



**PROGRAMA DE ENSEÑANZA PARA EL DESARROLLO Y LA CONSERVACIÓN
ESCUELA DE POSTGRADO**

**EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN CLONES SUPERIORES DE CACAO
(*THEOBROMA CACAO* L.) OBTENIDOS EN EL PROGRAMA DE
MEJORAMIENTO GENÉTICO DEL CATIE**

Tesis sometida a consideración de la Escuela de Posgrado, Programa de Educación para el Desarrollo y la Conservación del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza como requisito para optar por el grado de:

***Magister Scientiae* en Agricultura Ecológica**

Por

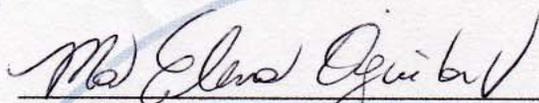
William Solano Sánchez

Turrialba, Costa Rica, 2008

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

Magister Scientiae en Agricultura Ecológica

Firmantes:



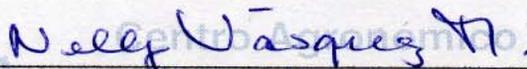
Handwritten signature of María Elena Aguilar Vega in blue ink.

María Elena Aguilar Vega, Ph.D.
Consejero Principal



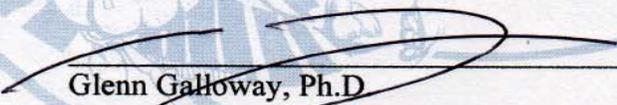
Handwritten signature of Wilbert Phillips Mora in blue ink.

Wilbert Phillips Mora, Ph.D.
Miembro Comité Consejero



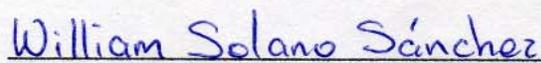
Handwritten signature of Nelly Vásquez Morera in blue ink.

Nelly Vásquez Morera, M.Sc.
Miembro Comité Consejero



Handwritten signature of Glenn Galloway in blue ink.

Glenn Galloway, Ph.D.
**Director Programa de Educación
Decano de la Escuela de Posgrado**



Handwritten signature of William Solano Sánchez in blue ink.

William Solano Sánchez
Candidato

DEDICATORIA

A Dios por darme el don de la vida y la sabiduría para enfrentar los retos, las alegrías y los obstáculos que se me presentan constantemente.

Especialmente quiero dedicar este trabajo y esfuerzo a mis dos angelitos Esteban y Gabriel que son los motores que me impulsan a enfrentar el día a día con fortaleza.

EL SEÑOR ES MI PASTOR

El Señor es mi pastor; nada me faltará.
En lugares de delicados pastos me hará descansar;
Junto a aguas de reposo me pastoreará.
Confortará mi alma;
Me guiará por sendas de justicia por amor de su nombre.
Aunque ande en valle de sombra de muerte,
No temeré mal alguno, porque tú estarás conmigo;
Tu vara y tu cayado me infundirán aliento.
Aderezas mesa delante de mí en presencia de mis angustiadores;
Unges mi cabeza con aceite; mi copa está rebosando.
Ciertamente el bien y la misericordia me seguirán todos los días de mi vida,
Y en la casa del Señor moraré por largos días.

Salmo 23

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer de manera especial a mis padres William y Blanca por la herencia más grande que me pudieron haber dejado: La oportunidad de realizarme profesionalmente.

A María Elena Aguilar por su consejo oportuno y por los invaluable aportes al documento y soporte en la conducción del estudio.

A Nelly Vásquez por su sincera amistad, enseñanza, confianza, apoyo y oportunidades brindadas desde hace varios años y por sus atinadas correcciones y contribuciones a este documento.

A Wilbert Phillips por sus recomendaciones oportunas en el desarrollo de este trabajo, sus ideas contribuyeron enormemente en la orientación de esta investigación y sus aportes ayudaron a mejorar mi visión del cultivo de cacao

A Gustavo López por su paciente y valiosa ayuda con todos los análisis estadísticos.

A Karol Salazar, por estar siempre a mi lado brindándome su consejo, apoyo y comprensión a lo largo de este camino lleno de obstáculos y éxitos.

Al Dr. Pedro Ferreira y Adriana Arce por la confianza depositada en mí y por encontrar la alternativa para que pudiera llevar a cabo mis estudios en CATIE y mi pasantía en Francia.

Al Ministerio de Ciencia y Tecnología de Costa Rica (MICIT) por el apoyo financiero para la realización de este trabajo.

Al personal del Centro de Investigación y Desarrollo de la NESTLE en Tours, Francia, especialmente a los señores Vincent Petiard, Bernard Masseret y las señoras Manuela Guerin y Michèle Gianforcaro por hacer de mi estadía en Francia un período de crecimiento profesional y personal, también por compartir sus conocimientos y experiencias y por tenderme la mano en el momento más difícil de mi vida.

A todos mis amigos y compañeros de la generación 2005-2006 por compartir gratos momentos durante los dos años.

A mis compañeros de Biotecnología por todos los momentos de convivencia y camaradería que hacen más agradable el trajín diario.

A todos aquellos que de una u otra forma contribuyeron con la realización de este trabajo.

BIOGRAFÍA

El autor nació en Turrialba, Costa Rica el 12 de abril de 1972. Realizó su primaria en la escuela Dr. José María Castro Madriz de Pejibaye, Jiménez. Los estudios secundarios los llevó a cabo en el Colegio Técnico Profesional Agropecuario de La Suiza, Turrialba. En 1989 ingresó a la Universidad de Costa Rica en la Sede Regional del Atlántico en Turrialba y se graduó en 1994 como bachiller en Ingeniería Agronómica con énfasis en Fitotecnia. En el año 2001 obtuvo la licenciatura en Agronomía otorgándosele una mención honorífica por la calidad de la investigación realizada. Ingresó a la Escuela de Posgrado del CATIE en 2005 a cursar la maestría en Agricultura Ecológica.

Su experiencia profesional, se inicia en el Laboratorio de Biotecnología del CATIE en junio de 1995 como asistente de investigación en histología y cultivo de tejidos de raíces y tubérculos. En noviembre de 1995 pasa a formar parte como investigador del proyecto Mejoramiento Genético de la Caficultura Centroamericana financiado por PROMECAFE. En el año 2001 inicia nuevamente labores para el CATIE como investigador dentro del proyecto Híbridos F1 de Café.

Actualmente el autor se desempeña como coordinador del proyecto Improved conservation and availability of the crop diversity collections held by CATIE financiado por el Global Crop Diversity Trust y como investigador en embriogénesis somática de cacao.

CONTENIDO

DEDICATORIA.....	iii
AGRADECIMIENTOS.....	iv
BIOGRAFÍA.....	v
CONTENIDO.....	vi
RESUMEN.....	viii
SUMMARY.....	x
INDICE DE CUADROS.....	xii
INDICE DE FIGURAS.....	xiii
1 INTRODUCCION.....	1
1.1 Justificación.....	3
1.2 Objetivos.....	4
1.2.1. General.....	4
1.2.2. Específicos.....	4
1.3 Hipótesis.....	4
2 REVISION DE LITERATURA.....	5
2.1 Origen e historia del cacao.....	5
2.2 Importancia económica y social del cultivo.....	6
2.3 Botánica del cacao.....	8
2.3.1 Generalidades del cultivo.....	8
2.3.2 Biología de la floración.....	10
2.3.3 Inflorescencia.....	11
2.3.4 Estructura de la flor.....	12
2.4 Enfermedades.....	13
2.4.1 Moniliasis.....	13
2.4.2 Escoba de bruja.....	14
2.4.3 Mazorca negra.....	15
2.5 Diversidad genética.....	15
2.5.1 Criollos.....	16
2.5.2 Forasteros.....	16
2.5.3 Trinitarios.....	17
2.6 Mejoramiento genético.....	17
2.7 Métodos de propagación.....	20
2.7.1 Propagación sexual.....	20
2.7.2 Propagación asexual.....	20
2.7.2.1 Propagación por injertos.....	20
2.7.2.2 Propagación por estacas.....	22
2.7.2.3 Propagación <i>in vitro</i>	23
2.7.2.4 Embriogénesis somática.....	24
2.8 Cultivo de tejidos en cacao.....	25
2.8.1 Embriogénesis somática de cacao.....	26
2.8.2 Evaluación en campo de plantas producidas por ES.....	27
3. MATERIALES Y METODOS.....	29
3.1 Materiales.....	29

3.1.1	Localización del estudio.....	29
3.1.2	Material vegetal.....	29
3.2	Metodología.....	30
3.2.1	Medios de cultivo.....	30
3.2.2	Colecta y desinfección de los explantes.....	30
3.2.3	Fase de inducción y expresión de la embriogénesis.....	31
3.2.3.1	Experimento inducción I.....	31
3.2.3.2	Experimento inducción II.....	32
3.2.4	Fase de multiplicación.....	33
3.2.4.1	Inducción de la embriogénesis secundaria.....	33
3.2.5	Fase de desarrollo de embriones.....	33
3.2.5.1	Evaluación del tamaño del embrión.....	34
3.2.5.2	Comparación del desarrollo del embrión en medio líquido y medio sólido.....	34
3.2.6	Fase de aclimatación.....	35
3.2.7	Condiciones de incubación.....	36
3.3	Análisis estadístico de los datos.....	36
3.3.1	Definición de unidad experimental y unidad de medida.....	36
3.3.2	Variables evaluadas.....	36
3.3.3	Análisis de datos.....	37
4	RESULTADOS Y DISCUSION.....	38
4.1	Establecimiento de cultivos asépticos y formación de callo primario.....	38
4.1.1	Experimento Inducción I.....	38
4.1.2	Experimento Inducción II.....	40
4.2	Fase de inducción y expresión de la embriogénesis.....	41
4.2.1	Experimento Inducción I.....	42
4.2.2	Experimento Inducción II.....	45
4.3	Fase de multiplicación.....	50
4.3.1	Inducción de la embriogénesis secundaria.....	50
4.4	Fase de desarrollo de embriones.....	53
4.4.1	Efecto del tamaño inicial del embrión.....	53
4.4.2	Desarrollo de embriones somáticos en medio líquido y medio sólido.....	58
4.5	Fase de aclimatación.....	62
5	CONCLUSIONES.....	66
6	RECOMENDACIONES.....	68
7	LITERATURA CONSULTADA.....	69
8	ANEXOS.....	84
8.1	Anexo 1: Salidas de SAS.....	85
8.2	Anexo 2: Composición de los medios de cultivo.....	90
8.3	Anexo 3: Recipiente de inmersión temporal RITA [®]	92

Solano W. 2008. Embriogénesis somática en clones superiores de cacao (*Theobroma cacao* L.) obtenidos en el Programa de Mejoramiento Genético del CATIE.

Palabras clave: *Theobroma cacao*, embriogénesis somática, genotipos superiores, portainjerto, desarrollo de embriones, embriogénesis secundaria, aclimatación.

RESUMEN

El desarrollo de una metodología eficiente de propagación asexual de cacao, como la embriogénesis somática, se convertiría en una poderosa herramienta para la multiplicación clonal, el intercambio internacional de material genético libre de enfermedades y la conservación de genotipos élite del programa de mejoramiento genético del CATIE. El presente trabajo consistió en comparar los protocolos desarrollados por Penn State University (PSU) y por la NESTLE en Tours, Francia, para la inducción de la embriogénesis somática en los genotipos superiores de cacao ICS-95, CC-137, EET-183, UF-273, CATIE R4, CATIE R6 y CATIE R7, utilizando los pétalos y estaminoideos como explantes. Además, se estudió el desarrollo de embriones, la embriogénesis secundaria y la aclimatación de algunos de ellos. En la fase de inducción se determinó una interacción directa entre el medio de cultivo y el tipo de explante. En los clones UF-273, CC-137, CATIE R4 y CATIE R6 la mayor producción de embriones se obtuvo con el medio PCG de PSU y el explante estaminoide; por el contrario en los clones EET-183, ICS-95 y CATIE R7 la mejor respuesta fue cuando se utilizó el medio de cultivo NT1 de la NESTLE con el explante pétalo. Para los clones CATIE R4 y CATIE R6, se estudió el efecto de los portainjertos IMC-67 y UF-613, se determinó que el patrón sobre el cual está injertado el clon afecta significativamente la respuesta *in vitro* de ese clon. Los árboles del clon CATIE R4 y CATIE R6 injertados sobre el patrón UF-613 obtuvieron un 400% y un 185% más embriones respectivamente, que los injertados sobre el patrón IMC-67. Se obtuvo embriones secundarios y agregados embriogénicos, la cantidad de embriones obtenida en el clon EET-183 fue en promedio 14 veces mayor que la obtenida por el clon UF-273. Además, se observó un callo embriogénico friable que podría servir como material de inicio de suspensiones celulares. En la fase de desarrollo los embriones se clasificaron de acuerdo a su tamaño inicial (0-2mm, 2-4 mm, 4-6 mm y más de 6 mm) y se colocaron en los medios de cultivo PEC (PSU) y ENR-6/G-80 (NESTLE). El crecimiento promedio total mayor fue

de 51,5mm y correspondió al clon EET-183, medio de cultivo PEC y tamaño inicial 2-4mm, mientras que el crecimiento menor (5,0mm) correspondió al EET-183, medio de cultivo G-80 y tamaño inicial 4-6mm. Para la evaluación del desarrollo de embriones en medio líquido y sólido se utilizó respectivamente el bioreactor RITA[®] y frascos tipo gerber. En ambos casos se evaluó el efecto de tres densidades iniciales de cultivo para lo cual se utilizó 10, 20 y 40 embriones del clon CATIE R4 por recipiente. Se observó que el medio sólido en cualquiera de las tres densidades siempre presentó un número mayor de embriones malformados en comparación con el medio líquido; por otra parte, el tiempo requerido en medio líquido para realizar los cambios de medio fue 50% menos que en medio sólido. Finalmente, para la aclimatación de plantas del clon UF-273 se evaluó la sobrevivencia en un sustrato hecho de una mezcla de tierra, arena y turba en una relación 3:1:3 y pellets Jiffys. Después de tres meses de crecimiento en invernadero la sobrevivencia fue del 52% para el sustrato y 42% para los pellets.

Solano W. 2008. Somatic embryogenesis in cocoa (*Theobroma cacao* L.) superior clones obtained at the Genetic Improvement Program of CATIE.

Keywords: *Theobroma cacao*, somatic embryogenesis, superior genotypes, portagraft, embryos development, secondary embryogenesis, acclimatization.

SUMMARY

Development of an efficient cocoa asexual propagation methodology such as somatic embryogenesis could become a powerful tool for clone multiplication, international exchange of disease free genetic material and conservation of elite genotypes from CATIE's genetic improvement program. The purpose of this work was to compare protocols developed by Penn State University (PSU) and NESTLE in Tours, France for somatic embryogenesis induction in the following cocoa superior genotypes: ICS-95, CC-137, EET-183, UF-273, CATIE R4, CATIE R6 and CATIE R7, using as explants petals and staminoids. Furthermore, embryos development, secondary embryogenesis and acclimatization of some of them were also studied. During the induction stage, a direct interaction between culture medium and explant type was determined. In clones UF-273, CC-137, CATIE R4 and CATIE R6 the highest embryos production was obtained with PCG medium from PDU and the staminoid explant; on the contrary, in clones EET-183, ICS-95 and CATIE R7 the best response was obtained by using the NT1 culture medium from NESTLE with the petal explant. The effect of IMC-67 and UF-613 portagrafts was studied for clones CATIE R4 and CATIE R6, determining that the standard on which the clone is grafted affects significantly the *in vitro* response of that clone. Clone trees CATIE R4 and CATIE R6 grafted on the UF-613 standard obtained 400% and 185% more embryos respectively than those grafted on the IMC-67 standard. Secondary embryos and embryogenic aggregates were also obtained. The amount of embryos obtained from EET-183 clone was in average 14 times higher than that obtained for the UF-273 clone. Also, a friable embryogenic callus that could serve as starting material for cell suspensions was observed. In the development stage, embryos were classified according to their initial size (0-2mm, 2-4 mm, 4-6 mm and more than 6 mm) and placed in the PEC (PSU) and ENR-6/G80 (NESTLE) culture mediums. The highest total average growth was 51,5mm, corresponding to EET-183 clone, PEC culture medium and a starting size of 2-4mm while

the lowest growth (5,0 mm) corresponded to EET-183, G-80 culture medium and an initial size of 6 mm. For embryos development evaluation in liquid and solid mediums, RITA[®] bioreactor and *gerber* type flasks were employed respectively. In both cases, the effect of three initial culture densities was evaluated using 10, 20 and 40 embryos of CATIE R4 clone per vessel. It was observed that the solid medium in any of the three densities always showed a higher number of malformed embryos in comparison to the liquid medium. On the other hand, the time required to conduct medium changes in the liquid medium was 50% less than in the solid medium. Finally, regarding acclimatization of UF-273 clone, survival was evaluated in a substrate containing a mixture of soil, sand and peat in a 3:1:3 ratio and in Jiffys pellets. After three months of growth in a greenhouse, survival was 52% for the substrate and 42% for the pellets.

ÍNDICE DE CUADROS

- Cuadro 1** Principales características agronómicas de los clones seleccionados por el Programa de Mejoramiento Genético del CATIE.
- Cuadro 2** Detalle de los genotipos, medio de cultivo y tipo de explante evaluados durante la inducción de la embriogénesis somática de cacao.
- Cuadro 3** Detalle del genotipo, portainjerto, medios de cultivo y tipo de explante evaluados durante la inducción de la embriogénesis somática de cacao.
- Cuadro 4** Comparación de la proyección de producción de embriones por cada 100 explantes y 100 flores para cuatro clones de cacao, cultivados en dos medios de cultivo PCG y NT1 para la inducción de la embriogénesis somática.
- Cuadro 5** Comparación de las medias del porcentaje de explantes con embriones, porcentaje de embriones por explante (PET y EST) y proyección de producción de embriones por explante y por flor para dos clones R4 y R6 injertados sobre los patrones IMC-67 y UF-613 con los medios de cultivo PCG y NT1.
- Cuadro 6** Cantidades totales y promedios de embriones y agregados embriogénicos producidos en la embriogénesis secundaria de los clones UF-273 y EET-183.
- Cuadro 7** Comparación de las medias de crecimiento mensual y total de los embriones somáticos para cada uno de los factores estudiados clon, medio de cultivo y tamaño inicial del embrión.
- Cuadro 8** Valores promedios del número de plantas con hojas verdaderas, raíces, embriones malformados y muertos en medio líquido y sólido a las densidades de 10, 20 y 40 embriones por recipiente RITA[®].

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1** Estructura de las partes de la flor de cacao.
- Figura 2** Esquema de distribución de los embriones y plantas de cada genotipo en los diferentes experimentos de las cuatro fases del proceso de embriogénesis somática.
- Figura 3** Porcentaje de asepsia y reactividad de los explantes de los clones UF 273 Tipo I, EET-183, CC-137 y ICS-95 en los medios de cultivo PCG y NT1 en explantes de pétalo (PET) y estaminoide (EST).
- Figura 4** Porcentaje de asepsia y reactividad para el clon CATIE R7 en dos medios de cultivo (PCG y NT1) y 2 tipos de explante, pétalo (PET) y estaminoide (EST).
- Figura 5** Porcentaje de asepsia y reactividad para los clones CATIE R4 y CATIE R6, injertados sobre 2 genotipos (IMC-67 y UF-613), en 2 medios de cultivo (PCG y NT1) y 2 tipos de explante pétalo (PET) y estaminoide (EST).
- Figura 6** Porcentaje de explantes con embriones para los clones UF-273 Tipo I, EET-183, CC-137 y ICS-95 en 2 medios de cultivo (PCG y NT1) y 2 tipos de explante, pétalo (PET) y estaminoide (EST).
- Figura 7** Porcentaje de explantes con embriones para los clones y porcentaje de embriones por explante para el clon CATIE R7 en 2 medios de cultivo (PCG y NT1) y 2 tipos de explante, pétalo (PET) y estaminoide (EST).
- Figura 8** Dendograma del agrupamiento de las 16 combinaciones de los tratamientos evaluados de acuerdo a la producción promedio de embriones por explante descritos en el Cuadro 6, según el método WARD y la distancia Euclidiana.
- Figura 9** Número de embriones por explante para los clones CATIE R4 y CATIE R6, injertados sobre los genotipos IMC-67 y UF-613 en los medios de cultivo PCG y NT1.
- Figura 10** Eventos de la embriogénesis secundaria de cacao. A: Día inicial mostrando los fragmentos de embriones. B: 3 meses de cultivo. C: Aparición de los primeros embriones secundarios a los 5 meses. D: Morfología de los embriones formados. E: Agregado embriogénico. F: Callo embriogénico friable. G: Células embriogénicas y proembrión en el callo friable vistas al microscopio de luz (20X).
- Figura 11** Dinámica del crecimiento mensual (mm) de los embriones somáticos de los clones EET-183 y UF-273 en los medios de cultivo PEC y G-80/ENR6 con cuatro tamaños de embrión inicial durante un período de 4 meses.

- Figura 12** Crecimiento total (mm) al final de los cuatro meses de cultivo de los embriones somáticos de dos clones en dos medios de cultivo y con cuatro tamaños de embrión inicial.
- Figura 13** Variación del porcentaje de embriones malformados, muertos y normales durante un período de desarrollo de cuatro meses para embriones de los clones UF-273 y EET-183 en cuatro tamaños iniciales de embriones.
- Figura 14** Malformaciones más recurrentes detectadas en los embriones de cacao. A) Eje torcido. B) Ejes fusionados. C) Cotiledones anormalmente grandes.
- Figura 15** Variación del porcentaje de plantas malformadas, muertas y normales durante un período de desarrollo de embriones de 4 meses para 2 clones y 2 medios de cultivo.
- Figura 16** Comparación de la cantidad de embriones muertos y malformados desarrollados en medio líquido y sólido en las densidades iniciales de cultivo de 10, 20 y 40 embriones por recipiente.
- Figura 17** Comparación del porcentaje de embriones normales desarrollados en medio líquido y sólido en las densidades iniciales de cultivo de 10, 20 y 40 embriones por recipiente RITA[®].
- Figura 18** A) Embriones en medio sólido a densidad de 40 embriones por caja Petri a quince días de iniciado el experimento. B) Embriones en medio líquido a una densidad de veinte embriones por RITA a quince días del inicio del experimento. C) Plantas desarrolladas en medio sólido con dos meses de desarrollo. D) Plantas en RITA con dos meses de desarrollo. E) Embriones muertos y malformados en medio sólido con dos meses de desarrollo. F) Plantas con hojas verdaderas, raíces y embriones secundarios en RITA a una densidad de 40 embriones por recipiente y con dos meses de desarrollo, una de las plantas con hojas verdaderas está hiperhídrica.
- Figura 19** Porcentaje de sobrevivencia de plantas del clon UF-273 en fase de aclimatación en invernadero sobre dos tipos diferentes de sustrato en tres tiempos de evaluación.
- Figura 20** A) Plantas antes de ser aclimatadas. B) Siembra en pellets Jiffys. C) Siembra en sustrato. D) Desarrollo de plantas en sustrato dos meses después del trasplante. E) Desarrollo de plantas en pellets dos meses después del trasplante. F) Trasplante a bolsa de plantas producidas en sustrato. G) Trasplante a bolsa de plantas producidas en pellets. H) Plantas después de tres meses de aclimatación.

