 meses.
3. La mejor respuesta en el desarrollo de los microinjertos se logró con portainjertos de tres semanas de edad, embriones somáticos sin cotiledones y sin reguladores del crecimiento.
4. El desarrollo de un buen sistema radical en el injerto es determinante para el éxito en la etapa de aclimatación.
5. La actividad meristemática en la zona de unión se inició con la formación de callo en la primera semana de cultivo y la continuidad vascular entre el patrón y el injerto se completó hasta los 40 días.

6. El potencial embriogénico de explantes cotiledonares de cacao es dependiente del genotipo. El EET-400 fue el más embriogénico, seguido por el POUND-12 y CC-18, siendo el UF-613 el menos embriogénico
7. Los cambios a medio de cultivo fresco, las concentraciones de ABA y azúcar utilizadas no aumentaron el potencial embriogénico de los genotipos estudiados.
8. El porcentaje de embriones anormales fue alto en todos los genotipos, y el uso de ABA no redujo la frecuencia de anormalidades.
9. El desarrollo y crecimiento de portainjertos fue favorecido por la reducción del área cotiledonar de los embriones sexuales, mientras que no hubo diferencias entre los tratamientos con caseína hidrolizada y cambios en el pH.

VII. RECOMENDACIONES

Según las respuestas observadas en el comportamiento del cacao al cultivo in vitro se hacen las siguientes recomendaciones:

1. Utilizar otros genotipos como portainjertos para determinar si hay una respuesta genotípica que favorezca la interacción patrón-injerto.
2. Aumentar las concentraciones de ABA en la embriogénesis somática para seleccionar la concentración óptima que permita reducir la frecuencia de embriones anormales.
3. Trabajar con altas concentraciones de azúcar y otros osmorreguladores para observar su efecto en el potencial embriogénico de diferentes genotipos de cacao.
4. Iniciar estudios de embriogénesis somática utilizando otras fuentes de explantes como hojas flores, etc. de plantas clonales donde se pueda conocer la herencia de las plantas regeneradas.
5. Realizar ensayos con embriones somáticos utilizando diferentes condiciones de cultivo con variables químicas y físicas para inducir la germinación y crecimiento de los embriones.

6. Iniciar el desarrollo de raíces adventicias en el injerto después de la formación de las primeras hojas verdaderas. Esto con el fin de evitar la formación excesiva de callo en la unión y la competencia entre el eje del embrión y las nuevas raíces por factores del crecimiento presentes en el medio de cultivo.
7. Realizar estudios bioquímicos para determinar la naturaleza de las sustancias involucradas en el proceso de regeneración de tejidos en la unión injerto-portainjerto.
8. Estudiar con microscopía de transmisión la secuencia de eventos morfogénéticos del injerto y conocer el origen de las interacciones celulares de la interfase patrón-injerto.

VIII. LITERATURA CITADA

- ALVIN, R.; ALVIM, P.; LORENZINI, R.; SAUNDERS, P.F. 1984. The possible role of abscisic acid and cytokinins in growth rhythms of Theobroma cacao L. *Revista Theobroma (Bra.)* 4(3): 3 - 12.
- AMMIRATO, P.V.; STEWARD, F.C. 1971. Some effects of environment on the development of embryos from culture free cells. *Botanical Gazette (EE.UU.)* 132(2): 149 - 158.
- _____. 1974. The effects of abscisic acid on the development of somatic embryos from cells of caraway (Carum carvi L). *Botanical Gazette (EE.UU.)* 135(4): 328 - 337.
- _____. 1983. Embryogenesis. In *Handbook of plant cell culture. Techniques for propagation and breeding*. Ed. by D.A. Evans; W.R. Sharp; P.V. Ammirato; Yamada. New York, Macmillan. p. 82 - 123.
- _____. 1987. Organizational events during somatic embryogenesis. In *International Congress on Plant Tissue and Cell Culture (6, 1986, Minnesota)*. Proceedings. Eds. C:E: Green; D.A. Somers; W.P. Hackett, D.D. Biesboer. New York, Alan R. Liss, INC. p. 57 - 82.
- _____. 1989. Recent progress in somatic embryogenesis. *Newsletter, International Association for Plant Tissue Culture* 57: 1 - 27.
- AMPOMAH, Y; NOVAK, F.J.; AFZA, R.; VAN DUREN, M. 1987. Embrioid and plant production from cultured cocoa explants. In *International Cocoa Research Conference (10, 1987, Santo Domingo, R.D.)* Proceedings Santo Domingo, Republica Dominicana. p. 129 - 142.
- _____; NOVAK, F.J.; AFZA, R.; VAN DUREN, M.; PEREA-DALLOS, M. 1988. Initiation; growth of somatic embryos of cacao (Theobroma cacao L.). *Café Cacao Thé (Francia)* 32(3): 187 - 197.
- ARCHIBALD, J.F. 1954. Culture in vitro of cambial tissue of cocoa. *Nature (G.B.)* 173: 351 - 352.

- BERTRAND, B. 1987. Quelques aspects du microbouturage du cacaoyer (Theobroma cacao L.). Café Cacao Thé (Francia). 31(3): 175 - 182.
- BIONDI, S.; TREVOR, A.T. 1981. Clonal propagation of forest tree species. In Costed Symposium on Tissue Culture of Economically Important Plants proceedings. Ed. A.N. Rao. Singapore. p. 197 - 204.
- BONGA, J.M. 1982. Tissue culture in forestry. In Vegetative propagation in relation to juvenility, maturity ; rejuvenation. Ed. by J.M. Bonga and D.J. Durzan. The Hague, Netherlands, Martinus Nijhoff/Dr. W. Junk Publishers. p. 387 - 412.
- BORKIRD, CH; CHOI, J.; ZHENG, H.J.; FRANZ, G.; HATZOPOULOS, P.; CHORNEAU, R.; BONAS, V.; PELEGRI, F.; SUNG, R. 1988. Developmental regulation of embryonic genes in plants. Proceeding National Academy of Sciences (EE.UU.) 85: 6399 - 6403.
- BOXUS, P.H. 1987. In vitro vegetative propagation of plants. Néstle research news: 1986/1987. Verrey, Suiza, Néstle. p. 73 - 79.
- BUCHHEIM, J.A.; COLBURN, S.M.; RANCHO, J.P. 1989. Maturation of soybean somatic embryos and the transition to plantlet growth. Plant Physiology (EE.UU.). 89: 768-775.
- BUTCHER, D.N.; STREET, H.E. 1964. Excised root culture. Botanical Review (EE.UU.). 30(4): 513 - 574.
- CIRAD. LABORATOIRE DE CYTOGENETIQUE ET D'HISTOLOGIE VEGETALE (FRANCIA). 1989. Manuel pratique d'histologie végétale. Montpellier. 61 p.
- DELOIRE, A.; HEBANT, C. 1982. Peroxidase activity and lignification at the interface between stock and scion of compatible and incompatible grafts of Capsicum on Lycopersicum. Annals of Botany (G.B.) 49: 887 - 891.
- DUFOUR, M.; DUBLIN, P. 1985. Quelques données sur la multiplication végétative in vitro des cacaoyer cultivés (Theobroma cacao). Café Cacao Thé (Francia) 29(4): 235 - 243.

- DUHEM, K.; LE MERCIER, N.; BOXUS, PH. 1989. Données nouvelles sur l'induction et le développement d'embryons somatique chez Theobroma cacao L. *Café, Cacao, Thé (Francia)* 33(1): 9 - 14.
- DUNCAN, E.J.; TODD, A.W. 1972. Structure of the nature embryo of Theobroma cacao L. *Annals of Botany (G.B.)* 36: 939 - 945.
- ENRIQUEZ, G. 1985. Curso sobre el cultivo del cacao. Turrialba, Costa Rica, CATIE. 240 p.
- ESAN, E.B. 1975. Tissue culture studies on cacao (Theobroma cacao L.). A supplementation of current research. Ibadan, Nigeria. 9 p. (Mimeographed).
- FLYNN, W.P.; GLICENSTEIN, L.J.; FRITZ, P.J. 1990. Theobroma cacao L. An axillary bud *in vitro* propagation procedure. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (Holanda)* 20: 11 -17.
- FRITZ, P.J. 1987. Cacao Biotechnology. An Introduction. In P.M.C.A. Production Conference (41, 1987 Penn.). Proceedings. Penn., Pennsylvania State University. p 49 - 54.
- GEBHARDT, K.; GOLDBACH, H. 1988. Establishment, graft union characteristics; growth of Prunus micrografts. *Physiologia Plantarum (Dinamarca)* 72: 153 - 159.
- GEORGE, F.G.; SHERRINGTON, D.P. 1984. Plant propagation by tissue culture: Handbook and directory of commercial laboratories. Inglaterra, Exegetics. 177 p.
- HALL, T.R.H.; COLLIN, H.A. 1975. Initiation and growth of tissue culture of Theobroma cacao L. *Annals of Botany (G.B.)* 39(161): 555 - 570.
- HU, C.; WANG, P. 1986. Embryo culture: technique and applications. In Handbook of plant cell culture. Eds. D.A. Evans; W.R. Sharp; P.V. Ammirato. New York, Macmillan Publishing Company. Vol.4. p. 43 - 95.
- HUANG, S.C.; MILLIKAN, D.F. 1980. *In vitro* micrografting of apple shoot tips. *HortScience (EE.UU.)* 15(6): 741-743.
- IBAÑEZ, M.L. 1964. The cultivation of cacao embryos in sterile culture. *Tropical Agriculture (Trin.)* 41(4): 325 - 328.