1. INTRODUCCIÓN

El cacao (*Theobroma cacao* L.) se originó en América Tropical, donde los indígenas mesoamericanos Aztecas, Toltecas y Mayas lo cultivaron durante siglos. Era usado como moneda y a su bebida se le considera con poderes divinos (Hardy 1961).

Llegó a ser un símbolo importante de su cultura, convirtiéndose posteriormente en un cultivo de relevante importancia principalmente en las tierras bajas costeras, producido principalmente por pequeños campesinos (Wood 1975).

Pronto el cacao se extendió a Asia y África, siendo este último continente el mayor productor a nivel mundial 1.390 millones de toneladas en 2006 (ICCO 2007). En los últimos años la producción de cacao en África ha enfrentado problemas de diversa índole como guerras civiles, enfermedades en el cultivo y acusaciones de explotación infantil (Moreno *et al.* 1983, Phillips 2003, ICCO 2000).

En Latinoamérica, en la actualidad, la actividad cacaotera alcanza una producción total de 484.000 toneladas métricas producidas en 1.35 millones de hectáreas que principalmente están en manos de pequeños agricultores (ICCO 2005a).

En el pasado, en todas las regiones donde se ha cultivado cacao se han presentado graves pérdidas económicas debido al ataque de enfermedades como la moniliasis (*Moniliophthora roreri*), la escoba de bruja (*Moniliophthora perniciosa*) y la mazorca negra (*Phytophthora sp.*), llegando a ser enfermedades comunes en muchos de los países productores (Wood 1975). Estas enfermedades, hoy en día, continúan causando graves pérdidas en todas las regiones productoras, poniendo en peligro la sustentabilidad del producto (Bowers *et al.* 2001).

La moniliasis se considera una de las principales enfermedades pues destruye los frutos, limitando seriamente la producción con pérdidas que oscilan entre un 16 y 80% (Lass 1985). Es por la alta incidencia de enfermedades fungosas que, desafortunadamente, el cultivo no ha podido desarrollarse en toda su magnitud por lo que existe un déficit de producción, debido al bajo potencial productivo de los materiales sembrados y a la falta de híbridos adaptados a las zonas cacaoteras (Moreno *et al.* 1983, Arévalo *et al.* 2004).

Para buscarle solución a estos problemas el Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE) inició en 1996 un Programa de Mejoramiento Genético del Cacao buscando mejorar la productividad y la resistencia a las principales

enfermedades, haciendo uso de los materiales conservados en su colección de germoplasma. Este programa cuenta con el apoyo de la World Cocoa Foundation y el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA) y tiene como propósito reemplazar los cruces interclonales promovidos durante la década de los 70's con materiales adaptados a las condiciones actuales. Como resultado se han obtenido genotipos superiores de alta producción y resistencia a las principales enfermedades, especialmente la moniliasis (Phillips-Mora *et al.* 2005).

En cualquier cultivo la disponibilidad de buenas variedades es un aspecto básico de la producción sustentable; sin embargo, como es conocido en el ámbito agronómico, el cacao es una especie difícil de propagar vegetativamente y su clonación es una limitante a nivel mundial, hecho que dificulta la propagación y distribución del material élite (López-Baez *et al.* 2001, Eskes 2001).

Tradicionalmente, el cacao se ha clonado mediante prácticas hortícolas; sin embargo, los logros obtenidos no han alcanzado mayor repercusión, ya que la distribución de dichas variedades a los productores se ha limitado por la falta de métodos para la multiplicación rápida con un desembolso económico mínimo (López-Baez *et al.* 2000a).

El uso de técnicas de reproducción asexual tal como el cultivo de tejidos, permite una multiplicación masiva en poco tiempo, lo que constituye un buen instrumento para agilizar los trabajos de mejoramiento genético. Además el cultivo de tejidos es una excelente herramienta para la conservación, caracterización, multiplicación e intercambio de material genético (Villalobos *et al.* 1991).

En los últimos años han ocurrido avances en el desarrollo de tecnologías para obtener embriones somáticos de un número cada vez mayor de especies. La embriogénesis somática es una valiosa herramienta dentro de los programas de mejoramiento y como método de propagación a gran escala de genotipos superiores, especialmente en cultivos perennes de alto valor (Silva *et al.* 2004). La embriogénesis somática es una herramienta muy útil para la propagación de plantas y consiste en la habilidad de las células competentes para cambiar su ruta de diferenciación a fin de convertirse en embriones somáticos (Williams y Maheswaran 1986).

La embriogénesis somática en cacao fue descrita inicialmente por Esan (1977) y luego por Pence *et al.* (1979). Sin embargo, al igual que en otras técnicas, este cultivo se ha

comportado como recalcitrante por los bajos niveles de respuesta que se ha logrado y por la variabilidad de la misma en cuanto a los diferentes genotipos. El uso de esta metodología para la propagación seguirá aumentando según hayan protocolos más avanzados y refinados, capaces de producir embriones morfológicamente normales, sin variación somaclonal y con capacidad para germinar y convertirse en plantas en forma rápida y eficaz (Parrot, 2002).

1.1 Justificación

Desde el punto de vista del mejoramiento genético del cacao y debido a la alta heterocigocis de esta especie, la propagación de este cultivo debe ser asexual para optimizar la explotación de los beneficios directos de un genotipo seleccionado que responda a los requerimientos de resistencia a plagas, altos rendimientos y alta calidad chocolatera. Los métodos de multiplicación vegetativa actualmente utilizados, como el injerto y el enraizamiento de estacas, han sido la fuente proveedora de material vegetal para el establecimiento y renovación de plantaciones; sin embargo, estas técnicas han sido limitantes para la distribución del material élite entre países. Por lo tanto se considera necesario el desarrollo y aplicación práctica de sistemas rápidos y altamente eficientes de propagación vegetativa que faciliten los procedimientos cuarentenarios entre países (López-Baez *et al.* 2000b).

El desarrollo de una metodología eficiente de propagación vegetativa (asexual) como la embriogénesis somática, en el caso particular del CATIE, se convertiría en una poderosa herramienta para la multiplicación clonal y la conservación del material élite del programa de mejoramiento genético. A la vez facilitaría el intercambio internacional de material genético libre de enfermedades, el cual es un tema de prioridad regional, principalmente con la aparición de la moniliasis en nuevas áreas. Asimismo, estas acciones permitirían reducir el problema de suministro de semilla vegetativa para el establecimiento y renovación de plantaciones con materiales de alta calidad.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 General

Inducir la embriogénesis somática de cacao a partir de explantes florales de siete clones superiores seleccionados en el Programa de Mejoramiento Genético del CATIE.

1.2.2 Específicos

- ✦ Inducir la embriogénesis somática en los clones CC-137, EET-183, ICS-95, UF-273, CATIE R4, CATIE R6 y CATIE R7, mediante la comparación de los protocolos desarrollados por Penn State University y el Centro de Investigación de la Nestlé en Tours, Francia.
- ✦ Evaluar la respuesta embriogénica del cultivo de pétalos y estaminoides en cada clon.
- ✦ Evaluar las respuestas embriogénicas de los clones CATIE R4 y CATIE R6 injertadas sobre dos patrones diferentes (IMC 67 y UF613).
- ✦ Estudiar diferentes condiciones de cultivo *in vitro* para obtener el mayor éxito en la producción y desarrollo de embriones somáticos para cada clon.
- ✦ Evaluar la sobrevivencia de las plantas en condiciones de aclimatación.

1.3 Hipótesis

- ✦ Existe diferente respuesta en la formación de embriones para los clones CC-137, EET-183, ICS-95, UF-273, CATIE R4, CATIE R6 y CATIE R7 a diferentes medios de cultivo, portainjertos y tipos de explante.
- ✦ Existe diferente respuesta en la conversión en planta al utilizar medios de cultivo y tamaño de embriones diferentes.
- ✦ Existe diferente respuesta en la conversión en planta al utilizar medios de cultivo líquido y sólido.
- ✦ Existe diferente respuesta a la aclimatación al utilizar dos tipos de sustrato diferentes.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Origen e historia del cacao

El género *Theobroma cacao* fue descrito por Linnaeus, y junto con los géneros *Herrania*, *Guazuma* y *Cola* forman parte de la familia Malvaceae (Angiosperm Phylogeny Group 2003). La especie *Theobroma cacao* es una de las dos especies del género *Theobroma* - compuesto por treinta especies- que es utilizada comercialmente, aunque las otras especies son empleadas ocasionalmente como adulterantes (Toxopeus 1985, Hardy 1961).

Los Aztecas creían que el árbol de cacao era de origen divino y que la bebida hecha con sus semillas confería sabiduría y discreción, quizás por esta razón Linnaeus nombró a este género como *Theobroma* que significa “Alimento de los Dioses” (Hardy 1961).

Se mencionan dos posibles centros de origen de la especie, por una parte se señala a México y Centroamérica (Hardy 1961; Patiño 1958) y por otra a la Cuenca del Amazonas (Cheesman 1944; Wood 1985). Sin embargo; estudios más recientes (Lanaud *et al.* 2000) confirman que efectivamente la región alta del Amazonas, una zona que comprende territorios de Perú, Colombia y Ecuador es el lugar donde se encuentra la mayor diversidad genética del cacao, por lo tanto se considera como su centro de origen.

El cacao ha sido cultivado desde hace siglos en América y uno de los principales centros de domesticación del cultivo fue México, donde los Toltecas y los Aztecas lo cultivaban desde mucho antes del descubrimiento de América (Hardy 1961). Los Mayas también lo cultivaron en México y Guatemala. El cacao usado en el siglo XVI por los Aztecas y Mayas en muchas áreas de México y Centroamérica era el tipo Criollo y no hay evidencia de que se plantara el tipo Forastero, antes que los españoles empezaran a difundir el cultivo (Wood 1985, Lass y Wood 1985).

Cuando Hernán Cortez descubrió México en el siglo XVI encontró que los granos del cacao eran usados para elaborar una bebida llamada “chocolatl” que se preparaba tostando los granos y mezclándolos con maíz, vainilla y chile (Hardy 1961). Los granos de cacao no sólo se utilizaban para preparar la bebida, también se usaron como moneda, como pago de tributo a los Aztecas y en diversos usos rituales y medicinales (Wood 1985).

Hernán Cortez, introdujo la bebida en la realeza española, pero la bebida amarga no se hizo popular sino hasta cien años después, cuando los aditivos como el azúcar, la canela y el chile pimienta hicieron a la bebida más sabrosa. El chocolate fue la primer bebida ligeramente estimulante introducida en Europa, incluso antes del café y té (Lass y Wood 1985).

A inicios del siglo XVII se fue introduciendo la costumbre de tomar chocolate en la corte de Francia, donde se instauró la costumbre del chocolate líquido, a diferencia de España donde se tomaba chocolate espeso. Así se extendió su consumo por toda Europa, donde se abrieron salones en las principales ciudades y beber chocolate se convirtió en un signo de distinción y elegancia (Wood 1985).

A finales del siglo XVIII, el chocolate se empieza a preparar con leche y azúcar, y las damas francesas ponen de moda los "bon bon", trocitos de chocolate para degustar a cualquier hora. Es solamente a partir de inicios del siglo XIX cuando se empieza a fabricar el chocolate en forma de tabletas, tal y como lo conocemos hoy en día. Los españoles, portugueses y holandeses, se pueden considerar como los principales promotores de la expansión del cacao en el mundo. En la actualidad el cacao se cultiva, aparte de los países americanos, en Costa de Marfil, Ghana, Camerún, Togo, Malasia y otros de la franja tropical, habiéndose convertido en un cultivo verdaderamente popular (Wood 1985, Wood y Lass 1985).

2.2 Importancia económica y social del cultivo

El cacao es un cultivo estrictamente tropical, pero se elabora y consume más en regiones templadas. Su uso principal como bebida estimulante por su contenido de teobromina y trazas de cafeína, se ha cambiado a su consumo como alimento energético (chocolates). La grasa es un subproducto importante en la preparación de cosméticos y productos farmacéuticos (León 2000).

Hoy en día, más de 20 millones de personas de todo el planeta dependen directamente del cultivo del cacao para subsistir. Prácticamente el 90% de la producción de cacao procede de minifundios de superficie inferior a 5 hectáreas. Otro de los retos a los que se enfrenta el cultivo de cacao es la escasez cada vez mayor de áreas de cultivo adecuadas. El incremento en la producción mundial de 1,5 millones de toneladas en 1984 a

2,7 millones en 1998 se debió casi exclusivamente al aumento de la superficie destinada a este producto, mientras que la productividad se mantuvo deficiente (EUFIC 2005). Cada año, en el trópico húmedo, se producen más de tres millones de toneladas métricas de cacao para ser consumidas en los países desarrollados. El cacao es el principal cultivo de millones de agricultores. A diferencia de otros cultivos, tales como café y banano, se estima que el 70% de la producción de cacao proviene de pequeños agricultores que trabajan menos de dos hectáreas de tierra (ICCO 2005a).

La producción mundial de cacao en grano se incrementó en 2005/06 para situarse en un récord histórico de 3,6 millones de toneladas, un aumento de más del 6% respecto al año cacaotero 2004/05. La producción se vio favorecida por cierta mejora de las condiciones de crecimiento en Costa de Marfil y Ghana, que juntos representaron alrededor del 60% de la producción mundial. La producción de cacao en Costa de Marfil, pese a los disturbios políticos y sociales en el país se incrementó en un 8% respecto al año anterior, para situarse en 1.390.000 toneladas en 2005/06, nivel sólo ligeramente inferior a la cifra récord de 1.410.000 toneladas registrada en 2003/04. La subida progresiva de los precios al productor y los programas de rehabilitación patrocinados por el Gobierno, han fomentado la producción cacaotera en Ghana, donde la producción se ha aumentado en un 24%, alcanzando así su nivel más elevado de la historia, de 740.000 toneladas en 2005/06 (ICCO 2007).

En Latinoamérica, en el período 2005/06, la actividad cacaotera alcanza una producción total de 447.000 toneladas métricas producidas en 1.35 millones de hectáreas que principalmente están en manos de pequeños agricultores (ICCO 2007).

En el pasado, el chocolate ha sido apreciado como un alimento de alta caloría para aumentar la energía, por ejemplo para atletas y soldados. Recientemente, cada vez más la investigación ha sido conducida sobre la salud y los atributos alimenticios del cacao y el chocolate (ICCO 2005b). Las conclusiones de investigación indican que algunos componentes en el cacao ayudan a prevenir la enfermedad cardiovascular y reducir el riesgo de cáncer. Estas conclusiones positivas a menudo parecen, sin embargo, ser ensombrecidas por la culpa del chocolate como causante de obesidad. La gente fácilmente clasifica el chocolate como "comida basura" debido a su alto contenido calórico. Sin embargo, las investigaciones evidencian sobre los beneficios cardiovasculares del cacao.

Estos beneficios son porque las semillas de cacao contienen un número grande de fitoquímicos. Estos son compuestos fisiológicamente activos encontrados en plantas, por ejemplo uvas, manzana, té, frutas, verduras, etc. Un grupo de estos compuestos son llamados flavonoides. Ellos son antioxidantes poderosos y como se cree, ayudan a las células del cuerpo a oponerse al daño por radicales libres, que son formados por numerosos procesos incluyendo cuando las células del cuerpo utilizan el oxígeno para la energía (Ding 2006). Estudios de laboratorio y humanos han indicado que los flavonoides del cacao puede inhibir la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL-Colesterol) asociado con problemas cardíacos. De allí también surgen evidencias que sugieren que el cacao y el chocolate puedan ser capaces de contribuir a la reducción del riesgo de los ciertos tipos de cáncer (Ariefdjohan *et al.* 2005).

2.3 Botánica del cacao

2.3.1 Generalidades del cultivo

El cacao es una especie tropical perteneciente a la familia Malvaceae. *Theobroma cacao* es una especie diploide con un número de cromosomas de 20, y ha sido subdividida en 2 subespecies:

- *Theobroma cacao* spp. *cacao* Consiste de poblaciones criollas de Centro y Suramérica.
- *Theobroma cacao* ssp. *sphaerocarpum* Incluye todas las otras poblaciones (Toxopeus 1985).

Es una planta que prospera bien bajo sombra; sin embargo necesita condiciones especiales de luminosidad, temperatura y provisión de agua (Arévalo *et al.* 2004). Según Murray (1985) en su ambiente nativo el árbol de cacao está expuesto a una temperatura media anual elevada, con pocas oscilaciones, una precipitación anual abundante con un período corto de sequía y una baja intensidad lumínica. En esas condiciones sobrevive pero su rendimiento es bajo.

Cuando se define un clima apropiado para este cultivo, generalmente se hace referencia a la temperatura y la precipitación, considerados como los factores críticos del crecimiento. Así mismo, el viento, la radiación solar y la humedad relativa afectan muchos procesos fisiológicos de la planta. La precipitación óptima para el cacao es de 1,600 a 2,500

mm distribuidos durante todo el año. Precipitaciones que excedan los 2,600 mm pueden afectar la producción del cultivo. La temperatura es un factor de mucha importancia debido a su relación con el desarrollo, floración y fructificación del cultivo de cacao. La temperatura media anual debe ser alrededor de los 25°C. El efecto de temperaturas bajas se manifiesta en una reducción en la velocidad de crecimiento vegetativo, desarrollo de fruto y en la intensidad de la floración (menor intensidad). Así mismo, controla la actividad de las raíces y de los brotes de la planta (PROAMAZONÍA, 2004).

El árbol alcanza una altura de 6 a 8 metros con excepción del cacao Nacional de Ecuador y del amelonado de África occidental que puede alcanzar una altura de hasta 12 metros (Hardy 1961). Geográficamente las mayores áreas cacaoteras en el mundo están concentradas entre los 10° de latitud Norte y al Sur del Ecuador, distribuidas en el Oeste africano, América Latina y Sureste de Asia (Arévalo *et al.* 2004).

El cacao es un árbol que presenta un marcado dimorfismo de ramas. En una planta que proviene de semilla hay un solo eje vertical, que al alcanzar de 1 a 1.5 m de altura detiene el crecimiento apical y emite en la parte superior de 3 a 5 ramas laterales. Estas brotan de yemas tan juntas que pareciera que salen del mismo plano y forman una “horqueta”, cuando en realidad corresponden a nudos distintos, cuyo nivel de separación es muy corto. Para continuar el crecimiento vertical brota debajo de la horqueta una yema, rara vez dos o tres, que se desarrolla en otro tallo ortotrópico a cuyo extremo se detiene de nuevo el crecimiento apical; se forma así otro piso y continúa así el proceso (León 2000).

Este hábito de ramificación tiene importancia en la producción de plantas por estacas. Debido a que por lo común los chupones adecuados para estacas son pocos en relación con los abanicos, la mayoría de las estacas se toman de las ramas de estos últimos y su crecimiento posterior con ramificación baja, es muy diferente al que se presenta en una planta procedente de semilla. Sin embargo, en una etapa posterior, una estaca de abanico puede producir un chupón en su base y algunos cultivadores dejan que se desarrolle a costa de la parte de abanico del nuevo árbol; de esta manera es posible obtener de una estaca de abanico un árbol con crecimiento de tipo erecto (Hardy 1961).

Debido a que el explante a utilizar para la micropropagación asexual de los clones son las flores a continuación se dará énfasis a esta parte de la planta.

2.3.2 Biología de la floración

Cuando las condiciones de temperatura y humedad son favorables hay floración durante casi todo el año. Sin embargo, hay períodos de floración máxima y mínima fácilmente distinguibles, pero se carece de información precisa acerca de los factores que controlan la periodicidad de la floración (Hardy 1961).

Según León (2000) del gran número de flores que produce el cacao menos del 5% es fecundado y llega a dar fruto, debido básicamente a dos factores: Primero, es muy frecuente que la planta sea incompatible y por lo tanto necesite de polen extraño para su fecundación; segundo, los mecanismos de polinización son poco eficientes. Esto último depende de los agentes de transmisión de polen, la estructura de su flor y su biología.

La polinización se efectúa únicamente por medio de insectos. Según datos provenientes de investigaciones sobre cruzamientos, la estructura de la flor es tal que solamente ciertos insectos pueden polinizarla de forma efectiva, y la mayoría son pequeños mosquitos, comenzando por ciertos géneros de la familia Ceratopogonidae. Solamente una pequeña porción de las flores son polinizadas e inician el desarrollo en frutos (Lass y Wood 1975).

Si una flor no es polinizada se cae en el transcurso de 24 horas y una característica notable de la planta en ciertas épocas es la gran pérdida de flores. Un árbol completamente desarrollado puede producir en un año más de 10.000 flores, de las cuales solo de 10 a 150 llegan a producir frutos maduros (Wood 1985).

Las flores se comienzan a abrir por la tarde y en las primeras horas de la mañana siguiente emiten polen y presentan estilos receptivos, pero la estructura de la flor parece impedir la autopolinización, pues las anteras recurvadas hacia fuera están rodeadas por las conchas de los pétalos y separadas del pistilo por los estaminoides (León 2000).

Según Wood (1985) la estructura de la flor y la adhesividad del polen excluyen la posibilidad de lograr la polinización por el viento; la falta de aroma o néctar y la estructura de la flor, con las anteras ocultas en los pétalos embolsados y el anillo de estaminoides que dificultan el acceso a los estigmas, no son características que faciliten la polinización mediante insectos. Sin embargo, los ácaros son atraídos al tejido carnoso y de color púrpura que forman los estaminoides y a las “líneas de guía” de las conchas de los pétalos de los cuales se alimentan.

El mecanismo de incompatibilidad presente en el cacao hace que en ciertas plantas el polen forme el tubo polínico pero sin llegar a fecundar los óvulos; esta incompatibilidad puede ser total o parcial. Los tipos de cacao Trinitarios son en su mayoría autoincompatibles, pero se fecundan con polen de árboles compatibles. Los cacaos Amazónicos son también autoincompatibles en su área de origen, pero conforme se alejan de ella, disminuye el grado de incompatibilidad. Estas diferencias hacen necesario tener en una plantación, árboles con distintas clases de compatibilidad (León 2000).

2.3.3 Inflorescencia

Las flores del cacao se forman directamente del tronco principal y de las ramas laterales, a este rasgo se denomina caulifloria. Los cojines florales ocupan posiciones axilares a las hojas (Hardy 1961). En los troncos, y por la distorsión debida al crecimiento, no es posible situar los cojines según la filotaxia pero se ha probado que tienen una distribución en espirales siguiendo el orden de $3/8$. En las ramas jóvenes, aparecen una vez que han caído y es más fácil determinar su carácter axilar (León 2000).