- JALAL, M.A.; COLLIN, H.A. 1977. Polyphenols of mature plant seedling and tissue cultures of Theobroma cacao. *Phytochemistry* (G.B.) 16: 1377 - 1380.
- JEFFREE, C.E.; YEOMAN, M. 1983. Development of intercellular connections between opposing cells in a graft union. *New Phytologist.*, (G.B.) 93: 491 - 509.
- JONARD, R.; HUGARD, J.; MACHEIX, J.J.; MARTINEZ, J.; MOSELLA, L.; POESSEL, J.; VILLEMUR, P. 1983. In vitro micrografting and its applications to fruit science. *Scientia Horticulturae* (Holanda) 20: 147 - 159.
- KOLLMANN, R.; GLOCKMANN, CH. 1985. Studies on graft unions. 1. Plasmodesmata between cells of plant belonging to different unrelated taxa. *Protoplasma* (Austria) 124: 224 - 235.
- _____; YANG, S.; GLOCKMANN, CH. 1985. Studies on graft unions 2. Continuous and half plasmodesmata in different regions of the graft interface. *Protoplasma* (Austria). 126: 19 - 29.
- KONONOWICZ, H.; KONONOWICZ, A.K.; JANICK, J. 1984. Sexual embryogenesis via callus of Theobroma cacao L. *Zeitschrift fuer Pflanzenphysiologie* (Alemania) 113: 347 - 358.
- LANAUD, C.L. 1987. Origine génétique des plantes a phenotype maternal issues de croisement intra ou interspecificques des fèves plates ou de graines polyembryonnées chez Theobroma cacao L. *Café, Cacao, Thé* (Francia) 31(1): 3 - 14.
- LAZZERI, P.; HILDEBRAND, D.F.; COLLINS, G. 1987. Soybean somatic embryogenesis: Effects of nutritional, physical and chemical factors. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* (Holanda) 10: 209 - 220.
- LLOYD, G.; McCOWN, B. 1980. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, Kalmia latifolia, by use of shoot-tip culture. *Proceedings-International Plant Propagator Society* 30: 421 - 427.
- LU, C.; VASIL, I.K.; OZIAS, P. 1982. Somatic embryogenesis in Zea mays L. *Theoretical and Applied Genetics* (EE.UU.) 62: 109 - 112.

- MARGARA, J. 1988. Multiplicación vegetativa y cultivo in vitro. Los meristemas y la organogénesis. Trad. al español por J.M. Mateo, y V. Terron, Madrid, Ediciones Mundo-Prensa. 228 p.
- MONTEUUIS, O. 1986. Microgreffage de points végétatifs de Sequoidendron giganteum seculaires sur de jeunes semis cultivés in vitro. Comptes Rendus de l'Academic des Sciences (Serie 3) (Francia) 302 (no 6): 223 - 225.
- MONZER, J. ; KOLLMANN, R. 1986. Vascular connections in the heterograft Lophophora williamsii Coult. on Trichocereus spachianus Ricc. Journal of Plant Physiology (EE.UU.) 123: 359 - 372.
- MOORE, R.; WALKER, D.B. 1981. Studies of vegetative compatibility-incompatibility in higher plants. 1. A structural study of a compatible autograft in Sedum telephoides (Crassulaceae). American Journal of Botany (EE.UU.) 68(6): 820 - 830.
- _____. 1982. Graft formation in Kalanchoe blossfeldiana Journal of Experimental Botany (G.B.) 33(134): 533 - 540.
- _____. 1984. A model for graft compatibility-incompatibility in higher plants. American Journal of Botany (EE.UU.) 71(5): 752 - 758.
- MOSELLA, C.L.; ASCUI, L. 1984. Obtención de plantas frutales libres de virus a partir de ápices meristemáticos cultivados in vitro. Chile, Universidad Católica de Valparaíso. 22 p.
- _____; SIGRORET, P.A., JORNARD, R. 1980. Sur la mise au point de techniques de microgreffage d apex en vue de l'élimination de deux types de particules virales chez le Pêcher (Prunus persica Batsch). Comptes Rendus de l'Academic des Sciences (SerieD) (Francia) 290: 287 -290.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia. Plantarum, (Dinamarca) 15: 473 - 479.
- _____; BITTERS, W.P.; RANGAN, T.S.; NAUER, E.M.; ROISTACHER, C.N.; HOLLIDAY, P.B. 1972. A technique of shoot apex grafting and its utilization towards recovering virus-free Citrus clones. HortScience (EE.UU.) 7(2): 118 - 119.