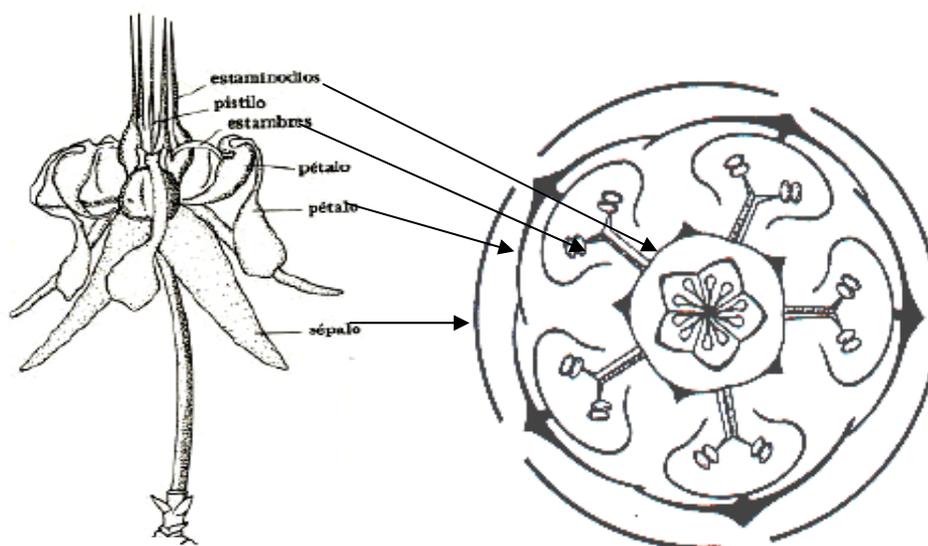
La inflorescencia es una cima dicasiforme, pero las ramas de la cima están muy reducidas o comprimidas en una estructura corta en forma de tallo. Con el transcurso del tiempo, en el sitio de origen de la inflorescencia se produce un engrosamiento secundario para formar el llamado “cojín”. Un cojín bien desarrollado puede contener un gran número de flores a la vez (Wood 1985).

El cojín consiste en una base ancha, que es una ramilla de entrenudos acortados considerablemente, con los nudos marcados por brácteas pequeñas y caedizas. Se divide en el ápice en dos ramas, una de las cuales termina en dos pedicelos florales y la otra no se desarrolla. Con frecuencia una de las flores crece más rápido que la otra y pareciera que la segunda fuera una rama de la primera. La inflorescencia es pues un dicasio y el cojín una ramilla de entrenudos acortados (León 2000).

La base de un cojín floral es tan retorcida que gran parte del tejido, que de otra manera se desprendería y caería, queda apresado contribuyendo a que se forme una especie de nido apropiado para innumerables insectos diminutos. Los entrenudos que soportan las flores tienen estípulas verdes las cuales son particularmente conspicuas cuando se desarrolla la enfermedad denominada “Buba de los puntos verdes” (Hardy 1961).

2.3.4 Estructura de la flor

La mayoría de los autores (Hardy 1961, Lass y Wood 1975, Wood 1985, León 2000) coinciden con la descripción de las partes de la flor (Fig.1). Ellos mencionan que la flor del cacao es de ovario súpero con 5 lóculos, tiene un pedicelo largo que varía de 1,3 a 3,0 cm. El cáliz tiene 5 pequeños sépalos carnosos de color rosado o blanco, de 7 a 11 mm de largo, pubescentes, que en la flor abierta se expanden formando ángulo recto con el pecíolo. La corola consiste de 5 pétalos blancos de 6 a 8 mm de largo que alternan con los sépalos formando una envoltura característica. La base de cada pétalo es cóncava, de color rosado, y alberga una antera; la parte superior del pétalo consiste de una conexión angosta en la base y termina en una expansión rectangular amarilla que se dobla hacia fuera y hacia atrás.



Fuente: Toxopeus (1985)

Figura 1. Estructura de las partes de la flor de cacao.

El centro de la flor lo ocupa el tubo estaminal, compuesto por 5 estambres fértiles, cortos, doblados hacia fuera, cada uno encerrado en la concha de un pétalo y 5 estaminoides internos, agudos y largos de posición erecta de color pardo que terminan en 3 aristas punteadas. Los estaminoides forman un cilindro que rodea y protege el estilo. Los estambres fértiles tienen 2 anteras con 2 sacos polínicos cada una, los granos de polen son pequeños, con un diámetro de 20 micrones, son binucleares y cada uno tiene 3 poros. El ovario es un cuerpo ovoide, súpero, con 5 celdas, tiene placenta central en la cual hay de 30

a 50 óvulos adheridos. El estilo es tubular, cilíndrico y blanco, de 2 a 3 mm de largo y está constituido de 5 partes fusionadas, excepto en sus extremos en donde forma el estigma.

2.4 Enfermedades

En la mayoría de los países productores de cacao uno de los factores mayormente responsables de los bajos rendimientos es la falta de control de las enfermedades más destructivas; tales como, la moniliasis (*Moniliophthora roreri*), la escoba de bruja (*Moniliophthora perniciosa*) y la mazorca negra (*Phytophthora sp.*). En los últimos 15 años la rápida diseminación de estas tres enfermedades unido a los precios inestables, ha reducido la producción del cacao en Centro y Suramérica y las islas caribeñas cercanas en más de un 75% (Saunders *et al.* 2000).

2.4.1 Moniliasis

La moniliasis es causada por el hongo *Moniliophthora roreri* y es una de las enfermedades más importantes del cacao en América Latina, se caracteriza por atacar los frutos en cualquier estado de desarrollo (Arévalo *et al.* 2004).

En los frutos pequeños la enfermedad se manifiesta mediante un secamiento prematuro o por varios abultamientos en los cuales aparecen unas manchas de color café sobre la zona deformada, posteriormente estas lesiones se unen cubriendo toda la mazorca y 8 días después aparece el micelio del hongo en forma de un polvo blanquecino parecido a la escarcha que cubre la mazorca, de ahí su nombre en inglés “Frosty pod” (Moreno *et al.* 1983; Lass 1985).

Según Hardy (1961) y Moreno *et al.* (1983) los factores que favorecen la incidencia de la enfermedad son las lluvias abundantes y frecuentes, la alta humedad relativa y alta temperatura.

A la moniliasis se le considera uno de los factores limitantes de mayor importancia en la producción de cacao y desde su aparición en Colombia en el siglo XIX (Phillips-Mora 2003) se ha extendido por toda Mesoamérica hasta llegar a México en 2005 (Phillips-Mora *et al.* 2006). Esta enfermedad ha causado serios daños económicos en los principales países productores de América; por ejemplo, en Ecuador se reportan pérdidas desde 16 hasta 57%

y en algunos casos provocó el abandono de plantaciones infectadas (Hardy 1961). En Colombia, Moreno *et al.* (1983) mencionan destrucción de hasta un 95% de la producción.

En una investigación reciente (Aime y Phillips-Mora 2005) se secuenció varios genes de las dos enfermedades más devastadoras, como son la escoba de bruja y la moniliasis y se logró determinar que los hongos causantes de estas enfermedades forman un solo grupo dentro del orden Agaricales denominado *Moniliophthora*.

2.4.2 Escoba de Bruja

Esta enfermedad es causada por el hongo *Moniliophthora perniciosa* y después de la moniliasis es la más devastadora. La enfermedad se reconoció por primera vez en Surinam en 1895 y poco tiempo después en la Guyana Británica. En Ecuador se registró en 1922, en Trinidad en 1928, en Colombia en 1929, en Tobago en 1939 y en Granada en 1948 (Barros 1981).

Se sabe que infecta brotes, cojines florales y frutos, la infección de brotes causa deformaciones que aparentan escobas vegetativas. La infección en inflorescencias puede ocurrir en flores individuales o puede destruir todo el cojín floral. Los cojines florales infectados también producen escobas vegetativas. Los síntomas varían de acuerdo al estado de las vainas, en los frutos aparecen manchas café oscuro o negras de forma circular y se vuelven muy duras en la parte infectada (Andebrhan 1986, Moreno *et al.* 1983).

Bajo condiciones extremas la infección de las mazorcas y de los cojines florales puede resultar en una pérdida hasta del 50% de la cosecha. Además puede darse infección del tejido vegetativo, dando lugar a un crecimiento en forma de escoba y una pérdida considerable de follaje. Esto tiende a incrementar las pérdidas de frutos, dificultando la evaluación del daño total. La enfermedad no causa la muerte de los árboles, excepto en las plantas jóvenes que pueden morir a consecuencia de la destrucción de sus puntos de crecimiento. Sin embargo, la enfermedad debilita considerablemente los árboles adultos (Hardy, 1961).

En 1989 la enfermedad de escoba de bruja se identificó en Bahía, principal región cacaotera del Brasil. En menos de 10 años, del periodo 1987-1988 la producción bajó de 383,000 toneladas a 150,000 toneladas para el período 2002–2003. Por consiguiente, Brasil

después de ser el tercer país productor mundial de cacao pasó a ser el quinto (Kilaru y Hasenstein, 2005).

2.4.3 Mazorca Negra

Esta enfermedad es también conocida como podredumbre negra. El agente causal en la mayoría de los países, incluido Costa Rica es *Phytophthora palmivora* y se le considera un problema económicamente serio (Evans y Prior 1987, MAG 1991). A diferencia de las dos anteriores, esta enfermedad se encuentra también fuera del continente americano, ya que ha sido reportada en varios países de África (Wood 1985). Se mencionan otras especies de *Phytophthora*, por ejemplo, en Guinea, Gabón y Malasia se encontró *P. megakarya*; en México, Guatemala y El Salvador se detectó *P. capsici*; en Brazil la especie más común es *Phytophthora citrophthora* (Kellam y Zentmyer 1986, Lass 1985).

Esta enfermedad ataca los cojines florales, los frutos y el tronco, produciendo manchas pardas de contornos uniformes sobre la superficie del fruto. En el tronco y las ramas causa un cáncer rojo, en los brotes y chupones se produce un marchitamiento y en las hojas se forman manchas color café oscuro en los extremos (Moreno *et al.* 1983, Soberanis *et al.* 1999).

Según Arévalo *et al.* (2004) la principal consecuencia se da cuando los frutos son atacados. Se ha observado que la incidencia varía entre 10 y 95%, dependiendo de la humedad del sitio (Wood 1985).

2.5 Diversidad genética

La diversidad genética de las poblaciones cultivadas de cacao es tan amplia que antes se consideraba que incluía tres especies distintas: *Theobroma cacao* que agrupa a los Criollos, *Theobroma pentagona* llamados Lagarto y *Theobroma leiocarpa* conocidos como Calabacillo (León 2000). Además existen otras especies que no se cultivan en áreas grandes pero que tienen valor por el uso doméstico que se les asigna en algunos países o regiones. Así tenemos, *T. bicolor*, conocida desde Brasil hasta el Sur de México; *T. angustifolium*, cultivada en Centroamérica y el Sur de México; *T. grandiflorum*, plantada en Brasil en los estados de Pará y Maranhao; *T. gileri*, que se encuentra en estado silvestre en el Occidente de Colombia y al Norte de Ecuador (Moreno 1983).

La clasificación del cacao con valor comercial más aceptada es la de Cheesman (1944) aunque él reconoce la dificultad de aplicar el término de variedad y prefirió hablar de poblaciones, sugiriendo la siguiente terminología:

- Criollos Centroamericanos (*T. cacao* subsp. *cacao*)
- Forasteros Amazónicos (*T. cacao* subsp. *sphaerocarpum*)
- Trinitarios (Híbridos de los dos grupos anteriores)

2.5.1 Criollos

El centro de origen de este grupo es el Alto Amazonas. Los Criollos fueron probablemente domesticados por los Mayas y podrían subdividirse en dos grupos:

- Criollos Centroamericanos
- Criollos Suramericanos (Wood 1985)

Según Moreno *et al.* (1983) los Criollos se caracterizan por ser un árbol relativamente alto con ramas que forman ángulo muy agudo hacia arriba; los frutos son grandes y alargados, con cáscara rugosa, delgada y suave, con diez surcos bien marcados. Generalmente el extremo inferior del fruto es puntiagudo y a veces torcido. El color del fruto es verde o rojo antes de madurar. Cada mazorca puede contener entre 20 y 30 semillas de color crema o violeta y son más gruesas que las de los demás cacaos. A pesar de que se considera que este tipo de cacao es el que da el chocolate de mejor calidad a nivel mundial, hoy en día casi no se cultiva, quizás esto se debe a que son poco vigorosos, poco productivos, susceptible a enfermedades y se desarrollan muy lento (Toxopeus 1985, Wood 1985).

A este grupo pertenecen los cacaos criollos de México, el “Cacao Real” de Nicaragua, el “Porcelana” de Venezuela, el “Común” o “Real” de Colombia, el “Lagarto” y “Pentagona” de Centroamérica (Moreno *et al.* 1983).

2.5.2 Forasteros

Este grupo tiene su origen en el Amazonas e incluye poblaciones silvestres, semisilvestres y cultivadas. Estos se caracterizan por sus mazorcas verdes que al madurar se tornan amarillas, su cáscara es lisa y extremadamente dura, cada mazorca tiene más de 30 semillas de color violeta oscuro o púrpura de forma aplastada (Toxopeus 1985).

A este grupo pertenecen los cacaos de Brasil (“Común”, “Pará”, “Maranhao”, “Almeida” y “Catongo”), Costa Rica (“Matina”), México y Guatemala (“Ceilán”), Colombia (“Pajarito”), Venezuela (“Forastero” de Barlovento y “Camacita”), Ecuador (“Nacional” o “Arriba”) y Brasil y el este de África (“Amelonado”), éste último es el tipo de cacao más extensamente sembrado (Moreno *et al.* 1983), debido posiblemente a que son árboles muy vigorosos y poseen resistencia a varias enfermedades (Lanaud *et al.* 2000).

2.5.3 Trinitarios

Este grupo es el resultado del cruzamiento natural entre los tipos Criollos y Forasteros (Wood 1985). Según Toxopeus (1985) los Trinitarios tienen características intermedias entre estos grupos, y no se encuentran en estado silvestre, el primer cruce que fue encontrado en Trinidad dio árboles muy vigorosos, productivos y resistentes, estas características continuaron por unas pocas generaciones, pero en generaciones posteriores el vigor declinó.

La diversidad del Trinitario fue estudiada por Motamayor *et al.* (2000) mediante la utilización de marcadores moleculares y determinaron que la mayoría de los Trinitarios (p. ej. UF, ICS, UIT) son muy heterocigotos, lo cual coincide con el origen del híbrido; sin embargo, hay algunas otras poblaciones que muestran un alto grado de homocigocidad, debido posiblemente a un aislamiento geográfico.

2.6 Mejoramiento genético

Las introducciones sucesivas de cacaos Forasteros y Trinitarios en los cacaotales han ocasionado una gran variabilidad genética en las plantaciones colocando en riesgo de desaparición a los genotipos Criollos menos vigorosos y productivos y más sensibles a enfermedades. Varios cientos de años de cruzamientos espontáneos con la intervención más reciente del mejoramiento genético dirigido hacia el aumento de la productividad y no hacia el mantenimiento de la calidad, fueron la base de esta problemática (FONCACAO 1994).

El cacao es un cultivo relevante para miles de pequeños productores alrededor del mundo; sin embargo, ha sido muy afectado por el grave impacto que han tenido las enfermedades fungosas en su producción, las cuales según Taylor (1998) han llegado a

generar pérdidas de 810.000 toneladas, por un valor económico de 761.000.000 de dólares. Para reducir las pérdidas los agricultores han recorrido al control químico; sin embargo, esta práctica no es muy recomendada por los altos costos y el riesgo asociado de contaminación de las semillas, ambiental y humano (Bowers y Bailey 2004).

Por tal motivo es que una de las formas de control más apropiada sería el uso de genotipos resistentes; sin embargo, según Arévalo *et al.* (2004) hasta el momento no se ha conocido genotipos de cacao con resistencia a las tres principales enfermedades del cacao, (moniliasis, escoba de bruja y mazorca negra); no obstante, existen clones con diferentes grados de tolerancia que podrían utilizarse en un plan de mejoramiento genético (Rondón 2000, Phillips-Mora *et al.* 2005, Surujdeo-Maharaj *et al.* 2001).

En este sentido hay algunos países que están realizando esfuerzos en mejoramiento genético, tal es el caso de Costa Rica, Colombia, y Ecuador; ellos están seleccionando genotipos resistentes o tolerantes a *M. royeri* y distribuyendo nuevos clones a los agricultores (Bowers y Bailey 2004).

En Costa Rica desde 1996 el Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE) inició un proyecto de mejoramiento genético del cacao cuyo objetivo es la selección de híbridos y clones de alta productividad y resistencia a enfermedades (Phillips-Mora, 1996).

Después de evaluar por varios años el desempeño de los materiales se ha demostrado que la utilización de genotipos que combinan características deseables como la alta producción y la resistencia a enfermedades, pueden reducir significativamente la incidencia de la enfermedad e incrementar los rendimientos. Así, en la costa Atlántica de Costa Rica bajo una alta presión de inóculo natural de *M. royeri* se observó que clones con una moderada resistencia al hongo como CC-137 y EET 183 registraron incidencias menores al 45% y una producción (promedio de 7 años) de 998 kg/ha respectivamente, en tanto que clones internacionalmente difundidos como Pound-7, UF-613 y Catongo tuvieron una incidencia superior al 84% y producciones que no superaron los 178 kg/ha (Astorga 2001, Phillips-Mora *et al.* 2005). En estudios recientes se ha podido determinar que uno de los clones, el ICS-95 mostró resistencia a 7 aislamientos genéticamente diversos de Colombia y logró alcanzar una excelente producción de 60 mazorcas por árbol por año (Phillips-Mora *et al.* 2005).

El mejoramiento genético orientado a minimizar el impacto de las enfermedades puede ser una de las estrategias más seguras para reducir pérdidas en el campo, esta forma de resistencia es menos vulnerable a cambios adaptables por los patógenos. Por ejemplo en Ecuador, las pérdidas por *M. royeri* fueron más bajas en los árboles con una alta proporción de frutos totales a la madurez durante los meses posteriores a la estación seca o la estación húmeda temprana, evitando así condiciones que favorezcan el desarrollo de la enfermedad (Evans *et al.* 1977).

Dada la situación actual, es obvio que cualquier esfuerzo por reducir las pérdidas provocadas por las enfermedades sería un logro significativo. Pero no solamente las enfermedades son un factor limitante de la producción de cacao; por ejemplo, Espinal *et al.* (2005) consideran que las variables que explican la disminución de la producción en Colombia están sustentadas en los menores rendimientos por hectárea y la disminución del área sembrada, que a su vez son el resultado del envejecimiento de los cultivos, debido a la falta de renovación, la ausencia de mejoramiento genético, la presencia creciente de enfermedades que atacan los cultivos y la falta de capacitación del capital humano que permita una mayor transferencia de tecnología.

En años recientes se han iniciado proyectos con el fin de identificar, por diferentes medios, materiales de mejor calidad agronómica, con el fin de promover el aumento de su frecuencia, al mismo tiempo que se introducen tecnologías de manejo agronómico con fines de disminuir los efectos de los factores que puedan estar incidiendo negativamente en la producción por unidad de área y total (Saunders *et al.* 2000, Lanaud 2000, Ahnert 2000, Lanaud *et al.* 2000).

La única forma de producir árboles de alta calidad uniforme es por la propagación vegetativa la cual reproduce exactamente las características del árbol paternal. Un número de métodos de propagación vegetativa han sido desarrollados; tales como, injertos, enraizamiento de estacas, acodos y cultivo de tejidos (Bowers y Bailey 2004).

Para el cacao, el uso del cultivo de tejidos podría tener muchas ventajas, ya que, es un método seguro para distribuir material genético entre países. También el cultivo de meristemas podría proporcionar plantas libres de virus y otras enfermedades. Además, permitiría el aumento rápido de padres recientemente seleccionados para jardines semilleros o de descendencia para los semilleros de injerto (Wood 1985).

2.7 Métodos de propagación del cacao

2.7.1 Propagación sexual

El cacao ha sido propagado comúnmente por semilla debido a que es la manera más sencilla y barata. Es la forma más antigua y común para el establecimiento de plantaciones de cacao pero se obtiene una gran variabilidad de árboles, por lo que no se recomienda su utilización salvo cuando se utilicen semillas de elevada calidad. En los últimos años se han recomendado la siembra de semilla certificada, debido al buen comportamiento de los árboles provenientes de semilla de polinización controlada, usando clones seleccionados. La semilla híbrida se produce mediante la polinización en forma controlada de las flores de los clones seleccionados. Los híbridos producidos de esta manera, han mostrado una gran precocidad en la fructificación y un desarrollo vigoroso de las plantas (Wood y Lass 1985, Moreno 1983, Hardy 1961).

2.7.2 Propagación asexual

La propagación asexual o vegetativa juega un rol importante para reproducir con fidelidad las características deseables de un árbol o grupo de árboles seleccionados.

En el caso del cacao, especie perenne, alógama y con un ciclo de mejoramiento considerablemente largo (15 años), la propagación vegetativa se practica tradicionalmente mediante el enraizado de ramas y el injerto de yemas. Sin embargo, ambas técnicas presentan eficiencia variable, requieren de jardines clonales para producir suficiente material para la propagación y usualmente un alto costo por planta obtenida, por lo que su utilización es muy limitada. Como resultado de programas de mejoramiento genético desarrollados en diversos centros de investigación del mundo, existe una cantidad considerable de genotipos mejorados; sin embargo, una de las mayores limitantes para aprovechar este germoplasma es la falta de métodos de clonación masiva de las plantas seleccionadas, eficientes tanto desde el punto de vista económico como agronómico (López-Baez *et al.* 2000a, Astorga 2001).

2.7.2.1 Propagación por injertos

La propagación del cacao por injerto, tiene la finalidad de multiplicar árboles con buenas características para conservar fielmente esas características (Moreno *et al.* 1983)

El injerto del cacao debe realizarse en patrones vigorosos y sanos obtenidos de semilla, desarrollados en recipientes o en el campo. Los árboles más viejos se pueden injertar, siempre que los injertos se hagan en varetas jóvenes ya presentes o en brotes que se producen después de que las plantas han sido podadas hasta una altura de 30 a 50 cm. (Wood 1985).

Los tipos de injerto más comunes son los de púa central, púa lateral y parche. La selección del método obedece a criterios de costo y la disposición de asumirlos (Adriazola 2003). El Instituto de Cultivos Tropicales del Perú recomienda el uso del injerto tipo púa lateral o central con sus innovaciones, por haber demostrado mayor prendimiento en el campo, por su facilidad de ejecución y disponibilidad del material vegetativo, por cuanto puede utilizarse brotes terminales e incluso tejidos maduros (ICT 2003).

En CATIE desde hace varios años se ha venido trabajando con éxito la propagación vegetativa vía injerto. El tipo de injerto utilizado es el de parche o yema. Los patrones que se usan son: IMC-67; PA-132; UF-613; EET-400; PA 121 y SPA-9 ya que éstos presenten resistencia a la enfermedad conocida como mal del machete (*Ceratocystis cacaofunesta*). El patrón está listo para injertarse entre el primer y el quinto mes de edad. El injerto se realiza por debajo del nudo cotiledonar. La yema debe tener un tamaño menor que el de la lengüeta para que las superficies entren por encima del injerto, de manera que quede suficientemente ajustado. Luego se amarra con cinta plástica o parafilm para proteger el injerto de enfermedades. De quince a dieciocho días después se quita la cinta. Se comprueba si el injerto prendió raspando la corteza de la yema injertada; es positivo si aparece el tejido de color verde, en los injertos que se logra prendimiento se decapita el patrón dejando de dos a cuatro hojas para favorecer el prendimiento definitivo y evitar enfermedades. El prendimiento en esta etapa es del 70%; los injertos que no han mostrado reacción se dejan por tres meses, en ausencia de brotación se eliminan. De tres a cuatro meses después, se realiza un corte definitivo al patrón y se aplica una pasta cicatrizante a base de cobre. Las plantas injertadas deben recibir todos los cuidados mínimos de fertilización, riego, combate preventivo de plagas y deshierbas manuales durante el período de desarrollo del injerto. De cinco a seis meses después de realizado el injerto, la planta está lista para el trasplante a campo. El costo de producción de un injerto es de \$1.8 (Comunicación personal, Ing. Antonio Mora CATIE).

2.7.2.2 Propagación por estacas

El método de propagación por estacas o ramillas consiste en la utilización de las ramas de un árbol seleccionado con hojas adultas sanas, con condiciones especiales de vigor, de color pardo y sin flores. Preferiblemente deben colectarse en las mañanas, debiendo ser cortadas en el extremo en forma perpendicular a medio centímetro del nudo. Las estacas o ramillas deben tener como mínimo tres hojas que se cortarán a 1/3 de la superficie foliar (PROAMAZONIA, 2004). La rama se somete a un tratamiento especial para inducir la formación de raíces. La estaca requiere además, un manejo adecuado de sombra, temperatura, humedad, riego, sustrato y reguladores de crecimiento. Las estacas se deben colocar en propagadores, que pueden ser hechos de cemento, ladrillo o madera, entre otros materiales. (Moreno *et al.* 1983, Hardy 1961).

Este sistema es ampliamente utilizado en Ecuador y principalmente Brasil. En este último país se ha reportado multiplicaciones masivas a escala semi-industrial en biofábricas con alta capacidad de producción. El procedimiento ha sido estandarizado para la utilización de la parte no leñosa de ramas plagiotrópicas, éstas se cortan a 30 cm. de los ápices terminales conservando 2/3 de las láminas de hoja y el brote terminal. El material se coloca dentro de cajas de poliestireno, se hidratan y se transportan al invernadero. Las estacas se colocan en tubos que contienen 288 ml de sustrato enraizador, compuesto por 50 % de un producto comercial que contiene vermiculita, perlita y el polvo de la cáscara de pino y 50 % de fibra de coco. La base de la ramilla es tratada con una solución de ácido indolbutírico (IBA) de 6,000 p.p.m. Al sustrato son añadidos 300 g de cada uno de dos fertilizantes (10-06-20 y 14-16-18 de NPK, respectivamente). Los tubos son colocados bajo sombra del 70% y un régimen de riego de 4-5mm cada 30 segundos durante 60 días. Al final de este período las raíces normalmente pueden ser vistas creciendo fuera de los tubos. Producir una estaca enraizada lista para la siembra en campo toma en promedio de cuatro a cinco meses, dependiendo del tipo de reproducción y el clima. La producción varía de 2,000 a 2,500 estacas por día (Palacios *et al.* 2000).

Recientemente, en CATIE se han iniciado investigaciones en la propagación vegetativa por ramillas utilizando como base la metodología descrita por Palacios *et al.* (2000). Se evaluaron en distintos ensayos: tipos de sombra, tipo de explantes, formas de aplicación de hormona, tipo de sustratos y varios clones seleccionados por el CATIE. Los

resultados evidenciaron que la condición más favorable para la propagación del cacao fue un nivel de sombra cercano al 50%, un régimen de riego de poca intensidad pero de alta frecuencia. También se determinó que no hay diferencias en el tipo de explante ni en el sustrato, aunque se recomienda el sustrato tierra-aserrín complementado con fertilizante porque favorece la propagación. Por otra parte se determinó un efecto genotípico en la eficiencia de la propagación siendo más sencillos de propagar los clones CCN-51, PMCT-58 y ICS-95; los de facilidad intermedia: EET-183, PA-169 y CATIE R4 y los de mayor dificultad: CATIE R6, UF-273 Tipo1 y CC-137 (Mata 2006).

Los inconvenientes de este tipo de propagación son los elevados costos de obtención de material vegetal y de cuidado de los árboles (Wood 1985, MAG 1991, Arévalo 2004); además, su crecimiento ortotrópico obliga a realizar podas periódicas para dar forma al árbol (Masseret *et al.* 2005).

2.7.2.3 Propagación *in vitro*

El cultivo *in vitro* de plantas se realiza colocando bajo condiciones asépticas, fragmentos de la planta de las cuales regeneran nuevas plantas. Estos fragmentos de tejido son llamados comúnmente explantes y la parte de la planta de la cual son obtenidos va a depender de la metodología de multiplicación utilizada y de la cantidad de plantas que se desea producir (Evans *et al.* 1984).

El uso de técnicas de reproducción asexual tal como el cultivo de tejidos, permite la reproducción masiva en poco tiempo, lo que lo convierte en un buen instrumento para agilizar los trabajos de mejoramiento genético. Además el cultivo de tejidos es una excelente herramienta para la conservación de los recursos fitogenéticos, porque permite mantener el material libre del ataque de plagas y enfermedades, sin riesgo de pérdida por desastres naturales, ocupando el espacio mínimo y fácilmente disponible para su caracterización, multiplicación e intercambio, además ofrece la posibilidad de mantener plantas libres de virus, con un alto índice de multiplicación, independientemente de las condiciones climáticas (Villalobos *et al.* 1991).

La principal ventaja del cultivo *in vitro* como vía de propagación, es la producción uniforme de plantas que conservan los mismos caracteres de la planta de origen (López-Baez *et al.* 2000a).

2.7.2.4 Embriogénesis somática

Dentro de las técnicas de cultivo *in vitro* la embriogénesis somática se presenta como una herramienta muy valiosa para la multiplicación de plantas.

La embriogénesis somática fue reportada por primera vez por Reinert (1958) y Steward (1958) en zanahoria. Sus trabajos se establecieron a partir del postulado de Haberland de 1902 que establece que "cualquier célula vegetal, cuando es expuesta a un ambiente y estímulos apropiados es capaz de regenerar una planta". Según el concepto de la totipotencia celular cualquier tejido puede dar origen a una planta completa, si las condiciones ambientales pueden ser reguladas adecuadamente.

La embriogénesis somática es una herramienta muy útil para la propagación de plantas y consiste en la habilidad de las células competentes para cambiar su ruta de diferenciación a fin de convertirse en embriones somáticos (Williams y Maheswaran 1986).

La embriogénesis somática es un nuevo avance en la tecnología de propagación vegetativa para las plantas, que tiene un impacto importante en el mejoramiento y multiplicación de plantas (Park, 2002; Sutton, 2002). Es un método muy eficiente para reproducir plantas de mejoramiento genético y ofrece el potencial para la conservación y la producción de un número ilimitado de plantas. Se cree que los cultivos embriogénicos tarde o temprano eventualmente se pudieran utilizar en la producción comercial de árboles. Sin embargo, son necesarias tasas considerablemente mayores de producción y sistemas de manejo en gran escala para utilizar la embriogénesis somática para la producción en masa de las plantas (Sutton, 2002). Para un cambio en la escala de producción pueden ser usados el cultivo en medio líquido (p. ej. bioreactores), la siembra directa en invernadero o en campo como semillas artificiales (Merkle *et al.* 1990). Tales características hacen probable que las plantas producidas vía embriogénesis somática tenga costos perceptiblemente más bajos por unidad que los producidos usando otros sistemas de micropropagación (Merkle, 1995).

Las limitaciones principales al uso de embriogénesis somática para la propagación son las tasas de multiplicación bajas, la frecuencia de producción de variantes somaclonales, la maduración incompleta, la germinación baja y no sincrónica y el número bajo de vitroplantas sembradas en campo (Merkle, 1995).

2.8 Cultivo de tejidos en cacao

La reproducción vegetativa *in vitro* del cacao tiene ciertas ventajas: un coeficiente elevado de multiplicación, mejor enraizamiento y una posibilidad de reversión de la plagiotropía a la ortotropía (Dublín, 1984); ellas contribuirían a su mejoramiento genético mediante una nueva evaluación de la selección clonal. La micropropagación del cacao facilitaría los intercambios de material vegetal, la creación de colecciones de germoplasma *in vitro* para salvaguardar los recursos genéticos de la especie, hoy amenazados por varias enfermedades (Mroginski *et al.* 1991)

El cacao como la mayoría de los árboles tropicales es recalcitrante al cultivo de tejidos debido a que son pocos los resultados satisfactorios los que se han logrado desde que Archibald (1954) inició la investigación de micropropagación en cacao, logrando la formación de callo a partir del cambium vascular, pero no logró obtener plantas.

También se han utilizado otras vías como: el cultivo de ápices caulinares de plantas jóvenes en medios de cultivo con diferentes reguladores de crecimiento, pero solamente se obtuvo escaso desarrollo de brotes y el alargamiento de unas hojas (Orchard *et al.* 1979, Passey y Jones 1983), explantes nodales y yemas axilares cultivados en medio basal simple, que produjeron una generación de brotes (Janick y Whipkey 1985, Maxwell y Blake 1984) cultivo de microestacas en diferentes medios basales con diferentes combinaciones de temperatura y luz, solamente se obtuvieron callos (Hall y Collin 1975, Legrand *et al.* 1984).

Más tarde, también utilizando microestacas Lardet *et al.* (1998) evaluaron promotores/inhibidores de crecimiento endógenos en los brotes, etapas morfogénicas y la posición de brote sobre la rama de cacao, lograron la capacidad de apertura y el alargamiento *in vitro* de brotes en una fase de crecimiento activo. Recientemente se ha utilizado el cultivo de embriones zigóticos (Omokolo *et al.* 1997) (Traore *et al.* 2003); sin embargo, en todos estos trabajos no se llegó a la obtención de plantas, ya que se logró solamente la formación de callos o el crecimiento de brotes, sin llegar a sembrar plantas en el campo.

Por otra parte, también se ha utilizado la técnica de microinjerto de embriones somáticos, evaluando el uso de IBA para inducir el desarrollo de raíces adventicias y su efecto sobre el desarrollo del injerto; así como la respuesta de la presencia o ausencia de cotiledones del embrión somático sobre el prendimiento del injerto. Esta práctica permitió

el desarrollo de los embriones en plantas, su aclimatación y plantación en suelo (Aguilar *et al.* 1992).

La técnica más exitosa para obtener la micropropagación de plantas ha sido la embriogénesis somática de piezas florales de cacao, ya que mediante esta técnica se ha llegado a la obtención de plantas aclimatadas, inclusive han llegado a ser sembradas en el campo (López-Baez *et al.* 1993).

2.8.1 Embriogénesis somática de cacao

La embriogénesis somática en cacao fue descrita inicialmente por Esan (1977) y luego por Pence *et al.* (1979). La embriogénesis somática y la formación de embriones asexuales, se logró a partir de embriones cigóticos inmaduros, aunque no se llegó a obtener plantas completas (Esan 1977, Pence 1979, Kononowicz *et al.* 1984, Adu-Ampomah *et al.* 1988, Sondahl *et al.* 1988, Villalobos *et al.* 1990). Sin embargo, estos métodos no reproducían clonalmente las plantas adultas de interés debido a que la embriogénesis somática era inducida a partir de embriones zigóticos producidos por polinización cruzada. Subsecuentemente los esfuerzos se dirigieron hacia cultivo de tejidos somáticos evaluando diferentes explantes como las hojas (Litz 1986); la nucela y el tegumento interno de las mazorcas inmaduras (Chatelet *et al.* 1992, Figueira *et al.* 1993, Sondahl *et al.* 1993) confirmaron la formación de callos y embriones somáticos utilizando este explante.

Si bien se pueden obtener embriones a partir de cotiledones por vía directa, su cantidad es muy baja, estando en presencia de una embriogénesis de baja frecuencia.

Se ha obtenido un sistema eficiente de embriogénesis somática a partir del cultivo de pétalos y estaminoides. Estos explantes son los que mayor importancia tienen para la micropropagación del cultivo, ya que al ser el cacao una planta alógama, los cotiledones llevan implícita una variabilidad natural producto de su cruzamiento, aunque los mismos se pueden utilizar cuando se parte de cruzamientos conocidos. El protocolo de inducción de la embriogénesis somática más eficiente es el que utiliza el medio DKW, adicionando tidiiazurón y glucosa como fuente de carbono en la primera parte del proceso. Esos resultados constituyen una de las principales tendencias en las investigaciones de la embriogénesis en cacao en este momento en el mundo (López-Baez *et al.* 1993, Li *et al.* 1998, Maximova *et al.* 2000).

Más recientemente López-Baez *et al.* (2000) usando un medio de cultivo basado en las sales minerales MS modificadas, adicionando 2,4-D y 2,4,5-T y quinetina, un complejo hormonal diferente al utilizado por otros investigadores (Li *et al.* 1998, Maximova *et al.* 2000) que también utilizan explantes florales en la inducción de la embriogénesis, lograron la producción de embriones en 12 genotipos diferentes, logrando los mejores resultados con la utilización de 2,4-D. También determinaron la importancia de estudiar la fuente de carbono ya que tanto la sacarosa como la glucosa provocaron una buena callogénesis primaria, no así la maltosa. Además determinaron un efecto positivo de la incorporación de un pretratamiento de los explantes florales a bajas temperaturas antes de la siembra.

Resultados similares en cuanto a la fuente de carbono y reguladores de crecimiento fueron reportados por Furtek *et al.* (2000), Tan *et al.* (2000) y Chantásig (2004) en todos los casos mencionan un fuerte efecto genotípico. Los resultados indicaron que es necesario optimizar el proceso para cada genotipo de interés de manera individual con el propósito de obtener las más altas tasas de éxito.

Por lo tanto queda en evidencia la necesidad de continuar la investigación en la embriogénesis somática de cacao haciendo énfasis en el estudio de factores químicos como las sales minerales, la fuente y concentración de carbono y de los reguladores de crecimiento; así como también, factores físicos como la temperatura ya que estos son claves para lograr el éxito en la micropropagación de cacao.

2.8.2 Evaluación en campo de las plantas producidas por embriogénesis somática

La embriogénesis somática todavía no es aplicable como método de propagación a gran escala en cacao; sin embargo, es muy importante tener una completa validación de la conformidad genética de las plantas producidas por embriogénesis somática en ensayos de campo de largo plazo considerando evaluar la morfología de los árboles, su calidad agronómica y cualidades organolépticas (Masseret *et al.* 2005).

El Centro de Investigación de Nestlé en Tours, Francia inició en el año 2000 dos ensayos de campo con materiales producidos por métodos asexuales, dentro de los cuales crecen plantas producidas por injerto, enraizamiento de estacas y embriogénesis somática; además, se utilizó una plantación comercial de árboles provenientes de semillas de los mismos clones evaluados como testigo. Estos ensayos se llevaron a cabo en Ecuador con el

clon EET-95 y en Brasil con los clones EET-95, EET-96, EET-103 y TSH-1188. Después de cuatro años de evaluación se determinó que los árboles provenientes de embriogénesis somática de todos los genotipos evaluados mostraron un alto grado de conformidad en el crecimiento, arquitectura del árbol, floración, peso de la semilla y productividad. La comparación de los diferentes métodos de propagación evidenció que los árboles producidos por embriogénesis somática tenían una ventaja significativa en el diámetro del tronco, una fructificación más temprana y una productividad cuatro veces mayor que los árboles producidos por los otros métodos de propagación, el peso de las semilla fue similar. Esto combinado con una alta uniformidad de las plantas podría conferir un beneficio comercial significativo para el productor, por encima del costo de las plantas derivadas de embriogénesis somática (Masseret *et al.* 2005)

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 MATERIALES

3.1.1 Localización del estudio

La investigación se realizó en los laboratorios de Biotecnología del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE) ubicado en Turrialba, Costa Rica.

3.1.2 Material Vegetal

Para realizar la investigación se utilizaron botones florales de 7 clones de cacao (CC-137, EET-183, ICS-95, UF-273, CATIE R4, CATIE R6 y CATIE R7) procedentes de la Colección de Germoplasma del CATIE ubicada en La Montaña y Cabiria, algunas de sus características se mencionan en el cuadro 1. La colección está a 602 msnm y posee una temperatura anual promedio de 21.8° C, humedad relativa de 88.1%, y precipitación mensual promedio de 225,0 mm (CATIE 2007).

Cuadro 1. Principales características agronómicas de los clones seleccionados por el Programa de Mejoramiento Genético del CATIE

CARACTERÍSTICA	CLONES						
	ICS-95	CC-137	EET-183	UF-273	CATIE R4	CATIE R6	CATIE R7
Origen	T&T	C. Rica	Ecuador	C. Rica	C. Rica	C. Rica	C. Rica
Reacción a: <i>M. royeri</i>	R ¹	MS	MS	R	R	R	R
<i>M. pernicioso</i>	T	¿?	¿?	¿?	¿?	¿?	¿?
<i>P. palmivora</i>	S	S	MS	S	S	MS	MS
Color del fruto	Rojo	Verde	Verde	Rojo	Verde	Verde	¿?
Productividad	Med	Alta	Alta	Med	Alta	Alta	Alta

¹ R: Resistente, MS: Moderadamente Susceptible, T: Tolerante, S: Susceptible

Fuente: Chanatasig 2004, Phillips-Mora *et al.* 2005, Arciniegas 2005, International Cocoa Germoplasm Database.

Estos clones han sido seleccionados por el Programa de Mejoramiento Genético del CATIE por su buena productividad, tolerancia a moniliasis y adaptabilidad a diferentes ambientes.

3.2 METODOLOGÍA

Para las diferentes fases de la embriogénesis somática de los siete clones de cacao seleccionados se utilizaron dos metodologías: la utilizada en Penn State University descrita por López-Baez (1993) y mejorada por Alemanno (1995) y Li *et al.* (1998); y la desarrollada por el Centro de Investigación de la Nestlé en Tours, Francia (Fontanel *et al.* 2002).

3.2.1 Medios de cultivo

La mayoría de los medios de cultivo utilizados en este estudio tenían como base las sales minerales del medio de cultivo de DKW descrito por Driver y Kuniyuki (1984) y Tulecke y McGrahan (1985). Los medios de cultivo del protocolo de Penn State University son los medios PCG (Primary Callus Growth) de inducción de la embriogénesis somática, ED (Embryo Development) para el desarrollo de los embriones y PEC (Primary Embryo Conversion) para la conversión de embriones en plantas. El medio SCG1 (Secondary Callus Growth) para la expresión de la embriogénesis somática está constituido de las sales minerales de McCown's (Lloyd y McCown's 1980). Los medios utilizados del protocolo del laboratorio de la Nestlé son el NT1 como medio de inducción, NT2 como medio de expresión, y los medios para el desarrollo de embriones (G-80) y conversión en planta (ENR6) (Anexo 2). En todos los medios el pH se ajustó a $5,8 \pm 0,1$ y posteriormente se esterilizaron a una temperatura de 121°C y una presión de 1,2 bares por un período de 20 minutos.

3.2.2 Colecta y desinfección de los explantes

Para la inducción de la embriogénesis somática de los clones CC-137 y EET-183 se utilizaron las flores provenientes de los árboles del ensayo T3 “Evaluación de seis clones con distinta susceptibilidad a moniliasis”; para los genotipos CATIE R7 y UF-273 Tipo I se utilizaron flores del ensayo T6 “Jardín de Yemas”; para los clones CATIE R4 y CATIE R6 se tomaron las flores del “Ensayo de Calidad (T7 y T8)” todos estos ubicados en La

Montaña. Para el clon ICS-95 se utilizaron las flores de los árboles de la colección de cacao situada en Cabiria.

Los botones florales de los siete clones se recolectaron en el campo entre las 7 y 8 de la mañana y se llevaron al laboratorio en un recipiente con agua fría. La desinfección consistió en un lavado superficial con agua no estéril, posteriormente las flores se colocaron en una malla de plástico y se sumergieron en una solución de hipoclorito de sodio al 5% (v/v) durante 20 minutos. Posteriormente dentro de la cámara de flujo laminar se realizaron 3 lavados con agua destilada estéril.

3.2.3 Fase de inducción y expresión de la embriogénesis

Con la ayuda de pinzas y bisturí se extrajeron las 5 bases de los pétalos y los 5 estaminoides de cada flor y se sembraron en platos Petri de 60 x 15 mm, conteniendo 7 ml del medio de cultivo PCG y NT1 para la inducción de la embriogénesis somática.

La caja se rotuló de acuerdo a cada tratamiento y se colocó en la oscuridad por 14 días en el caso de PCG y 22 días en el caso de NT1.

Después del primer ciclo de cultivo los explantes se transfirieron a otra caja petri con el medio SCG1 para los explantes provenientes de PCG y al medio NT2 para los explantes en NT1, para la expresión de la embriogénesis. Estos cultivos se mantuvieron a la oscuridad, renovando el medio cada 22 días en el caso de NT2 hasta la aparición de los embriones. Los explantes colocados en SCG1 se transfirieron a los 14 días de cultivo al medio ED renovando el medio cada 14 días hasta la aparición de los embriones.

3.2.3.1 Experimento Inducción I

En este estudio se determinó el efecto del genotipo, el medio de cultivo y el tipo de explante sobre la respuesta a la embriogénesis somática, según se detalla en el cuadro 2.

Cuadro 2. Detalle de los genotipos, medio de cultivo y tipo de explante evaluados durante la inducción de la embriogénesis somática de cacao.

Clones	Medio de Cultivo ¹	Explantes
ICS-95	PCG	Pétalo y Estaminoide
	NT1	Pétalo y Estaminoide
CC-137	PCG	Pétalo y Estaminoide
	NT1	Pétalo y Estaminoide
UF-273	PCG	Pétalo y Estaminoide
	NT1	Pétalo y Estaminoide
EET-183	PCG	Pétalo y Estaminoide
	NT1	Pétalo y Estaminoide
CATIE R7	PCG	Pétalo y Estaminoide
	NT1	Pétalo y Estaminoide

¹/PCG= Primary Callus Growth; NT1=Nestlé Tours

En este experimento se probaron los tres factores al mismo tiempo para determinar posibles interacciones, lo que significó un total de 16 tratamientos y 30 repeticiones por tratamiento. Cada repetición consistió en una caja Petri con cinco explantes. En el caso del clon CATIE R7 se realizó el análisis estadístico por separado debido a que su introducción al laboratorio no se realizó al mismo tiempo que los otros clones.

3.2.3.2 Experimento Inducción II

Este estudio consistió en determinar el efecto del genotipo (CATIE R4 y CATIE R6), el portainjerto (UF-273 y IMC-67), el medio de cultivo (PCG y NT1) y el tipo de explante (Pétalo y Estaminoide) sobre la respuesta de dos clones a la embriogénesis somática (Cuadro 3).

Cuadro 3. Detalle del genotipo, portainjerto, medios de cultivo y tipo de explante evaluados durante la inducción de la embriogénesis somática de cacao.

Clones	Portainjertos	Medios de Cultivo	Explantes
CATIE R4	IMC-67	PCG	Pétalo y Estaminoide
		NT1	Pétalo y Estaminoide
	UF-273	PCG	Pétalo y Estaminoide
		NT1	Pétalo y Estaminoide
CATIE R6	IMC-67	PCG	Pétalo y Estaminoide
		NT1	Pétalo y Estaminoide
	UF-273	PCG	Pétalo y Estaminoide
		NT1	Pétalo y Estaminoide

En este experimento se analizó los cuatro factores al mismo tiempo para determinar posible interacción entre los mismos, por lo que se tuvo un total de 16 tratamientos y 30 repeticiones por tratamiento. Cada repetición consistió en una caja Petri con cinco explantes

3.2.4 Fase de multiplicación

3.2.4.1 Inducción de la Embriogénesis Secundaria

Los embriones de los clones UF-273 y EET-183 producidos en el experimento de Inducción I, se utilizaron en la inducción de la embriogénesis secundaria. Se seleccionaron los embriones jóvenes y de color blanco que se encontraban en estado globular y torpedo. Siguiendo la metodología desarrollada por el Centro de Investigación de la NESTLE, los embriones se cortaron con bisturí en trozos de entre 1 y 2mm y se colocaron en el centro de platos Petri de 60x15 mm que contenían 7 ml. de medio M21. El material se transfirió a platos Petri de 100x15 mm a los 2 meses de cultivo. Los cambios a medio fresco se realizaron cada 30 días hasta la aparición de cultivos embriogénicos.