- NARAYANASWAMI, S.; NORSTOG, K. 1964. Plant embryo culture. Botanical Review (EE.UU.) 30(4): 587 - 628.
- NAVARRO, L.; ROISTACHER, C.N.; MURASHIGE, T. 1975. Improvement of shoot-tip grafting in vitro for virus-free Citrus. Journal of the American Society for Horticultural Science (EE.UU.) 100(5): 471 - 479.
- NOVAK, F.J.; DONINI, B.; OWUSU, G. 1985. Somatic embryogenesis and in vitro plant development of cacao (Theobroma cacao L.). In International Symposium on Nuclear Techniques and in vitro Culture for plant Improvement (1985, Viena, Austria). Proceedings. Viena, International Atomic Energy Agency. p. 443 - 449.
- OJEDA, L.A. 1986. Microinjerto in vitro en Cedrela odorata L. empleando ápices juveniles y adultos. Tesis Mag. Sc. Chapingo, Mex., Colegio de Posgraduados. 65 p.
- OLOFINBOBA, M.O. 1973. Studies on seedlings of Theobroma cacao L. variety F₃ Amazan. 1. Role of cotyledons in seedling development. Turrialba (C.R.) 25(2): 121 - 127.
- ORCHARD, J.E.; COLLINS, N.A.; HARDWICH, K. 1979. Culture of shoot apices of Theobroma cacao. Physiologia Plantarum (Dinamarca) 42: 207 - 210.
- 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.
- _____; VILLALOBOS, V.M. 1989. Rescate in vitro de embriones provenientes de semillas aplanadas de cacao (Theobroma cacao L.). Turrialba (C.R.) 39(4): 525 - 529.
- PARKINSON, M.; YEOMAN, M.M. 1982. Graft formation in cultured, explanted internodes. New Phytologist (G.B) 91: 711 - 719.
- _____; JEFFREE, C.E.; YEOMAN, M.M. 1987. Incompatibility in cultured explant grafts between members of the Solanaceae. New Phytologist (G.B.) 107: 489 - 498.
- PASSEY, A.J.; JONES, O.P. 1983. Shoot proliferation and rooting in vitro of Theobroma cacao L. type Amelonado. Journal of Horticultural Science (G.B) 58(4): 589 - 592.

- PENCE, V.C.; HASEGAWA, P.; JANICK, J. 1979. Asexual embryogenesis in Theobroma cacao L. Journal of the American Society for Horticultural Science (EE.UU.) 104(2): 145 - 148.
- _____; HASEGAWA, P.M.; JANICK, J. 1981. In vitro cotyledonary development and anthocyanin synthesis in zygotic an asexual embryos of Theobroma cacao. Journal of the American Society for Horticultural Science (EE.UU.) 106(3): 381 - 385.
- RAGHAVAN, V. 1976. Experimental embryogenesis in vascular plants. Londres, Academic Press. 603 p.
- _____; SRIVASTAVA, P.S. 1982. Embryos culture. In. Experimental embryology of vascular plants. Ed. by B.M. Johri. New York, Springer Berlag. p. 195 - 230.
- RANCH, J.; PACE, G.M. 1988. Science in the art of plant regeneration from cultured cells: an essay and a proposal for a conceptual framework. Iowa State Journal of Research (EE.UU.) 62(4): 537 - 569.
- RAO, A.N.; LEE, S.K. 1986. An overview of the in vitro propagation of woody plants and plantation crops. In Plant tissue culture and its agricultural applications. Ed. by L. Withers; P.G. Alderson. London, Butter Worths. p. 123 - 138.
- SKOOG, F.; MILLER, C.O. 1957. Chemical of regulation of growth and organ formation in plant tissues culture in vitro. Symposia of the Society for Experimental Biology (G.B.) 11: 118 - 131.
- SUNG, Z.R. 1985. Developmental biology of plant embryogenesis. In Plant genetics p. 115-128.
- VALVERDE, L.M. 1989. Efecto del pH, la luz, la condición del medio y la concentración de sacarosa en la embriogénesis somática de cacao (Theobroma cacao L.) in vitro. Tesis de Licenciatura. Turrialba, Costa Rica, Sede Universitaria Regional del Atlántico, Universidad de Costa Rica. 102 p.
- VILLALOBOS, V.M.; THORPE, T.A.; YEUNG, E.C. 1983. Aplicaciones del cultivo de tejidos en especies forestales. Ciencia y Desarrollo, CONACYT. México. 51: 43 - 59.