3.2.5 Fase de desarrollo de embriones

Los embriones formados en el medio ED se transfirieron al medio de cultivo PEC, los embriones obtenidos en el medio NT2 se subcultivaron al medio G-80 por un mes y

después se transfirieron al medio ENR6. En ambos casos, los cultivos se colocaron a la luz para obtener un desarrollo adecuado. Durante el primer mes los embriones se colocaron en platos Petri de 100x15mm que contenían 25 ml de medio de cultivo, posteriormente se transfirieron a frascos tipo Gerber® que contenían 30 ml de medio de cultivo y permanecieron en ese recipiente hasta que las plantas estuvieran listas para ser aclimatadas. Los cambios a medio fresco se realizaron cada 30 días en ambos medios hasta la conversión en planta.

El desarrollo de los embriones en medio líquido se realizó en el recipiente de inmersión temporal RITA® descrito por Alvard *et al.* 1993. Se utilizó el tamiz de 400µm y una duración y frecuencia de inmersión de 1 minuto cada 12 horas (Anexo 3).

3.2.5.1 Evaluación del tamaño del embrión

Para evaluar el desarrollo y la conversión en planta se utilizó los embriones de los clones UF-273 y EET-183 producidos en el experimento de Inducción I (Figura 2). Los embriones se recolectaron y se clasificaron en 4 grupos de acuerdo a su tamaño y a su morfología. Los grupos resultantes fueron: a) 0-2 mm, b) 2-4 mm, c) 4-6 mm y d) más de 6 mm. Los embriones se colocaron en tubos de ensayo de 10 cm. Al mismo tiempo se evaluó el efecto de dos medios de desarrollo de embriones; el medio PEC, descrito por Li *et al.* (1998), y el medio G-80/ENR-6, establecido por Fontanel *et al.* (2002). Estos medios de cultivo se utilizaron en cada uno de los grupos descritos para determinar la posible interacción entre el medio de cultivo y el tamaño del embrión. Durante 4 meses se realizó una medición mensual en milímetros de la parte aérea del embrión desde la base del eje hasta el meristemo apical.

3.2.5.2 Comparación del desarrollo de embriones en medio líquido y medio sólido

Del experimento de Inducción II se seleccionaron los embriones con mejor morfología del clon CATIE R4 injertado sobre UF613 y se establecieron dos grupos. Un grupo de embriones se colocó sobre platos Petri de 100x15mm que contenían 25 ml de medio PEC sólido y posteriormente se transfirió a frascos tipo Gerber® con el mismo medio. El otro grupo de embriones se colocó en recipientes de inmersión temporal RITA®

con 200ml de medio PEC líquido. En ambos casos se evaluó el efecto de tres densidades iniciales de cultivo para lo cual se utilizó 10, 20 y 40 embriones por recipiente.

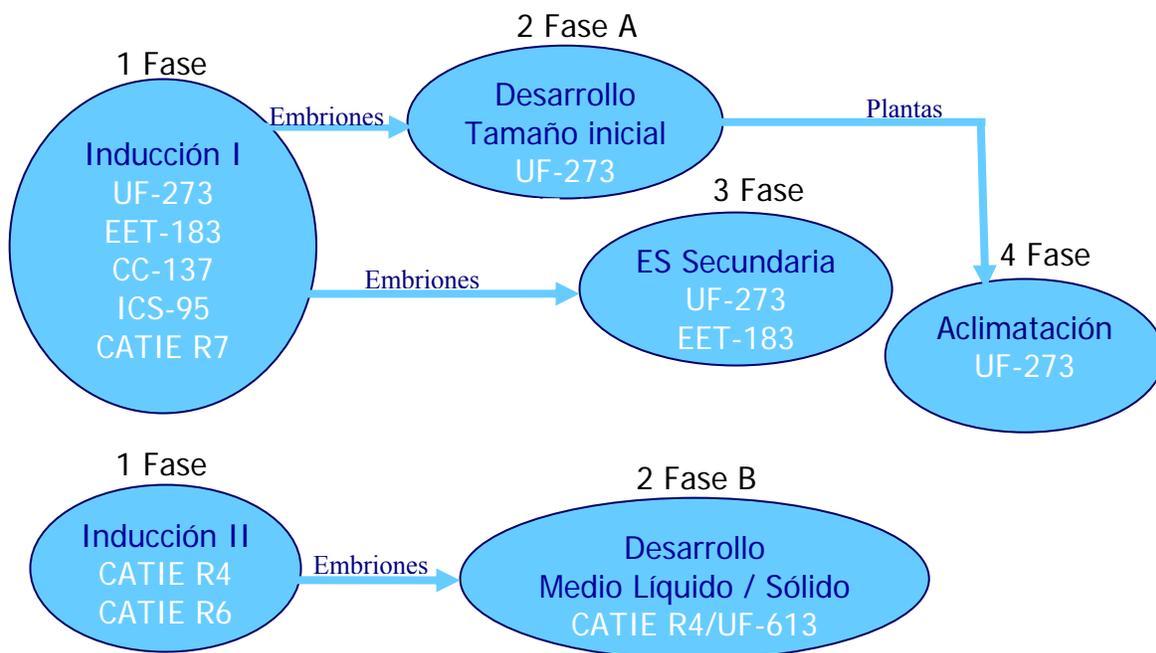


Figura 2. Esquema de distribución de los embriones y plantas de cada genotipo en los diferentes experimentos de las cuatro fases del proceso de embriogénesis somática.

3.2.6 Fase de aclimatación

Las plantas del clon UF273 provenientes del ensayo tamaño inicial del embrión, con al menos 3 hojas verdaderas se aclimataron en dos sustratos diferentes: un sustrato hecho de una mezcla de tierra, arena y turba en una relación 3:1:3, esterilizado mediante tratamiento térmico. Este sustrato se colocó en una bandeja plástica rectangular 22x42x11 cm. El otro sustrato consistió en el uso de pellets (Jiffys®) los cuales se hidrataron sumergiéndolos en agua durante una hora y se dejaron escurrir por una noche antes de la siembra. En cada sustrato se sembraron 25 plantas. La aclimatación se hizo en el invernadero, en cámaras cubiertas con plástico y zarán 50% para mantener una alta humedad, baja luminosidad y temperatura adecuada.

3.2.7 Condiciones de incubación

Los cultivos se colocaron en cuartos de crecimiento a la oscuridad durante las fases de inducción y expresión de la embriogénesis y a la luz en las fases de desarrollo de embriones y conversión en planta. Para los cultivos en presencia de luz se utilizó un fotoperíodo de 12 horas con una intensidad de 2000 lux, una temperatura de 27 ± 3 °C y una humedad relativa de $87 \pm 3\%$.

3.3 Análisis Estadístico

3.3.1 Definición de la unidad experimental y la unidad de medida

De cada flor se extrajeron los 5 pétalos y las 5 bases de estaminoides y se sembraron en una caja Petri. La caja Petri representó la unidad experimental y cada explante la unidad de medición. Se determinó el promedio de embriones producidos por cada tipo de explante para cada flor.

3.3.2 Variables evaluadas

- **Fase de inducción**

Para determinar la capacidad de respuesta embriogénica para cada clon se hizo una observación de cada tratamiento a los dos meses después de la introducción de campo. Se evaluó el porcentaje de reactividad; es decir, la capacidad del explante de formar callo, la asepsia y la respuesta embriogénica de cada uno mediante la formación de embriones para cada tratamiento.

- **Desarrollo de embriones:**

Se determinó el crecimiento mensual de los embriones en cada medio de cultivo y en cada uno de los grupos provenientes de la clasificación por el tamaño de los embriones.

- **Conversión en planta:**

Para cada tratamiento se determinó el porcentaje de embriones que se desarrolló en planta, alcanzando al menos un par de hojas verdaderas.

- **Porcentaje de aclimatación:**

Se determinó el porcentaje de plantas sobrevivientes para cada tratamiento desde el primer hasta el tercer mes de haber sido sembradas en los sustratos en el invernadero.

3.3.3 Análisis de datos

Para llevar a cabo la investigación se usó Diseños Completamente Aleatorizados con un arreglo factorial. Los datos fueron procesados y analizados mediante análisis multifactorial con la ayuda del programa SAS. Posteriormente, se realizó un análisis de interacción para conocer el grado de relación entre la formación de embriones, el genotipo, los medios de cultivo, el explante y la influencia del patrón utilizado durante la injertación. En el experimento Inducción II se realizó un análisis de conglomerados (cluster) para agrupar los 16 tratamientos utilizando la distancia euclidiana y el método de agrupamiento de Ward. En el experimento Inducción de la Embriogénesis Secundaria se realizó una Prueba T de comparación de medias. En el experimento Efecto del tamaño inicial del embrión somático se realizó la prueba Duncan de comparación de medias.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la fase de inducción se evaluó la asepsia, reactividad, el porcentaje de explantes con embriones y número de embriones por explante en los siete clones estudiados. Los embriones obtenidos en la fase de inducción se utilizaron en las fases de multiplicación y desarrollo de embriones. En la fase de multiplicación se determinó el porcentaje obtenido de embriones secundarios y agregados embriogénicos. En los experimentos de la fase de desarrollo, tamaño inicial del embrión y comparación del desarrollo en medio de cultivo sólido y líquido se estudiaron aspectos cualitativos como la morfología de los embriones y su crecimiento. Finalmente en la fase de aclimatación se determinó el porcentaje de sobrevivencia en dos sustratos diferentes.

4.1 Establecimiento de cultivos asépticos y formación de callo primario

4.1.1 Experimento Inducción I

Uno de los principales problemas que afecta la técnica de cultivo *in vitro* es la contaminación, particularmente de tipo endógena, ocasionada por hongos y bacterias. Estos microorganismos al encontrarse en el interior del tejido, hacen sumamente difícil la utilización del material vegetal (Mroginski y Roca, 1991).

Los trabajos realizados en cacao para desinfectar los explantes florales han utilizado diferentes productos, entre otros se utilizó Cloralex 80% (López-Baez *et al.* 1993), hipoclorito de sodio al 10% por 20 minutos (Alemanno *et al.* 1997), hipoclorito de calcio 1% por 20 minutos (Li *et al.* 1998), etanol 70% por 5 minutos, hipoclorito de sodio 5,25% por 20 minutos (Tan *et al.* 2002), hipoclorito de sodio al 2% por 15 minutos; sin embargo en ninguno de ellos se refiere a la asepsia obtenida en sus investigaciones. Solamente Chanatásig (2004) menciona que logró un nivel de asepsia cercano al 100% utilizando explantes florales de cacao esterilizadas con hipoclorito de sodio (NaOCl) al 25% (v/v) durante 10 minutos y tres enjuagues con agua destilada estéril, este método difiere con el utilizado en esta investigación la cual se basó en la metodología descrita por Penn State Cacao Research Lab (2003) en la que se utiliza el hipoclorito de sodio al 6% por 20 minutos.

La asepsia lograda durante el establecimiento de los cultivos para inducir la embriogénesis (Fig. 3) fue muy variable debido a que en algunos tratamientos fue del 96% mientras que en otros casos fue cercana al 55%. Estas diferencias tan altas pueden ser debidas a que las flores de los 4 clones fueron tomadas de tres lugares distintos, dos en La Montaña y uno en Cabiria por lo que las condiciones agroecológicas son distintas entre ellos.

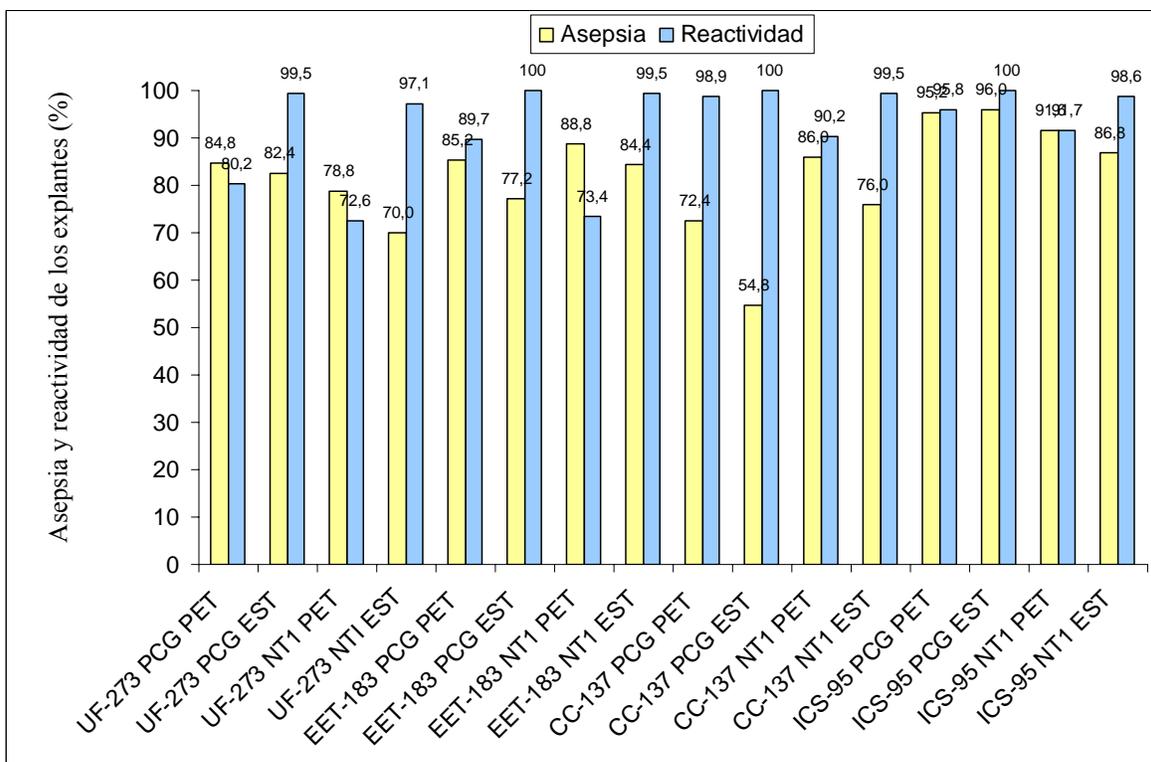


Figura 3. Porcentaje de asepsia y reactividad de los explantes de los clones UF-273 Tipo I, EET-183, CC-137 y ICS-95 en los medios de cultivo PCG y NT1 en explantes de pétalo (PET) y estaminoide (EST).

Debido a que la interacción existente entre los factores es altamente significativa ($P < 0.01$) no es recomendable concluir por separado para un solo factor. Sin embargo, hay que destacar que en el caso de la reactividad los 6 porcentajes más bajos pertenecen al explante pétalo, éstos fluctúan entre 72,6 y 91,7% mientras tanto, los 6 porcentajes más altos corresponden al explante estaminoide y varían entre un 99,5 y 100%.

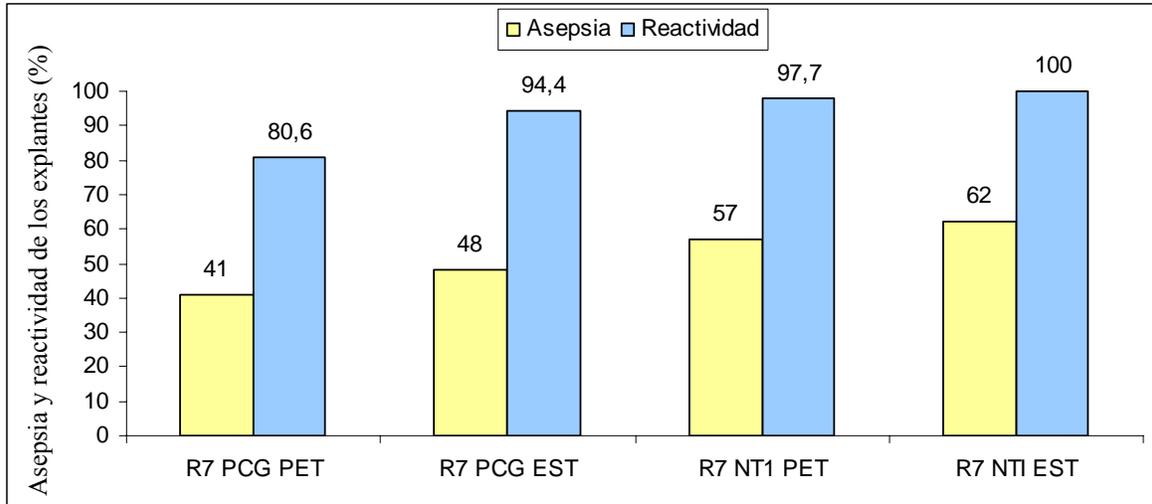


Figura 4. Porcentaje de asepsia y reactividad para el clon CATIE R7 en dos medios de cultivo (PCG y NT1) y 2 tipos de explante, pétalo (PET) y estaminoide (EST).

La asepsia obtenida para el clon CATIE R7 fue baja, tal y como puede verse en la Figura 4. Esto puede deberse a que en el momento de realizar la introducción de campo, en el ensayo Jardín de yemas (T6) de donde se tomaron las flores, la sombra de Poró (*Erythrina poeppigiana*) había sido cortada días atrás y las ramas aún se encontraban en el suelo lo que ocasionó una alta humedad en el ambiente que pudo haber aumentado la presión de inóculo de algunos microorganismos que causaron la alta contaminación.

Es posible también que la desinfección utilizada no sea eficiente para las condiciones agroambientales de este clon por lo cual deba ser modificada a fin de mejorar la asepsia de los cultivos. No obstante, la contaminación observada, los explantes asépticos tuvieron una buena reactividad principalmente los cultivados en medio NT1.

4.1.2 Experimento Inducción II

Al observar los resultados de asepsia y reactividad de los clones CATIE R4 y CATIE R6 mostrados en la Figura 5, se puede determinar que la reactividad es muy similar entre ellos, no así, la asepsia, ya que para el clon CATIE R4 el promedio de asepsia y reactividad fue de 94,75% y 96,88% respectivamente, mientras que para el clon CATIE R6 fue de 85,75% y 97,38% respectivamente.

Al comparar estos resultados con los obtenidos para el clon CATIE R7 (Fig. 4) se establece que la reactividad del CATIE R7 (93,18%) a pesar de ser levemente menor es

muy similar a los otros 2 clones; no obstante, la asepsia de este clon (52,0%) si es significativamente mucho más baja que la de los otros 2 clones.

Es necesario resaltar que las plantas madres de los clones CATIE R4 y CATIE R6 se encuentran en un lugar distinto en el campo que el clon CATIE R7, quizás ésta sea la explicación a las diferencias tan marcadas en el porcentaje de contaminación, ya que, los protocolos de desinfección utilizados fueron los mismos para todos los genotipos.

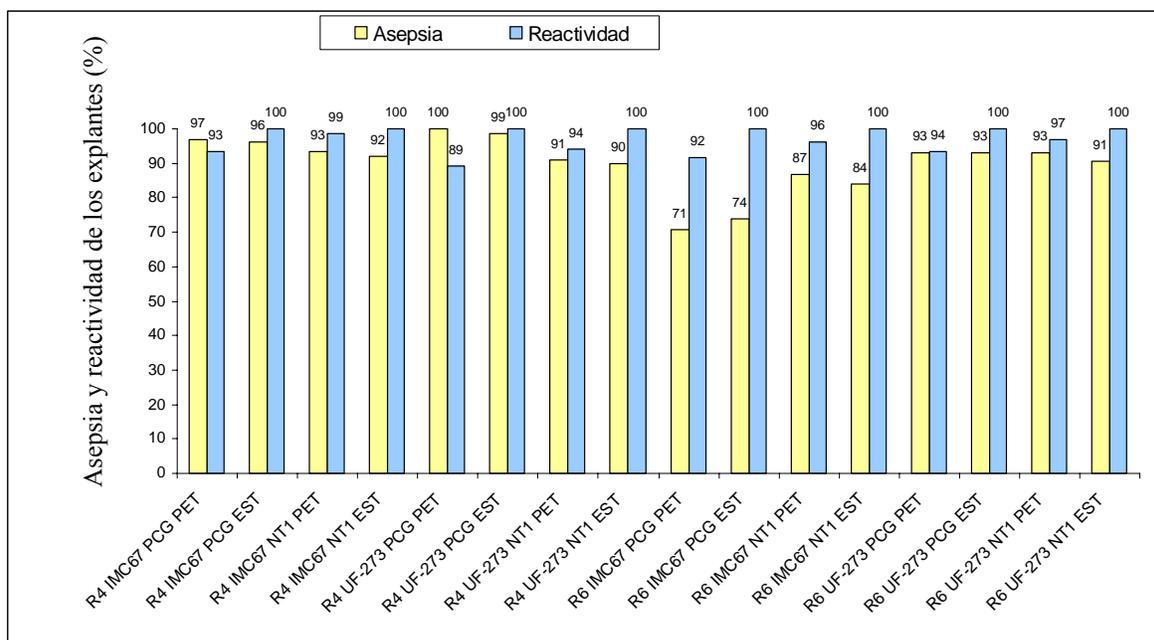


Figura 5. Porcentaje de asepsia y reactividad para los clones CATIE R4 y CATIE R6, injertados sobre 2 genotipos (IMC-67 y UF-613), en 2 medios de cultivo (PCG y NT1) y 2 tipos de explante pétalo (PET) y estaminoide (EST).

4.2 Fase de inducción y expresión de la embriogénesis

La etapa de inducción es un aspecto clave dentro del proceso de la embriogénesis somática de cualquier cultivo. La obtención de embriones somáticos en cacao a partir del cultivo de partes florales ya ha sido reportada por varios investigadores (López-Baez *et al.* 1993, Li *et al.* 1998, Maximova *et al.* 2000, Furtek *et al.* 2000, Fontanel *et al.* 2002 y Chantásig 2004). Sin embargo, a excepción del clon UF-273 (Chantásig 2004) ninguno de los clones utilizados en este trabajo habían sido probados anteriormente para determinar su comportamiento *in vitro*, por tal motivo fue necesario evaluar los medios de cultivo

descritos y los dos tipos de explante para establecer las mejores condiciones para estos genotipos.

4.2.1 Experimento Inducción I

Al comparar los resultados del porcentaje de explantes con embriones y promedio de embriones por explante para los cuatro clones estudiados mostrados en la Figura 6, se puede determinar que el clon que produjo mayor cantidad de embriones fue el UF-273, seguido del EET-183, mientras que los clones CC-137 e ICS-95 produjeron muy poca cantidad de embriones.

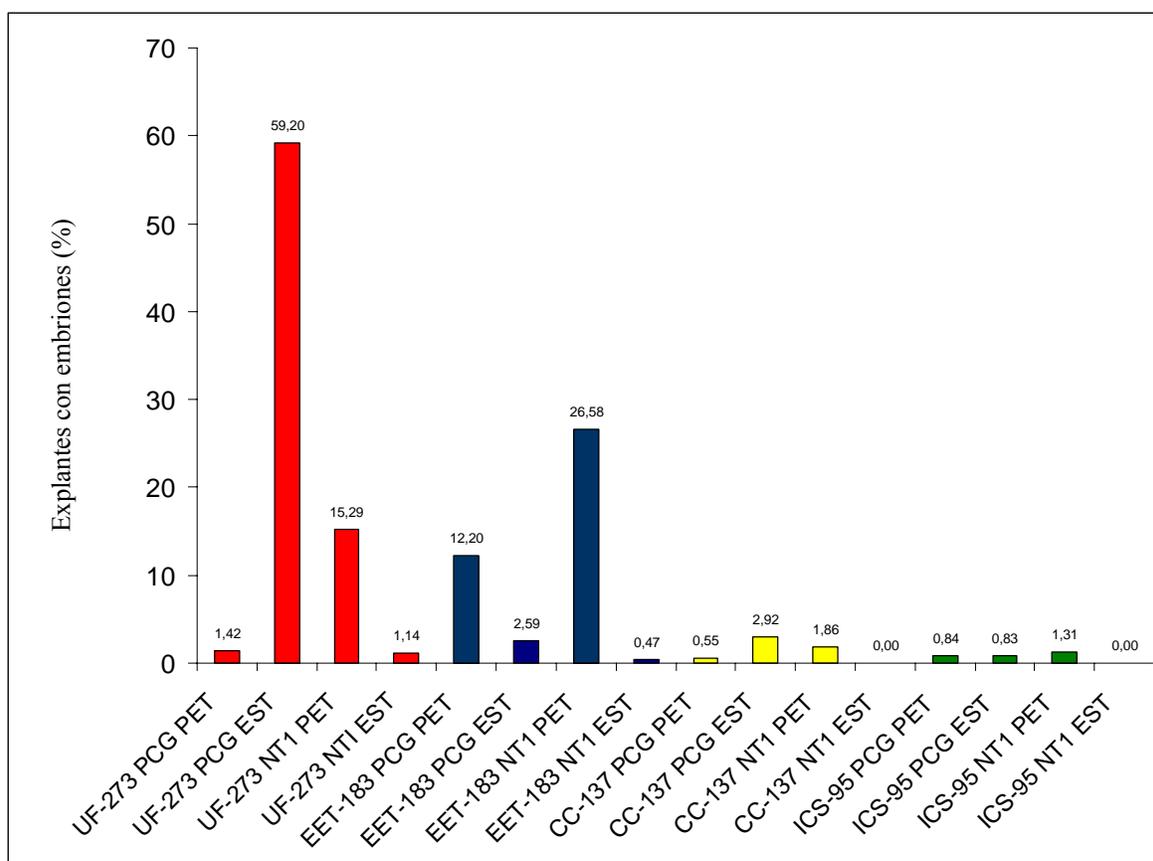


Figura 6. Porcentaje de explantes con embriones para los clones UF-273 Tipo I, EET-183, CC-137 y ICS-95 en 2 medios de cultivo (PCG y NT1) y 2 tipos de explante, pétalo (PET) y estaminoide (EST).

El único antecedente de embriogénesis somática en estos genotipos es el reportado por Chanatasig (2004) en el cual se determinó que el mejor tratamiento para UF273 es

aquel en que se utiliza como explante el estaminoide, la sacarosa como fuente de carbono a una concentración de 40 g/l, con una permanencia de 28 días en el medio PCG y como fuente de citocinina la BAP. Estos factores son diferentes a los utilizados en la presente investigación debido a que la fuente de carbono fue glucosa a una concentración de 20 g/l, una permanencia de 14 días en medio PCG y kinetina, como fuente de citocinina. Por otra parte Lopez-Baez *et al.* (1993) obtuvo mejores resultados utilizando un medio de inducción de embriogénesis basado en las sales minerales MS modificados y una combinación de 2,4-D con kinetina seguido de un medio de expresión sin reguladores.

No hay una tendencia clara acerca del mejor medio de cultivo y mejor explante de manera que puedan ser utilizados sistemáticamente en todos los clones. En algunos clones como el UF-273 y el CC-137 el medio PCG dio mejor resultado, con el explante estaminoide, mientras que en los clones EET-183 y el ICS- 95 el medio NT1, y el explante pétalo fue el más exitoso. Este resultado se explica por la interacción (<0.0001) que se presentó en el análisis de la varianza para los factores clon, medio y explante (Anexo 1).

Los porcentajes promedio de explantes con embriones fluctuaron entre casi el 60% para el clon UF-273 en el medio PCG y explante estaminoide, hasta 0 para el clon ICS-95 en el medio NT1 y explante estaminoide. Si el resultado de este último tratamiento (59,2%) lo comparamos con el medio NT1 para el mismo clon UF-273 y el mismo explante las diferencias son muy grandes ya que en este último caso solamente se obtuvo en promedio 1,14 embriones por explante. Para obtener la mayor cantidad de embriones en cada clon lo recomendable en el caso del UF-273 es utilizar el medio PCG con el explante estaminoide, con esta combinación se obtuvieron en promedio 155 embriones por cada 100 explantes. Estos resultados son superiores a los obtenidos por Chanatasig (2004) quien obtuvo una frecuencia embriogénica para este clon de 12 % y un número promedio de embriones por explante de 6,67, por lo que el producto de estas dos variables mostraría la posibilidad de obtener alrededor de 80 embriones de cada 100 explantes introducidos. Por otra parte López-Baez *et al.* (2000) en doce clones seleccionados de México obtuvo una respuesta muy variable desde 5,5% hasta 41,0%.

En el genotipo EET-183 la mejor combinación fue el medio NT1 con el explante pétalo, ésta produjo en promedio 6.5 embriones por cada 100 explantes (Cuadro 4).

Cuadro 4. Comparación de la proyección de producción de embriones por cada 100 explantes y 100 flores para cuatro clones de cacao, cultivados en dos medios de cultivo PCG y NT1 para la inducción de la embriogénesis somática.

Clon	Medio	Explante	Número de embriones por cada 100 explantes	Proyección del número de embriones por cada 100 flores
UF-273	PCG	PET	0.09	0.43
UF-273	PCG	EST	154.93	774.63
UF-273	NT1	PET	2.20	11.01
UF-273	NT1	EST	0.05	0.26
EET-183	PCG	PET	1.23	6.16
EET-183	PCG	EST	0.06	0.30
EET-183	NT1	PET	6.51	32.56
EET-183	NT1	EST	0.00	0.01
CC-137	PCG	PET	0.01	0.03
CC-137	PCG	EST	0.04	0.18
CC-137	NT1	PET	0.04	0.20
CC-137	NT1	EST	0.00	0.00
ICS-95	PCG	PET	0.00	0.02
ICS-95	PCG	EST	0.01	0.06
ICS-95	NT1	PET	0.01	0.04
ICS-95	NT1	EST	0.00	0.00

Para el clon CATIE R-7 también existió una interacción entre el medio de cultivo y el explante. El mejor tratamiento se obtuvo al utilizar el medio NT1 con el explante pétalo (Fig. 7).

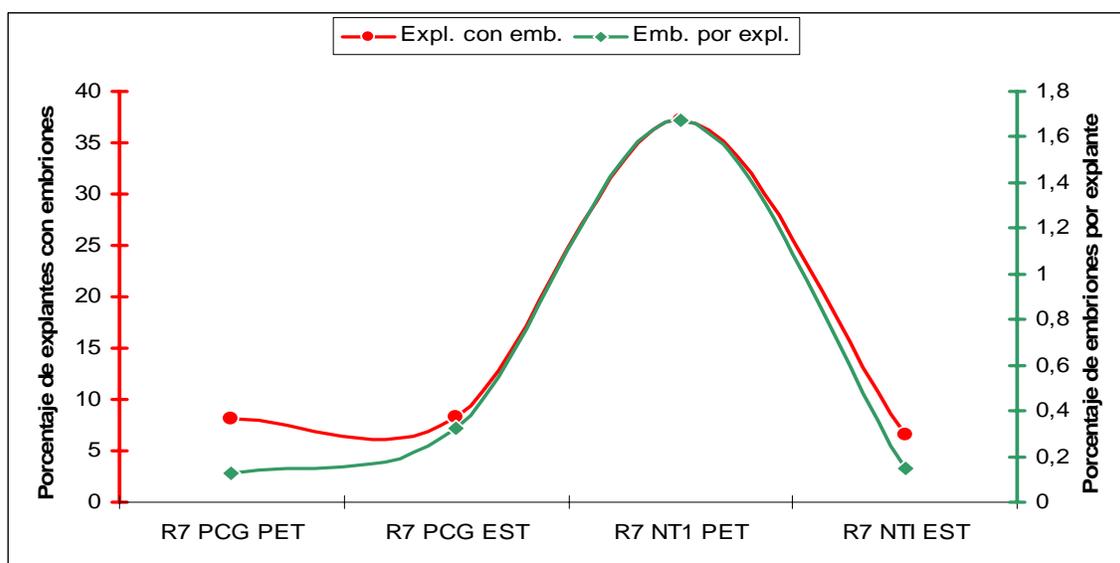


Figura 7. Porcentaje de explantes con embriones para los clones y porcentaje de embriones por explante para el clon CATIE R7 en 2 medios de cultivo (PCG y NT1) y 2 tipos de explante, pétalo (PET) y estaminoide (EST).

Con esta combinación el 37% de los explantes produjeron embriones y el porcentaje más alto de embriones por cada explante (1,67%) también se obtuvo en este mismo tratamiento.

La diferencia es amplia con respecto al segundo mejor tratamiento que resultó de la combinación del medio PCG con el explante pétalo, en este caso el 8,3% de los explantes produjeron embriones con un promedio de 0,32% de embriones por explante.

La producción total de embriones por cada 20 flores; es decir, 100 explantes, fue en promedio de 62 embriones para el tratamiento NT1-Pétalo y de 3 embriones para la combinación PCG-Estaminoide.

La respuesta *in vitro* de los cinco clones evaluados a la inducción de la embriogénesis somática está muy influenciado por factores como medio de cultivo, tipo de explante y genotipo.

Resultados similares han sido determinados por Furtek *et al.* (2000) y Tan *et al.* (2000) donde evaluaron el efecto de la fuente de carbono, medios de cultivo y reguladores de crecimiento en treinta clones, ellos observaron una respuesta embriogénica entre 0% y 18,2%, y determinaron que esta variabilidad en la respuesta estaba influenciada por la interacción dada por la fuente de carbono, los reguladores de crecimiento y el medio basal, por lo tanto, es necesario optimizar el procedimiento para cada genotipo de interés de manera individual con el propósito de obtener altas tasas de éxito.

4.2.2 Experimento Inducción II

El porcentaje de explantes con embriones, fue muy variable ya que fluctuó entre 72,9% en el clon CATIE R6 sobre patrón UF-613, medio PCG y explante estaminoide (EST) y 0% para la combinación de tratamientos clon CATIE R4, sobre patrón IMC67, medio NT1 y explante estaminoide (Cuadro 5). Esta última combinación de tratamientos también fue la que generó el mayor número de embriones por explante con un promedio de 4.89. Si consideramos estas dos variables al mismo tiempo y hacemos una proyección de producción de embriones por cada 100 explantes (20 flores) y por cada 100 flores, podemos destacar que hay cuatro combinaciones que darían la mayor cantidad de embriones. Los cuatro mejores resultados se obtuvieron cuando se utilizó el medio PCG y el explante estaminoide. De éstas, dos pertenecen al clon CATIE R4 y dos al clon CATIE R6; además

dos corresponden al patrón IMC-67 y dos al UF-613. El genotipo UF-613 usado como patrón con el medio PCG y el explante estaminoide resultó mejor que el patrón IMC-67 debido a que produjo mayor número de embriones.

Cuadro 5. Comparación de las medias del porcentaje de explantes con embriones, porcentaje de embriones por explante (PET y EST) y proyección de producción de embriones por explante y por flor para dos clones R4 y R6 injertados sobre los patrones IMC-67 y UF-613 con los medios de cultivo PCG y NT1.

Tratamientos Clon/Patrón/Medio/Explante	Explantes con embriones (%)	Número de embriones por explante	Número de embriones por cada 100 explantes	Proyección de número de embriones por cada 100 flores
1) R4 IMC67 PCG PET	4.1	0.13	0.53	2.67
2) R4 IMC67 NT1 PET	0.7	0.01	0.01	0.04
3) R4 IMC67 PCG EST	30.5	1.57	47.89	239.43
4) R4 IMC67 NT1 EST	0	0.00	0.00	0.00
5) R4 UF-613 PCG PET	0.7	0.01	0.01	0.04
6) R4 UF-613 NT1 PET	2.9	0.04	0.12	0.58
7) R4 UF-613 PCG EST	56.0	3.47	194.32	971.60
8) R4 UF-613 NT1 EST	0.7	0.01	0.01	0.04
9) R6 IMC67 PCG PET	3.8	0.05	0.19	0.95
10) R6 IMC67 NT1 PET	5.4	0.12	0.65	3.24
11) R6 IMC67 PCG EST	53.2	3.61	192.05	960.26
12) R6 IMC67 NT1 EST	3.2	0.05	0.16	0.80
13) R6 UF-613 PCG PET	7.9	0.21	1.66	8.30
14) R6 UF-613 NT1 PET	3.8	0.06	0.23	1.14
15) R6 UF-613 PCG EST	72.9	4.89	356.48	1782.41
16) R6 UF-613 NT1 EST	7.4	0.23	1.70	8.51

Esta es la primera vez que se reporta la influencia del patrón sobre la respuesta *in vitro* en cacao. En el campo, existe la incertidumbre de si el patrón de cacao ejerce influencia directa sobre el desempeño del árbol, ya que se ha observado diferencias en el comportamiento de los árboles de un mismo genotipo injertados sobre diferente patrón; sin embargo, esto aún no ha sido comprobado (Comunicación personal Ing. Antonio Mora CATIE). En otras especies como el limón, el patrón ejerce influencia sobre el contenido de los flavonoides en el jugo de limón, inclusive mediante análisis de cromatografía líquida y espectrofotómetro de masas (HPLC-ESI/MS) se llegó a encontrar dos nuevos tipos de

flavonoides nunca antes descritos en la especie *Citrus limon* injertado sobre *Citrus aurantium* L. y *Citrus macrophylla* (Gil-Izquierdo *et al.* 2004).

Recientemente, Kudo *et al.* (2007) lograron la injertación de plantas de diferente especie mediante experimentos de heteroinjertos usando la papa (*Solanum tuberosum*) como púa de injerto y el tomate (*Lycopersicon esculentum*) como patrón, para probar si una molécula de ARN responsable de cambiar la forma de la hoja puede ser transportada a través de la unión del injerto. Los resultados mostraron que un ARN transmisible del patrón de tomate sin ninguna hoja puede cambiar la morfología de las hojas del vástago de las papas. Por lo tanto, si una planta usada como patrón con la capacidad adquirida de transporte de ARN pudiera ser construida, esto proporcionaría un sistema eficaz para la transformación de plantas a través de injerto. Esta combinación de injerto y el transporte de ARN podrían proporcionar una técnica nueva para la mejora de cultivos hortícolas.

Cuando se utilizó el medio PCG y el explante estaminoide se obtuvo la mayor cantidad de embriones, siendo el número más alto para el clon CATIE R6 con el patrón UF-613 en el cual se obtuvo 356 embriones por cada 100 explantes, para una posible producción de 1782 embriones por cada 100 flores introducidas. Los segundos y terceros mejores promedios de embriones son muy similares entre sí y pertenecen a la combinación de CATIE-R4 / UF-613 con 194 explantes por cada 100 explantes y CATIE-R4 / IMC-67 con 192 embriones por cada 100 explantes en ambos casos con el medio PCG y el explante estaminoide. El cuarto mejor promedio es mucho más bajo que los anteriores, y corresponde al clon CATIE-R4 y patrón IMC-67 el cual produjo 48 embriones por cada 100 explantes. De lo anterior se deduce que para producir una alta cantidad de embriones dentro de un esquema de producción comercial de estos genotipos es imprescindible utilizar el medio PCG y el explante estaminoide. Por otra parte con el medio NT1 y el explante pétalo se obtuvieron resultados muy bajos por lo tanto estarían descartados en caso de querer utilizarlos para producción masiva de los clones CATIE R4 y CATIE R6.

Li *et al.* (1998) utilizando 19 genotipos de los tres grupos genéticos obtuvo embriones en todos ellos cuando utilizó como explante estaminoide y el medio PCG, el porcentaje de embriones somáticos por explante varió de 45,7% para el Sca 6-1 a 1,0% en EET-400.

Los resultados estadísticos indican que existen diferencias significativas entre el porcentaje de embriones por explante de acuerdo al clon, patrón, medio y explante. Se evidenció una interacción altamente significativa para los tratamientos clon-medio-explante ($P= 0.0021$) y patrón-medio-explante ($P= 0.0026$) con un $\alpha=0,01$.

Se realizó un análisis de conglomerados (cluster) para agrupar los 16 tratamientos utilizando la distancia euclidiana y el método de agrupamiento de Ward. De acuerdo al dendograma se ve claramente que los tratamientos se pueden concentrar en dos grupos, el grupo con los mayores números de embriones por explante tiene en común el medio PCG y el explante estaminoide (Fig. 8).

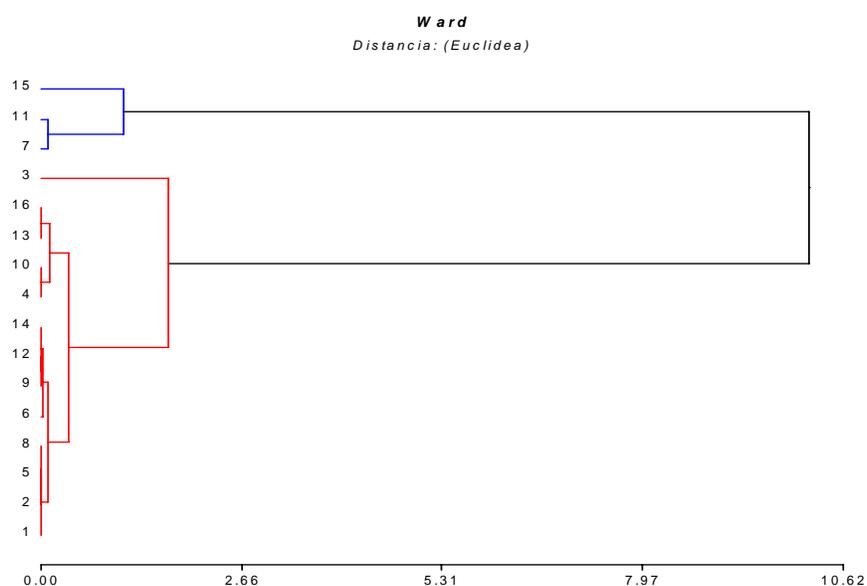


Figura 8. Dendograma del agrupamiento de las 16 combinaciones de los tratamientos evaluados de acuerdo a la producción promedio de embriones por explante descritos en el Cuadro 6, según el método WARD y la distancia Euclidiana.

Es interesante notar que a excepción de la combinación patrón IMC-67 con el explante pétalo, en todos los demás tratamientos el clon CATIE-R6 siempre produjo los mejores resultados de porcentaje de embriones por explante y número promedio de explantes con embriones (Fig. 9).

Si analizamos los resultados de las interacciones clon-medio-explante la combinación que produjo la mayor cantidad de embriones por explante fue CATIE-R6 medio PCG y explante estaminoide con una media de 4.31; por otro lado, el resultado inferior corresponde a la interacción CATIE-R4, medio NT1 y explante estaminoide con

una media de 0.003 embriones por explante. En el caso de los resultados de las interacciones patrón-medio-explante, la mejor combinación fue patrón UF613, medio PCG y explante estaminoide con una media de 4.15, mientras que el resultado más bajo se produjo en la interacción IMC-67, medio NT1 y explante estaminoide con una media de 0.02.

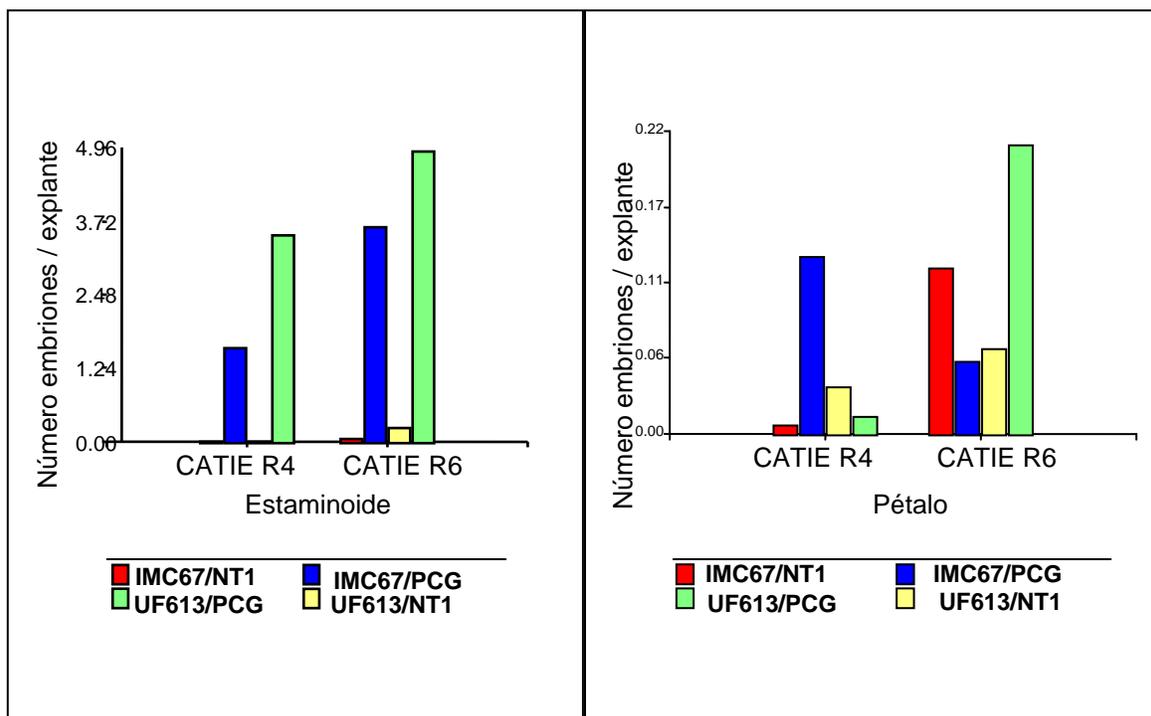


Figura 9. Número de embriones por explante para los clones CATIE R4 y CATIE R6, injertados sobre los genotipos IMC-67 y UF-613 en los medios de cultivo PCG y NT1.

Una de las diferencias entre el medio PCG y el NT1 es que el primero contiene TDZ y el segundo no. Li *et al.* 1998 determinó que el uso de TDZ como regulador inductor de la embriogénesis en cacao incrementó la respuesta embriogénica de los genotipos Laranja, Pound-7 y ICS-1, ellos determinaron que el estaminoide en medio con TDZ incrementó el peso fresco del callo producido a diferencia de los estaminoideos en medio sin TDZ que solamente se expandieron un poco y generaron un callo muy limitado alrededor del corte.

El efecto del TDZ también ha sido estudiado en la micropropagación de otros cultivos como rosa (Barna *et al.* 1995) y chicoria (Yucesan *et al.* 2007) donde se observó que el medio de cultivo con TDZ produjo una mayor cantidad de brotes por explante

comparado con el medio sin TDZ ó medios con otras combinaciones de reguladores de crecimiento.