- _____; YEUNG, E.; THORPE, T.A. 1985. Origin of adventitious shoots in excised radiata pine cotyledons cultured in vitro. Canadian Journal of Botany (Can.) 63: 2172 - 2176.
- VILLEGAS, A. 1985. Micropropagación de frutales. In. Fundamentos teórico-prácticos de cultivo de tejidos vegetales. Ed. por V.M. Villalobos A. Chapingo, México, Centro Genético, Laboratorio de Biotecnología. p. 181-190.
- WETHERELL, D.F. 1984. Enhanced adventive embryogenesis resulting plasmolysis of cultured wild carrot cells. Plant Cell Tissue and Organ Culture (Holanda) 3: 221 - 227.
- WILLIAMS, E.G.; MAHESWARAN, G. 1986. Somatic embryogenesis: Factors influencing coordinated behaviour of cells as an embryogenic group. Annals of Botany (G.B.) 57: 443-462.
- YEOMAN, M.M.; BROWN, R. 1976. Implications of the formation of the graft union for organisation in the intact plant Annals of Botany. (G.B.) 40: 1265 - 1276.
- YI-CHANG, W.; JANICK, J. 1984. Inducing precocious germination in asexual embryos of cacao. Hort Science (EE.UU.) 19(6): 839 - 841.
- YIDAMA, J.A.; WITHERS, L.; IVINS, J.D. 1987. Development of a simple methods for collecting and propagating cacao germplasm in vitro. Acta Horticulturae (Holanda) 212: 95 - 97.

IX. APENDICE

Cuadro 1A. Cultivo de portainjertos en diferentes combinaciones de caseína hidrolizada y valores de pH, utilizando semillas disectadas ¹.

TRATAMIENTOS CH /2 + pH mg·l ⁻¹	% SEMILLAS GERMINADAS	% DESARROLLO RAICES SE- CUNDARIAS	% DESARROLLO HIPOCOTILO	% DESARROLLO EPICOTILO	% FORMACION DE HOJAS	% CALLO TALLO
0	+ 5,7	100	80	100	0	0
	+ 6,7	100	80	100	0	0
	+ 7,7	100	100	100	0	0
250	+ 5,7	100	80	100	0	0
	+ 6,7	100	80	100	0	0
	+ 7,7	100	80	100	0	0
500	+ 5,7	100	60	100	0	0
	+ 6,7	100	40	100	0	0
	+ 7,7	100	80	100	0	0
750	+ 5,7	100	100	100	0	0
	+ 6,7	100	100	100	0	0
	+ 7,7	100	60	100	0	0
1000	+ 5,7	100	100	100	0	0
	+ 6,7	100	40	100	0	0
	+ 7,7	100	100	100	0	0

1. Los datos se tomaron en la primera semana de cultivo.
2. Caseína Hidrolizada.

Cuadro 2A. Cultivo de portainjertos en diferentes combinaciones de caseína hidrolizada y valores de pH, utilizando semillas enteras ¹.

TRATAMIENTOS CH /2 + pH mg.l ⁻¹	% SEMILLAS GERMINADAS	% DESARROLLO RAICES SE- CUNDARIAS	% DESARROLLO HIPOCOTILO	% DESARROLLO EPICOTILO	% FORMACION DE HOJAS	% CALLO TALLO
0 + 5,7	100	20	100	0	0	0
0 + 6,7	100	20	100	0	0	0
0 + 7,7	100	20	100	0	0	0
250 + 5,7	80	20	100	0	0	0
250 + 6,7	100	40	100	0	0	0
250 + 7,7	100	60	100	0	0	0
500 + 5,7	100	0	100	0	0	0
500 + 6,7	100	20	100	0	0	0
500 + 7,7	100	0	100	0	0	0
750 + 5,7	100	0	100	0	0	0
750 + 6,7	100	0	100	0	0	0
750 + 7,7	100	20	100	0	0	0
1000 + 5,7	100	0	100	0	0	0
1000 + 6,7	100	0	100	0	0	0
1000 + 7,7	100	20	100	0	0	0

1. Los datos se tomaron en la primera semana de cultivo.
2. Caseína Hidrolizada.

Cuadro 3A. Cultivo de portainjertos en diferentes combinaciones de caseína hidrolizada y valores de pH, utilizando semillas disectadas ¹.