Otra diferencia es la concentración del regulador 2,4-D en el medio de inducción. El medio PCG contiene 2,4-D a una concentración de 2 mg/l, luego se pasa a un segundo medio de inducción SCG también con 2 mg/l para luego ser transferida a un medio de expresión ED sin hormona. Por su parte el medio NT1 contiene solamente 1mg/l de 2,4-D y luego se transfiere a un medio sin hormona. Esta diferencia en la concentración de 2,4-D y su interacción con otros reguladores probablemente sea la razón por la cual el medio PCG sea mejor que el NT1 en la mayoría de los genotipos. Esta combinación se ajusta al proceso estándar para embriogénesis somática que consiste en la formación de callo en medios de cultivo que contienen auxinas y después se subcultiva a un medio libre de hormona (Reinert, 1967). Por lo general se requiere la presencia de una auxina en el medio para mantener el crecimiento de los cultivos (Halperin, 1995). Además, el tipo y la concentración de auxina empleados son críticos para la inducción y la formación de embriones somáticos. La auxina 2, 4-D ha sido el regulador de crecimiento más eficiente para la inducción de la embriogénesis somática (Merkle, 1995).

4.3 Fase de multiplicación

4.3.1 Inducción de la Embriogénesis Secundaria

La embriogénesis secundaria es un fenómeno por el cual nuevos embriones somáticos son iniciados a partir de embriones somáticos previamente formados.

El uso de la embriogénesis secundaria de cacao proporciona una herramienta muy valiosa para la rápida propagación de un gran número de plantas de genotipos agrónomicamente valiosos. Las ventajas de la embriogénesis secundaria son varias: es una técnica de micropropagación más rápida, alta tasa de multiplicación, independencia de la fuente del explante, mano de obra menos intensiva y un método menos caro que la embriogénesis somática primaria (Raemakers *et al.* 1995, Traore *et al.* 2003).

La embriogénesis somática secundaria también fue observada en otras plantas leñosas, como alcornoque (*Quercus suber*). Estos embriones secundarios con frecuencia se originan de las células epidermales y sub-epidermales (Puigderrajols *et al.* 2001).

Los embriones somáticos utilizados para inducir la embriogénesis secundaria del clon UF-273 eran mucho más pequeños que los de EET-183, la mayoría tenía un tamaño de entre 1 y 4 mm; mientras que los del EET-183 casi todos tenían más de 5mm. Por esta razón para el clon UF-273 fue necesario emplear en promedio tres veces más cantidad de embriones que el EET-183 para alcanzar la cantidad adecuada inicial para cada Petri (Cuadro 6). Estos embriones se cortaron transversalmente, tanto el eje como los cotiledones con bisturí en trozos de 1 mm y se colocaron en el centro de la caja Petri de 60 x 15mm (Fig. 10A).

Cuadro 6. Cantidades totales y promedios de embriones y agregados embriogénicos producidos en la embriogénesis secundaria de los clones UF-273 y EET-183

Genotipo		Embriones iniciales	Embriones producidos	Agregados embriogénicos
UF-273	Totales	606	40a	8a
	Promedio por Petri	24.2	1.6a	0.3a
EET-183	Totales	99	216b	17b
	Promedio por Petri	7.6	22.8b	1.5b

Valores en la columna seguidos por la misma letra, no tienen diferencias significativas de acuerdo con la Prueba de T ($P \leq 0,01$).

Durante los dos primeros meses el color de los fragmentos de embriones fue entre blanco y amarillo. En este período los fragmentos crecen en tamaño casi al doble por lo que fue necesario transferir todo el material a una caja Petri de 100 x 15mm.

Entre el tercer y cuarto mes la mayoría de los trozos de embrión cambian de color amarillo a marrón (Fig. 10B); después del cuarto mes, casi todos los fragmentos son de color café oscuro (Fig. 10C).

A pesar de que algunos investigadores Raemakers *et al.* (1995) Traore *et al.* (2003) consideran que la obtención de embriones secundarios es rápido, en esta investigación el proceso de embriogénesis secundaria resultó ser lento, ya que desde el inicio del cultivo hasta la aparición del primer embrión transcurrieron 105 días en el caso del clon UF-273 y 111 días para el clon EET-183 (Fig. 10C). Sin embargo, resultó ser más rápido que el obtenido por Furtek *et al.* (2000) en el cual para el genotipo de cacao KKM-25 se tardó 7 meses para obtener embriones secundarios a partir del hipocótilo del embrión.

El objetivo principal de la embriogénesis secundaria no es la producción de embriones; sino más bien, la formación de agregados embriogénicos capaces de servir como material idóneo para la proliferación de embriones secundarios; no obstante, la cantidad de embriones producidos fue alta, para el clon EET-183 fue tres veces más alta que la cantidad inicial; además, los embriones producidos presentan una excelente calidad morfológica (Fig. 10D). Estas observaciones coinciden con lo mencionado por Carvalho *et al.* (2003) quienes dicen que los explantes de cotiledones producen un número mucho más alto de embriones normales que la embriogénesis primaria. Este procedimiento ha permitido un aumento de la producción de embriones normales en aquellos genotipos que producen más embriones anormales durante la embriogénesis primaria. Igualmente Traore *et al.* (2003b) expresan que la eficacia del sistema de embriogénesis secundaria que usa embriones somáticos primarios como explantes fue de 4 a 13 veces más alto que el de embriogénesis primaria que utiliza explantes florales.

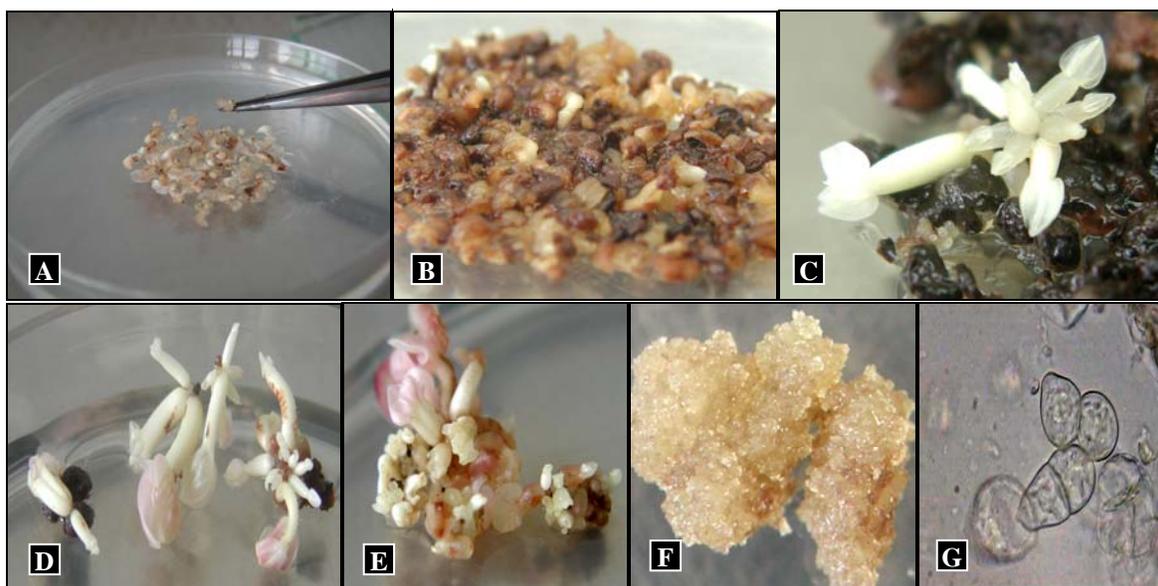


Figura 10. Eventos de la embriogénesis secundaria de cacao. A: Día inicial mostrando los fragmentos de embriones. B: 3 meses de cultivo. C: Aparición de los primeros embriones secundarios a los 5 meses. D: Morfología de los embriones formados. E: Agregado embriogénico. F: Callo embriogénico friable. G: Células embriogénicas y proembrión en el callo friable vistas al microscopio de luz (20X).

Como se muestra en el Cuadro 6, la diferencia principal en el resultado de la embriogénesis secundaria entre los dos clones se da principalmente en la cantidad de

embriones producidos. La cantidad de embriones obtenida en el clon EET-183 es en promedio 14 veces mayor que la obtenida por el clon UF-273. En el primer caso por cada Petri se obtuvieron 22,8 embriones, mientras que en el segundo fue apenas de 1,6 por cada Petri.

Nuevamente queda de manifiesto el efecto genotípico que caracterizó los resultados de las anteriores fases. En cuanto a la formación de agregados embriogénicos el resultado fue muy similar ya que el clon EET-183 produjo en promedio 1,5 agregados por Petri mientras que el UF-273 solamente 0,3 para una relación de 5 veces más a favor del clon EET-183 (Fig. 10 F). Estas diferencias, tanto en la producción de embriones como en la formación de agregados embriogénicos son estadísticamente significativas (Cuadro 7) de acuerdo con la prueba T ($P \leq 0,01$).

Contrario a lo esperado, durante el transcurso del octavo mes en dos cajas Petri del clon UF-273 aparecieron callos de color amarillo friable (Fig. 10F). Al observarlos al microscopio presentaban células con buen contenido citoplasmático y en proceso activo de división celular, también fue posible observar la formación de proembriones dentro del callo, estas observaciones evidencian que el callo formado es embriogénico (Fig. 10G). Este descubrimiento es muy valioso debido a que en cacao el producto de la embriogénesis secundaria no es un callo sino más bien agregados celulares conformados por proembriones y embriones. La obtención de callo con características embriogénicas abre la posibilidad de iniciar suspensiones celulares en medio líquido, lo que favorecería la proliferación de células embriogénicas y beneficiaría la disponibilidad permanente de células embriogénicas para iniciar el proceso de regeneración.

4.4 Fase de desarrollo de embriones

4.4.1 Efecto del tamaño inicial del embrión somático

El potencial para usar embriones somáticos para la propagación a gran escala de genotipos élite de cacao producto de programas de mejoramiento genético requiere de muchos requisitos. Antes de utilizar esta herramienta es importante que las plantas regeneradas vía embriogénesis somática tengan un buen desarrollo. El crecimiento de los

embriones somáticos en plantas esta influenciado por aspectos como los tratamientos dados durante la fase *in vitro* y durante la fase de establecimiento *ex vitro* (Högberg *et al.* 2001).

Luego de la formación del embrión, ocurre la maduración, período de desarrollo del embrión en el cual ocurre la expansión celular y la deposición de las reservas. En los protocolos de inducción de la maduración se han evaluado diferentes componentes del medio que desempeñan un papel importante en este proceso, entre ellos fuentes nitrogenadas, carbonadas y reguladores del crecimiento (Merkle *et al.* 1995).

En cacao no es sencillo obtener embriones somáticos a partir de explantes florales, una dificultad adicional es la conversión de esos embriones en plantas. Muchos factores han sido estudiados para mejorar la maduración e incrementar la conversión en planta como la adición de ácido abscísico (ABA) y ácido giberélico (GA3) al medio de desarrollo (Furtek *et al.* 2000), modificación de las sales minerales, reguladores de crecimiento, tipo y concentración de fuente de carbono (Lopez-Baez *et al.* 2000) adición de KNO₃ (Traore *et al.* 2000). Sin embargo, ningún estudio reporta la evaluación del tamaño óptimo del embrión para iniciar el desarrollo y la conversión en planta.

Los embriones de 13 tratamientos de los 16 evaluados (81%) tuvieron su mayor crecimiento durante el primer mes de cultivo (Fig. 11). De los tres tratamientos restantes, uno tuvo su mayor crecimiento durante el segundo mes (UF-273, medio PEC y tamaño inicial 4-6mm), otro durante el tercero (UF-273, medio PEC y tamaño inicial +6mm) y otro durante el cuarto mes (EET-183, medio PEC, tamaño inicial 2-4).

El Cuadro 7 muestra un análisis comparativo el cual revela que los embriones del clon EET-183 tuvieron un crecimiento significativamente mayor comparado con el clon UF-273, durante el primer y cuarto mes de cultivo; además, el clon EET-183 fue superior con respecto a la variable crecimiento total de embriones.

En cuanto al medio de cultivo se observa que en todos los meses siempre los embriones que crecieron en el medio PEC tuvieron un mejor crecimiento que los que se desarrollaron en el medio G-80/ENR6.

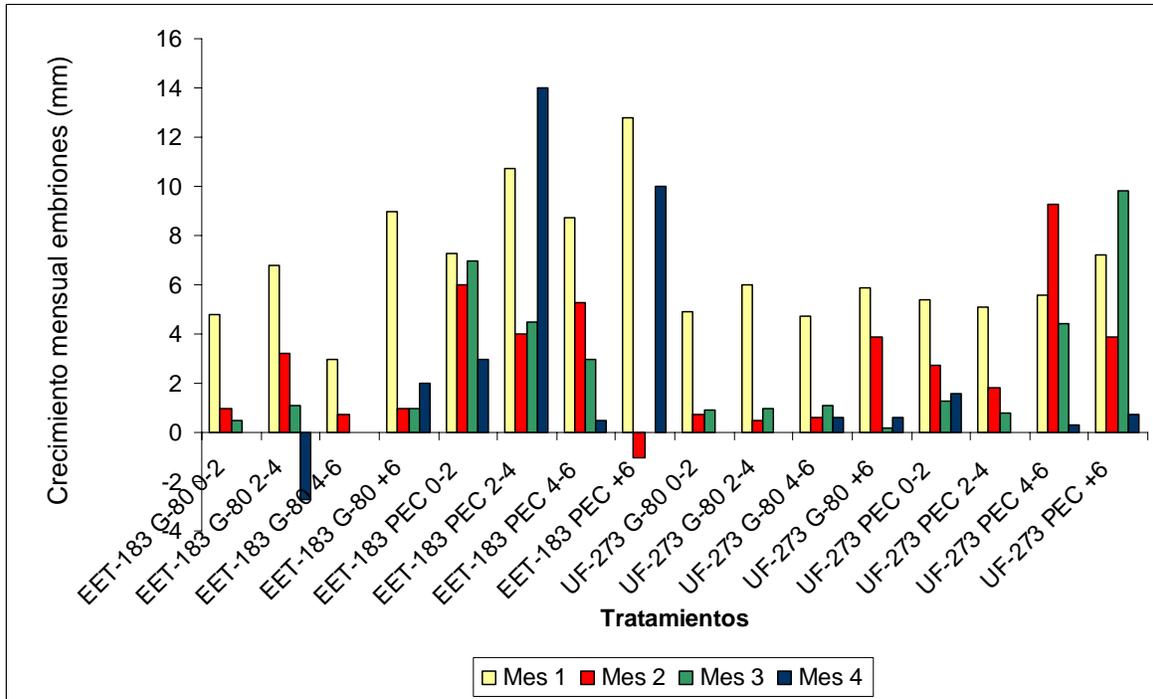


Figura 11. Dinámica del crecimiento mensual (mm) de los embriones somáticos de los clones EET-183 y UF-273 en los medios de cultivo PEC y G-80/ENR6 con cuatro tamaños de embrión inicial durante un período de 4 meses.

Cuadro 7. Comparación de las medias de crecimiento mensual y total de los embriones somáticos para cada uno de los factores estudiados clon, medio de cultivo y tamaño inicial del embrión.

Tratamiento	Mes 1	Mes 2	Mes 3	Mes 4	Crecimiento Total
Clon EET-183	7.98 a	2.97 a	2.40 a	1.47 a	17.81 a
Clon UF-273	5.53 b	2.77 a	2.19 a	0.49 b	10.69 b
Medio PEC	6.99 a	4.02 a	3.70 a	2.40 a	18.72 a
Medio G-80	5.50 b	1.61 b	0.84 b	-0.31 b	8.60 b
Tamaño 0-2	5.30 b	2.24 a	1.65 b	1.00 a	12.46 a
Tamaño 2-4	6.70 ab	2.12 a	1.63 b	0.50 a	12.28 a
Tamaño 4-6	5.28 b	4.37 a	2.27 ab	0.40 a	12.08 a
Tamaño +6	7.76 a	3.04 a	4.69 a	1.70 a	15.50 a

Valores en la columna seguidos por la misma letra no tienen diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Duncan ($P \leq 0,01$).

La diferencia fue estadísticamente significativa para todos los meses; sin embargo, durante los meses 2, 3 y 4 ésta fue más evidente. También en el crecimiento total de los embriones la diferencia en tamaño fue de más del doble a favor del medio PEC.

El tamaño inicial del embrión fue un factor que influyó en el crecimiento del embrión de manera significativa durante los meses 1 y 3; sin embargo, en el crecimiento total de los embriones al finalizar el cuarto mes de cultivo no hubo diferencia significativa con respecto a ese factor. La diferencia en crecimiento total de los embriones al final de los cuatro meses entre el tamaño inicial menor (0-2mm) y el tamaño inicial mayor (+6mm) fue de 3,04mm (Cuadro 7).

El crecimiento total al final del experimento fue muy heterogéneo, la diferencia entre el crecimiento mayor y el menor fue de 46,5 mm (Fig. 12). El crecimiento mayor correspondiente al tratamiento: clon EET-183, medio de cultivo PEC y tamaño inicial 2-4mm fue de 51,5mm mientras que el crecimiento menor (5,0mm) corresponde al tratamiento: clon EET-183, medio de cultivo G-80 y tamaño inicial 4-6mm.

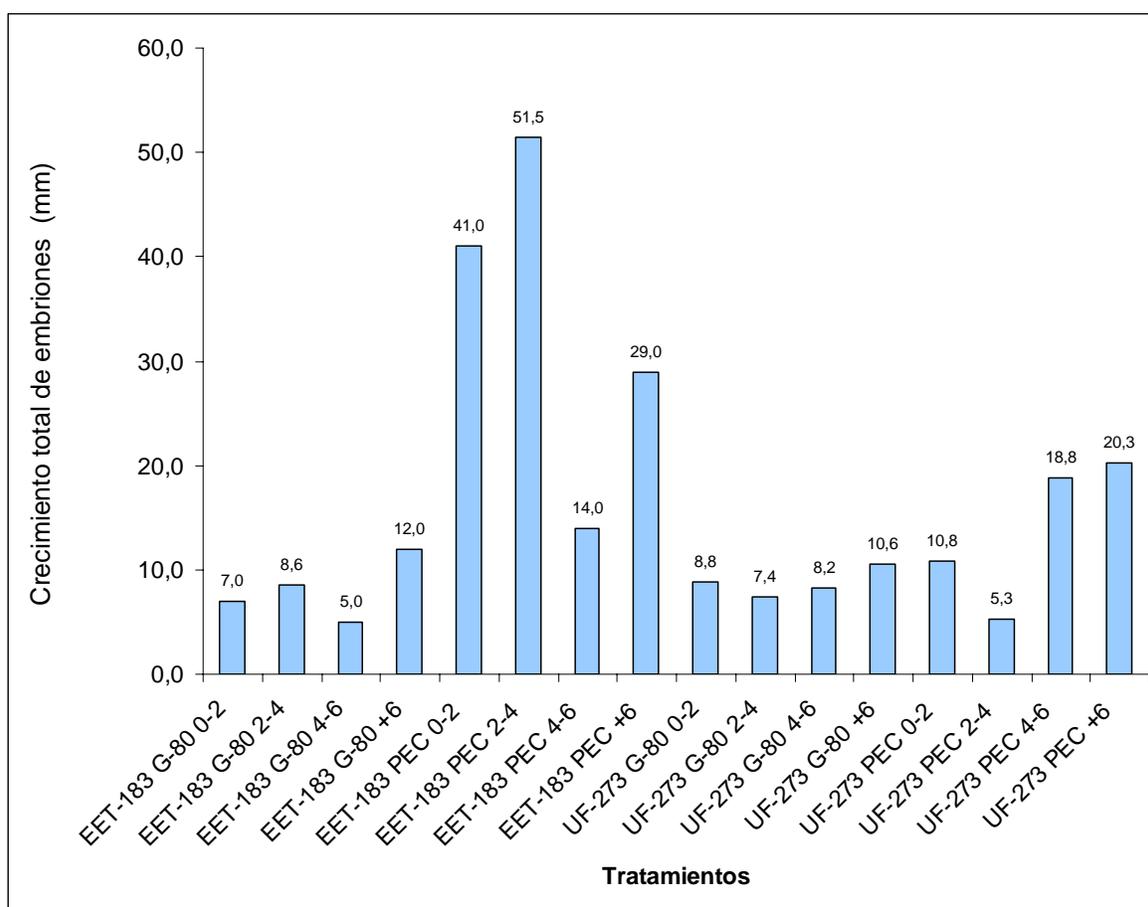


Figura 12. Crecimiento total (mm) al final de los cuatro meses de cultivo de los embriones somáticos de dos clones en dos medios de cultivo y con cuatro tamaños de embrión inicial.

La Figura 13 muestra los resultados de la evaluación de las variables cualitativas de los embriones, en ella se observa que el porcentaje de contaminación fue alto, esto puede deberse a que los embriones eran extraídos del tubo vial y debían ser medidos mensualmente con ayuda de un papel milimétrico colocado debajo de un vidrio transparente estéril. Esto a pesar de que se realiza en condiciones asépticas siempre representa un riesgo de contaminación por la manipulación excesiva que el método requiere.

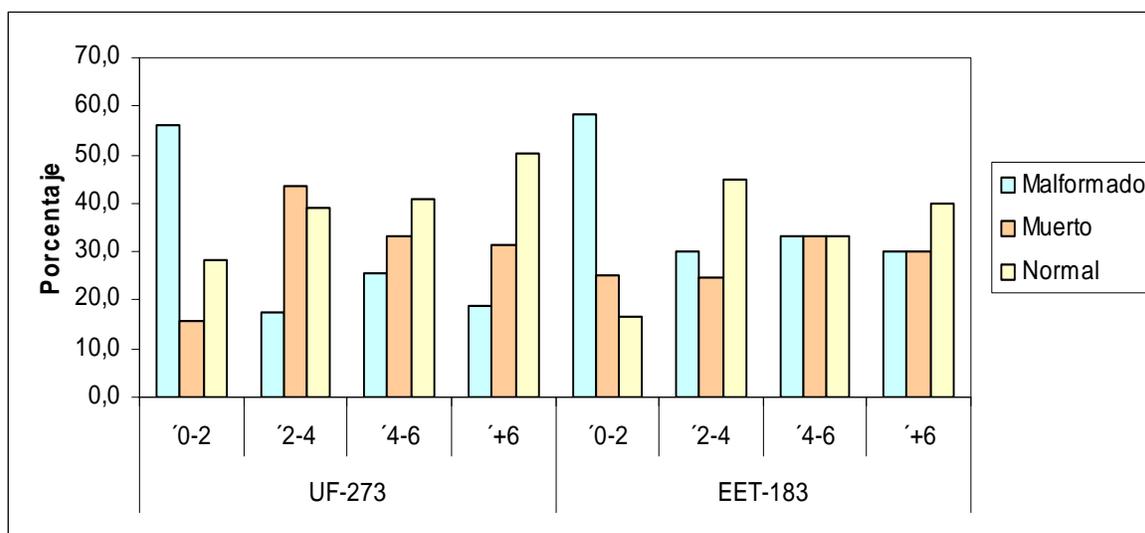


Figura 13. Variación del porcentaje de embriones malformados, muertos y normales durante un período de desarrollo de cuatro meses para embriones de los clones UF-273 y EET-183 en cuatro tamaños iniciales de embriones.