TRATAMIENTOS CH /2 + pH mg-1 ⁻¹	% DESARROLLO RAICES SE- CUNDARIAS	% DESARROLLO HIPOCOTILO	% DESARROLLO EPICOTILO	% FORMACION DE HOJAS	% CALLO TALLO	
0	+ 5,7	100	100	100	100	20
	+ 6,7	100	100	100	100	0
	+ 7,7	100	100	100	100	0
250	+ 5,7	100	100	80	80	0
	+ 6,7	100	100	100	100	0
	+ 7,7	100	100	100	80	0
500	+ 5,7	100	100	80	80	0
	+ 6,7	100	100	100	100	0
	+ 7,7	100	100	100	100	40
750	+ 5,7	100	100	100	80	0
	+ 6,7	100	100	100	100	0
	+ 7,7	100	100	80	60	0
1000	+ 5,7	100	100	100	80	0
	+ 6,7	100	100	100	40	0
	+ 7,7	100	100	100	80	0

1. Los datos se tomaron en la segunda semana de cultivo.
2. Caseína Hidrolizada.

Cuadro 4A. Cultivo de portainjertos en diferentes combinaciones de caseína hidrolizada y valores de pH, utilizando semillas enteras ¹

TRATAMIENTOS CH /2 + pH mg·l ⁻¹	% DESARROLLO RAICES SE- CUNDARIAS	% DESARROLLO HIPOCOTILO	% DESARROLLO EPICOTILO	% FORMACION DE HOJAS	% CALLO TALLO	
0	+ 5,7	40	80	0	0	0
	+ 6,7	100	100	60	60	0
	+ 7,7	100	100	40	20	20
250	+ 5,7	80	80	20	20	0
	+ 6,7	80	100	20	20	0
	+ 7,7	80	100	0	0	0
500	+ 5,7	100	100	20	20	0
	+ 6,7	100	100	40	40	0
	+ 7,7	100	100	20	20	0
750	+ 5,7	60	100	0	0	0
	+ 6,7	100	100	0	0	0
	+ 7,7	100	100	0	0	0
1000	+ 5,7	40	80	20	0	0
	+ 6,7	100	100	20	20	0
	+ 7,7	100	100	20	0	0

1. Los datos se tomaron en la segunda semana de cultivo.
2. Caseína Hidrolizada.

Cuadro 5A. Cultivo de portainjertos en diferentes combinaciones de caseína hidrolizada y valores de pH, utilizando semillas disectadas ¹.

TRATAMIENTOS CH /2 + pH mg·l ⁻¹	% DESARROLLO RAICES SE- CUNDARIAS	% DESARROLLO HIPOCOTILO	% DESARROLLO EPICOTILO	% FORMACION DE HOJAS	% CALLO TALLO
0	+ 5,7	100	100	100	100
	+ 6,7	100	100	100	60
	+ 7,7	100	100	100	20
250	+ 5,7	100	100	100	60
	+ 6,7	100	100	100	40
	+ 7,7	100	100	80	0
500	+ 5,7	100	100	100	80
	+ 6,7	100	100	100	80
	+ 7,7	100	100	100	100
750	+ 5,7	100	100	100	80
	+ 6,7	100	100	100	60
	+ 7,7	100	100	100	40
1000	+ 5,7	100	100	100	100
	+ 6,7	100	100	100	40
	+ 7,7	100	100	100	60

1. Los datos se tomaron en la tercera semana de cultivo.
2. Caseína Hidrolizada.

Cuadro 6A. Cultivo de portainjertos en diferentes combinaciones de caseína hidrolizada y valores de pH, utilizando semillas enteras ¹.

TRATAMIENTOS CH /2 + pH mg·l ⁻¹	% DESARROLLO RAICES SE- CUNDARIAS	% DESARROLLO HIPOCOTILO	% DESARROLLO EPICOTILO	% FORMACION DE HOJAS	% CALLO TALLO
0	+ 5,7	80	80	80	60
	+ 6,7	100	100	100	80
	+ 7,7	100	100	100	60
250	+ 5,7	100	100	80	60
	+ 6,7	100	100	100	80
	+ 7,7	100	100	100	60
500	+ 5,7	100	100	100	80
	+ 6,7	100	100	100	80
	+ 7,7	100	100	100	40
750	+ 5,7	100	100	100	80
	+ 6,7	100	100	100	80
	+ 7,7	100	100	100	20
1000	+ 5,7	80	80	80	40
	+ 6,7	100	100	100	60
	+ 7,7	100	100	100	60

1. Los datos se tomaron en la tercera semana de cultivo.

2. Caseína Hidrolizada.

Cuadro 7A. Cuadrados medios, coeficientes de variación y significancia de las variables de crecimiento analizadas en portainjertos cultivados en diferentes concentraciones de caseína hidrolizada y valores de pH.

FUENTE DE VARIACION	GRADO DE LIBERTAD	NUMERO SEMILLAS GERMINADAS	DESARROLLO RAICES SECUNDARIAS	LONGITUD EJE HIPOC- RADIC cm	LONGITUD EPICOTILO cm	NUMERO HOJAS	CALLO TALLO
TRATAMIENTO	14	0,0333†	0,4730	8,9384†	0,8130	1,0462†	0,6595
ERROR	72	0,0333	1,0441	2,6098	1,1465	0,8484	0,6786
CV	--	3,67	25,68	22,11	30,95	43,70	48,93

Diferencias significativas al 5%.

Cuadro 8A. Cuadrados medios, coeficientes de variación y significancia de las variables estudiadas en la inducción de raíces adventicias en portainjertos de cacao en diferentes concentraciones de MS (15 días de cultivo).

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	PRESENCIA RAICES	NUMERO/ PLANTA	LONGITUD PROMEDIO cm	GROSOR PROMEDIO cm	OXIDACION	CALLO HIPOCOTILO
TRATAMIENTO	2	0,0476	20,82†	0,1937	0,0004	0,0142	0,0809
ERROR	31	0,0838	20,49	0,3315	0,0015	0,1129	0,1064
CV		37,67	65,20	55,41	43,03	37,94	36,84

† Diferencia significativa al 5%.

Cuadro 9A. Cuadrados medios, coeficientes de variación y significancia de las variables estudiadas en la inducción de raíces adventicias en portainjertos de cacao en diferentes concentraciones de MS (22 días del cultivo).

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	PRESENCIA RAICES	NUMERO/ PLANTA	LONGITUD PROMEDIO cm	GROSOR PROMEDIO cm	OXIDACION	CALLO HIPOCOTILO
TRATAMIENTO	2	0,0619*	20,8142*	1,6-419*	0,0008	0,0476	0,0809
ERROR	31	0,0548	21,2612	0,7491	0,0016	0,0838	0,1064
CV		24,83	50,59	41,12	36,89	31,67	36,83

* Diferencia significativa al 5%.

Cuadro 10A. Cuadrados medios, coeficientes de variación y significancia de las variables estudiadas en la inducción de raíces adventicias en portainjertos de cacao en diferentes concentraciones de MS (30 días de cultivo).

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	PRESENCIA RAICES	NUMERO/ PLANTA	LONGITUD PROMEDIO cm	GROSOR PROMEDIO cm	OXIDACION	CALLO HIPOCOTILO
TRATAMIENTO	2	0,0238*	1,1142*	2,1194*	0,0015*	0,0285	0,0238*
ERROR	31	0,0290	43,9935	1,1444	0,0012	0,0580	0,0290
CV		17,54	58,77	37,67	33,23	25,55	17,54

* Diferencia significativa al 5%.

Cuadro 11A. Cuadrados medios, coeficientes de variación y significancia de las variables estudiadas en la inducción de raíces adventicias en portainjertos de cacao en diferentes concentraciones de AIB (15 días de cultivo).

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	PRESENCIA RAICES	NUMERO/ PLANTA	LONGITUD PROMEDIO cm	GROSOR PROMEDIO cm	OXIDACION	CALLO HIPOCOTILO
TRATAMIENTO	3	0,3333†	48,96†	0,0333†	0,0008†	0,2250†	0,6000†
ERROR	36	0,1500	30,72	0,0338	0,0003	0,0583	0,1277
CV		193,64	299,63	226,40	193,64	322,03	178,73

† Diferencia significativa al 5%.

Cuadro 12A. Cuadrados medios, coeficientes de variación y significancia de las variables estudiadas en la inducción de raíces adventicias en portainjertos de cacao en diferentes concentraciones de AIB (22 días de cultivo).

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	PRESENCIA RAICES	NUMERO/ PLANTA	LONGITUD PROMEDIO cm	GROSOR PROMEDIO cm	OXIDACION	CALLO HIPOCOTILO
TRATAMIENTO	3	0,3666†	76,225	0,5296†	0,0154†	0,0250†	1,0916†
ERROR	36	0,2222	166,869	0,4625	0,0123	0,0250	0,1805
CV		134,68	255,63	167,91	228,38	632,45	73,89

† Diferencia significativa al 5%.

Cuadro 13A. Desarrollo de diferentes tipos morfológicos de embriones somáticos de cacao en el genotipo CC-18 ^{1/}

ABA mg·l ⁻¹	MONOCOTI- LEDONES	DICOTI- LEDONES	POLICOTI- TILEDONES	COTILEDON- NES FUSIO- NADOS	HIPOCOTI- LEDONES ALARGADOS	FORMA TROMPETA	MODERA- DAMENTE FASCIADOS	FUERTEMEN- TE FASCIA- DOS	FUCION DIAXIAL PROXIMAL	EMBRIONES MÚLTIPLES
0,00	20,0	30,0	16,7	0,0	6,7	0,0	20,0	3,3	6,7	6,7
0,25	26,7	23,3	16,7	0,0	10,0	3,3	3,3	13,3	0,0	3,3
0,50	10,0	3,3	20,0	0,0	23,3	0,0	20,0	6,7	10,0	6,7
0,75	6,7	20,0	20,0	0,0	13,3	0,0	13,3	26,7	6,7	0,0
1,00	20,0	23,3	20,0	0,0	23,3	0,0	3,3	10,0	0,0	0,0

1. Los valores están expresados en porcentajes.

Cuadro 14A. Desarrollo de diferentes tipos morfológicos de embriones somáticos de cacao en el genotipo EET-400 ^{1/}.

ABA mg·l ⁻¹	MONOCOTI- LEDONES	DICOTI- LEDONES	POLICOTI- TILEDONES	COTILEDON- NES FUSIO- NADOS	HIPOCOTI- LEDONES ALARGADOS	FORMA TROMPETA	MODERA- DAMENTE FASCIADOS	FUERTEMEN- TE FASCIA- DOS	FUCION DIAXIAL PROXIMAL	EMBRIONES MÚLTIPLES
0,00	46,7	13,3	26,7	0,0	13,3	0,0	10,0	0,0	0,0	0,0
0,25	10,0	56,7	3,3	0,0	3,3	0,0	16,7	3,3	6,7	0,0
0,50	28,6	0,0	0,0	0,0	10,0	4,3	7,1	14,3	14,3	0,0
0,75	14,3	0,0	28,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	14,3	14,3
1,00	13,3	13,3	23,3	0,0	43,3	0,0	10,0	0,0	0,0	0,0

1. Los valores están expresados en porcentajes.

Cuadro 15A. Desarrollo de diferentes tipos morfológicos de embriones somáticos de cacao en el genotipo POUND-12 1/.

ABA mg·l ⁻¹	MONOCOTI- LEDONES	DICOTI- LEDONES	POLICOTI- TILEDONES	COTILEDON- NES FUSIO- NADOS	HIPOCOTI- LEDONES ALARGADOS	FORMA TROMPETA	MODERA- DAMENTE FASCIADOS	FUERTEMEN- TE FASCIA- DOS	FUCION DIAIXIAL PROXIMAL	EMBRIONES MULTIPLES
0,00	3,3	46,7	16,7	0,0	0,0	0,0	13,3	10,0	10,0	0,0
0,25	3,3	50,0	20,0	0,0	6,7	0,0	3,3	13,3	3,3	0,0
0,50	16,7	43,3	20,0	0,0	6,7	0,0	6,7	6,7	0,0	0,0
0,75	8,3	16,7	13,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	16,7	0,0
1,00	3,3	26,7	40,0	3,3	10,0	0,0	3,3	3,3	6,7	

1. Los valores están expresados en porcentajes.

Cuadro 16A. Desarrollo de diferentes tipos morfológicos de embriones somáticos de cacao en el genotipo UF-613 1/.

ABA mg·l ⁻¹	MONOCOTI- LEDONES	DICOTI- LEDONES	POLICOTI- TILEDONES	COTILEDON- NES FUSIO- NADOS	HIPOCOTI- LEDONES ALARGADOS	FORMA TROMPETA	MODERA- DAMENTE FASCIADOS	FUERTEMEN- TE FASCIA- DOS	FUCION DIAIXIAL PROXIMAL	EMBRIONES MULTIPLES
0,0	0,0	63,6	18,2	0,0	18,2	0,0	9,0	0,0	0,0	0,0
0,25	0,0	0,0	0,0	0,0	50,0	0,0	50,0	0,0	0,0	0,0
0,50	0,0	53,3	20,0	0,0	13,3	0,0	6,7	3,3	3,3	0,0
0,75	6,7	13,3	16,7	0,0	46,7	0,0	6,7	6,7	3,3	0,0
1,00	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

1. Los valores están expresados en porcentajes.