En todo proceso de conversión en planta de embriones somáticos la malformación y muerte son aspectos que deben evitarse. En este experimento se observó que el tamaño inicial de embrión de 0-2mm fue el que presentó el valor más alto de embriones malformados tanto en el clon EET-183 como en el UF-273. Por el contrario, el tamaño inicial de embrión de más de 6mm para el clon UF-273 fue el que mayor cantidad de embriones normales produjo (Fig. 13). La fusión del eje embrionario, el eje extremadamente torcido, la ausencia de meristemo apical o radical y el crecimiento excesivo de los cotiledones fueron cuatro de las malformaciones más recurrentes detectadas en este experimento (Fig. 14). Estas mismas malformaciones fueron detectadas anteriormente en embriones somáticos de cacao (Maximova *et al.* 2000, Alemanno *et al.* 1996).

El medio de cultivo G-80/ENR-6 presentó menor cantidad de embriones malformados que el medio PEC independientemente del clon evaluado; sin embargo, el medio PEC mostró la menor cantidad de embriones muertos (Fig. 15).



Figura 14. Malformaciones más recurrentes detectadas en los embriones de cacao. A) Eje torcido. B) Ejes fusionados. C) Cotiledones anormalmente grandes.

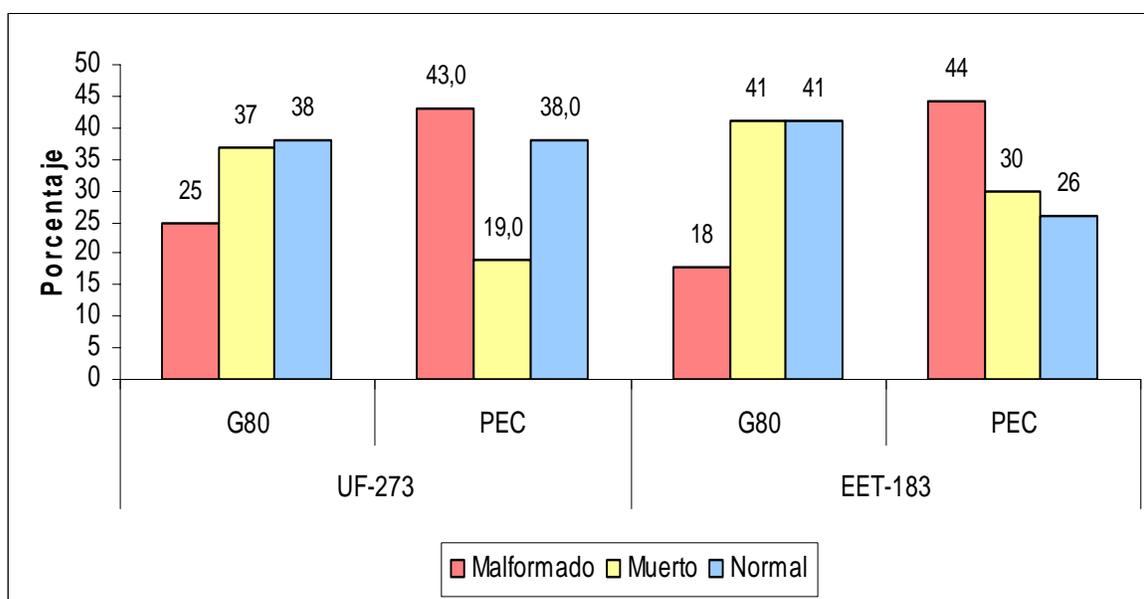


Figura 15. Variación del porcentaje de plantas malformadas, muertas y normales durante un período de desarrollo de embriones de 4 meses para 2 clones y 2 medios de cultivo.

4.4.2 Desarrollo de embriones somáticos en medio líquido y medio sólido

La utilización de medios de cultivo líquidos en sistemas de inmersión temporal para mejorar la eficiencia en la propagación de cultivos *in vitro* ha sido investigada anteriormente en otros cultivos como banano (Alvard *et al.* 1993; Teisson *et al.* 1994), hule (Etienne *et al.* 1995), café (Etienne-Barry *et al.* 1999; Albarrán 1999; Solano 2001). Estas

investigaciones han logrado mejorar las tasas de conversión en planta; sin embargo, el uso de medios líquidos puede ocasionar la aparición de desordenes fisiológicos como la hiperhidricidad (Debergh *et al.* 1983). Para lograr el paso directo de las plantas del recipiente de inmersión temporal al invernadero es necesario crear condiciones ideales de maduración y germinación en el bioreactor (van Boxtel *et al.* 1996; Albarrán *et al.* 2005).

Hasta el momento, en cacao no ha sido descrito en ninguna investigación el uso de bioreactores de inmersión temporal para el desarrollo de los embriones somáticos. El cuadro 8 muestra los resultados preliminares del cultivo de embriones somáticos de cacao del clon CATIE-R4 injertado sobre UF-613 en medio de cultivo sólido y líquido utilizando tres densidades de siembra 10, 20 y 40 embriones por recipiente de inmersión temporal (RITA[®]).

Cuadro 8. Valores promedios del número de plantas con hojas verdaderas, raíces, embriones malformados y muertos en medio líquido y sólido a las densidades de 10, 20 y 40 embriones por recipiente RITA[®].

Medio / Densidad	Embriones con hojas verdaderas	Embriones con raíces	Embriones malformados	Embriones muertos	Embriones Secundarios
Sólido 10	1,6 a ¹	6,2 bc	3,4 bc	0,8 b	0,8 b
Sólido 20	3,5 a	9,0 ab	7,5 ab	1,5 b	8,0 ab
Sólido 40	2,5 a	9,5 a	10,5 a	9,5 a	3,5 ab
Líquido 10	3,25 a	8,0 abc	2,8 bc	1,3 b	9,5 a
Líquido 20	0,0 a	5,5 c	1,0 c	3,0 b	1,0 b
Líquido 40	2,5 a	2,0 d	2,5 bc	4,0 b	1,0 b

^{1/}=Valores en la columna seguidos por la misma letra no tienen diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Duncan (P<=0,01).

Si se suma las plantas malformadas y muertas se observa que en la densidad de 40 embriones por recipiente se presentó la mayor cantidad de embriones muertos y malformados tanto en medio líquido como en medio sólido (Cuadro 8).

En la Figura 16 se observa que el medio sólido en cualquiera de las tres densidades siempre presentó un número mayor de embriones malformados en comparación con el medio líquido. Además, se nota que conforme aumenta la densidad de cultivo la tendencia es que aumente el número de embriones malformados y muertos.

Por el contrario la cantidad de embriones normales aumenta conforme aumenta la densidad de cultivo en el medio líquido contrario a la tendencia observada en el medio sólido (Fig. 17).

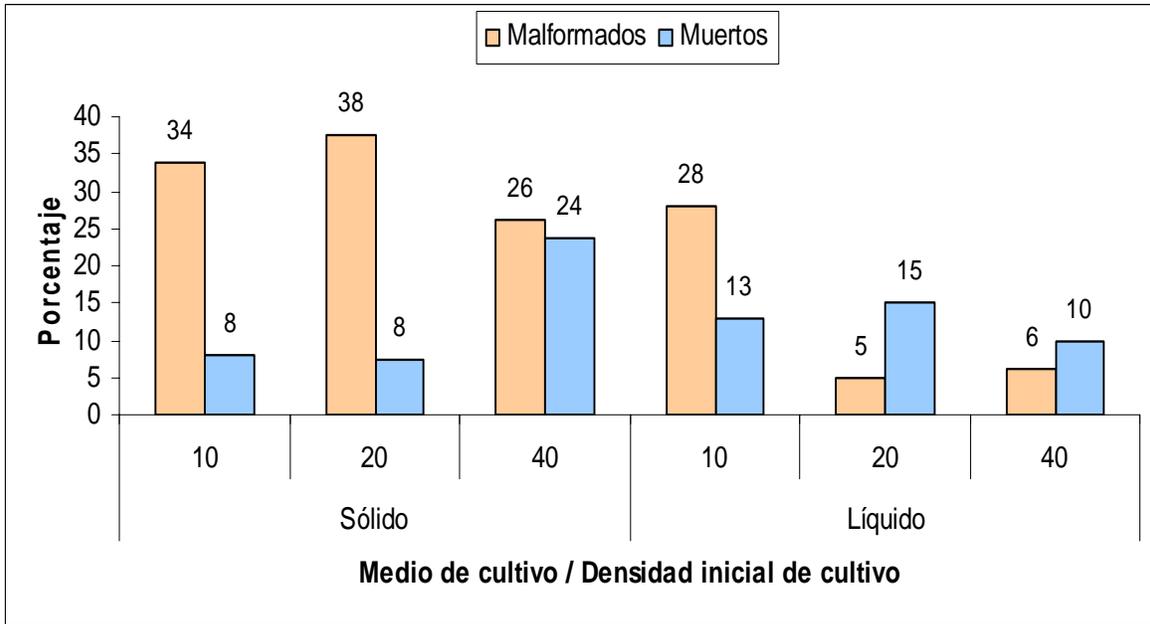


Figura 16. Comparación de la cantidad de embriones muertos y malformados desarrollados en medio líquido y sólido en las densidades iniciales de cultivo de 10, 20 y 40 embriones por recipiente.

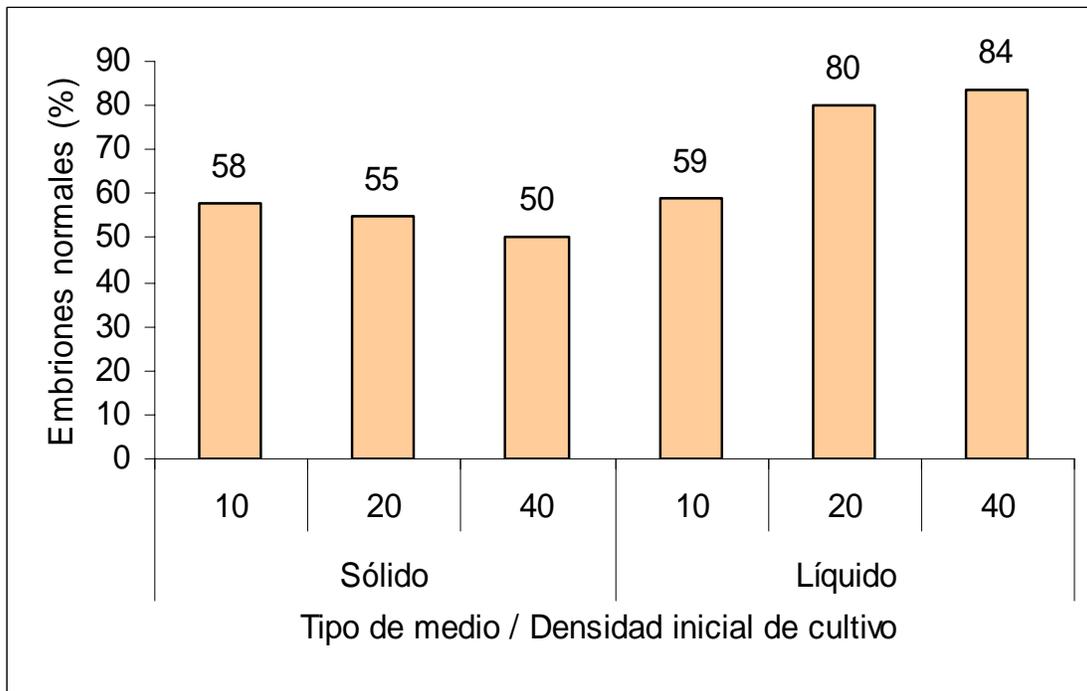


Figura 17. Comparación del porcentaje de embriones normales desarrollados en medio líquido y sólido en las densidades iniciales de cultivo de 10, 20 y 40 embriones por recipiente RITA®.

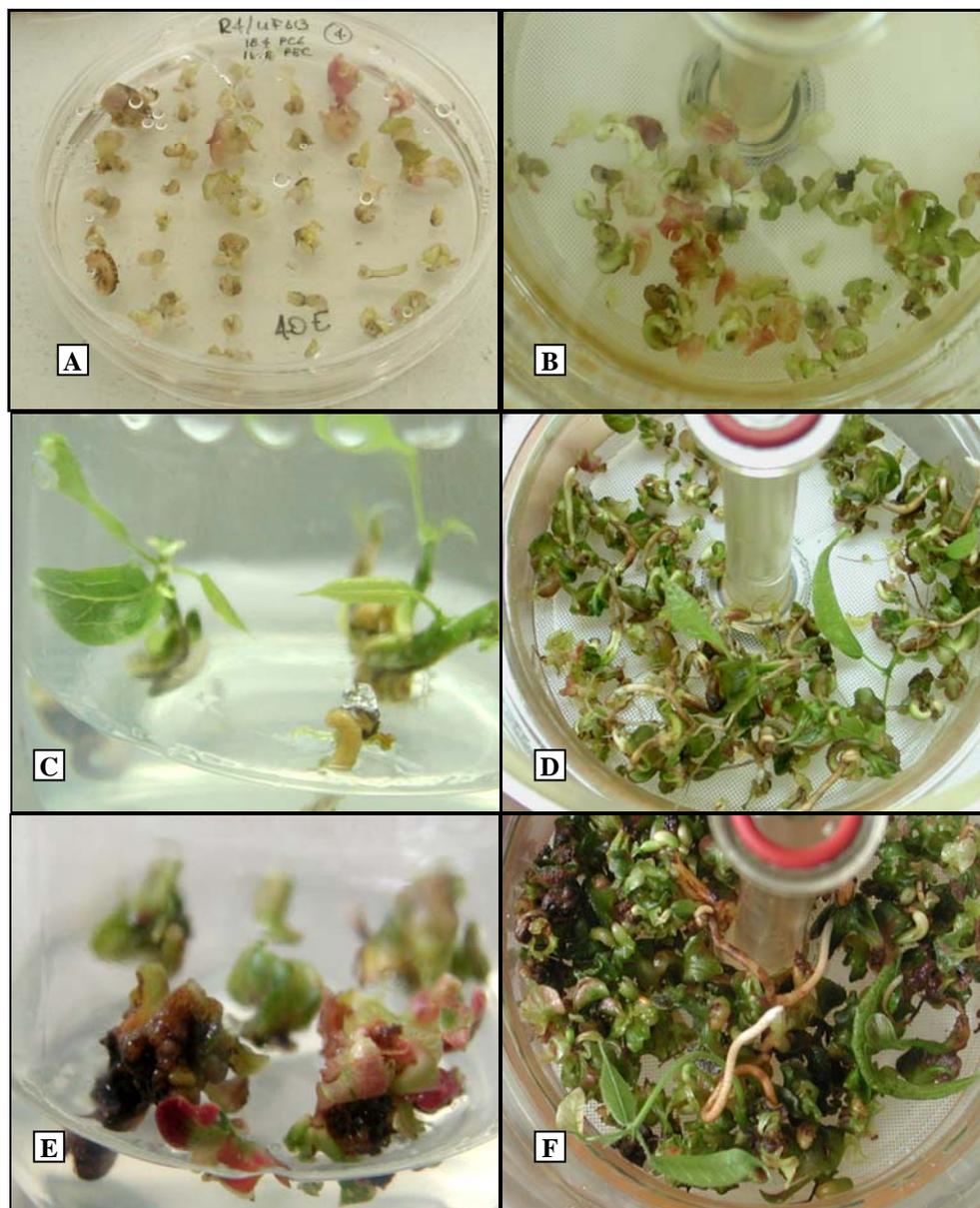


Figura 18. A) Embriones en medio sólido a densidad de 40 embriones por caja Petri a quince días de iniciado el experimento. B) Embriones en medio líquido a una densidad de veinte embriones por RITA a quince días del inicio del experimento. C) Plantas desarrolladas en medio sólido con dos meses de desarrollo. D) Plantas en RITA con dos meses de desarrollo. E) Embriones muertos y malformados en medio sólido con dos meses de desarrollo. F) Plantas con hojas verdaderas, raíces y embriones secundarios en RITA a una densidad de 40 embriones por recipiente y con dos meses de desarrollo, una de las plantas con hojas verdaderas está hiperhídrica.

La formación de hojas verdaderas y raíces en los embriones somáticos son parámetros que se podrían considerar relacionados con el desarrollo y la conversión en planta. En términos generales, se determinó que la mayor cantidad de plantas con hojas verdaderas se obtuvo en el medio sólido a la densidad de 20 embriones por recipiente y en el medio líquido a la densidad de 10 embriones por RITA[®] fue la mejor; sin embargo, no hay diferencias significativas para este parámetro tanto para el medio de cultivo como para la densidad de cultivo. Esto se debe posiblemente a que el experimento se encuentra aún en curso de evaluación por lo que no se ha determinado una tendencia concluyente y clara para estos parámetros.

Las malformaciones más recurrentes tanto en el medio líquido como el sólido (Fig 18E) fueron ejes fusionados, cotiledones muy grandes y ejes torcidos. De todas las plantas con hojas verdaderas desarrolladas en medio líquido dos presentaban hiperhidricidad (Fig. 18F); sin embargo, este fenómeno también fue observado en medio sólido.

El tiempo requerido en medio líquido para realizar los cambios de medio es 50% menos que en medio sólido. Esta misma tendencia fue observada por Solano (2001) en café donde el tiempo de manipulación en una producción de 9000 embriones en inmersión temporal fue 87% menos que el tiempo requerido para la misma cantidad de embriones en medio sólido.

La optimización del proceso de embriogénesis somática de cacao en medio líquido, por ejemplo bioreactores, será de gran importancia económica ya que permitiría la producción a gran escala de grandes cantidades de plantas a un costo reducido (Lopez-Baez *et al.* 2000). Aún así, nada aún garantiza que el uso de los bioreactores tendrán un papel relevante en los procedimientos industriales de propagación de plantas usados en el futuro (Etienne *et al.* 2006).

4.5 Fase de aclimatación

En la fase de aclimatación se pretende que las plantas que han crecido *in vitro* y por lo tanto sólo han estado expuestas a un microambiente controlado con condiciones mínimas de estrés y casi óptimas condiciones para la multiplicación de las plantas, se adapten a condiciones *ex vitro* (Lopez 1996).

López-Baez *et al.* (1999) estudiaron la tasa de conversión en planta, el desempeño *ex vitro*, y la estabilidad genética en campo de las plantas de cacao derivadas de embriones somáticos. Las plantas regeneradas con al menos dos hojas fueron transferidas por estos autores a un invernadero y más tarde aclimatadas. De las 385 plantas aclimatadas, 220 (57%) sobrevivieron. Todos los árboles regenerados conservaron el ploidía original y presentaron un desarrollo al parecer normal en condiciones de campo; después de 15 meses ellos formaron la horqueta y entre 15 y 24 meses iniciaron la floración y fructificación (Masseret *et al.* 2005).

En la presente investigación se aclimataron 25 plantas del clon UF-273 con tres pares de hojas y buena morfología (Fig.20 A,B,C) en cada tratamiento. Durante el primer mes de aclimatación la sobrevivencia de las plantas sembradas en el sustrato de pellets Jiffys® fue de un 12% mayor que en el sustrato mezcla; no obstante, esa diferencia desapareció en el segundo mes ya que ambos porcentajes fueron iguales (Fig. 20 D,E) y más bien al final del tercer mes, cuando las plantas fueron transplantadas a bolsa, había un mayor número de plantas en el sustrato mezcla (Figura 19).

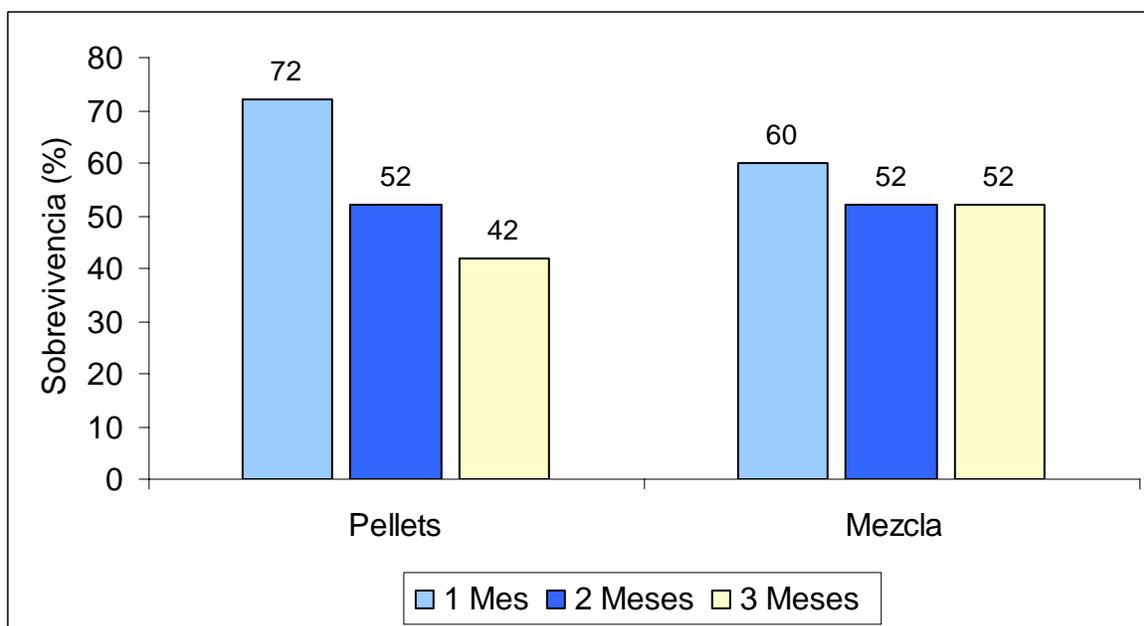


Figura 19. Porcentaje de sobrevivencia de plantas del clon UF-273 en fase de aclimatación en invernadero sobre dos tipos diferentes de sustrato en tres tiempos de evaluación.



Figura 20. A) Plantas antes de ser aclimatadas. B) Siembra en pellets Jiffys. C) Siembra en sustrato. D) Desarrollo de plantas en sustrato dos meses después del trasplante. E) Desarrollo de plantas en pellets dos meses después del trasplante. F) Transplante a bolsa de plantas producidas en sustrato. G) Transplante a bolsa de plantas producidas en pellets. H) Plantas después de tres meses de aclimatación.

Aunque los pellets resultaron un mejor sustrato de aclimatación al inicio del experimento, conforme transcurrió el tiempo perdió efectividad y más bien en el momento del trasplante a bolsa (Fig. 20 F,G,H) eran menos las plantas sobrevivientes en este sustrato. Este comportamiento puede deberse a que los pellets son un sustrato individualizado para cada planta por tal motivo es difícil mantener una humedad uniforme para todas; incluso, a pesar de que el riego fue homogéneo y permanente para todos, algunos pellets se mostraban muy húmedos y otros un poco secos, pese a que se encontraban todos juntos en el mismo lugar. Con la mezcla no ocurrió lo mismo ya que todas las plantas se encontraban sembradas en una misma bandeja plástica donde la humedad era constante para todas las plantas.

Posiblemente, otro factor que influyó en la pérdida de eficacia de los pellets es que a pesar de que se hicieron fertilizaciones foliares periódicas, es un sustrato inerte por lo que no tiene ningún nutriente que suplir a las plantas a través de las raíces; por el contrario, la mezcla tiene más de 40% de suelo que contiene nutrientes que la planta puede sustraer continuamente.

5. CONCLUSIONES

1. En el proceso de inducción de la embriogénesis somática existe una interacción significativa entre los factores medio de cultivo, tipo de explante y genotipo, por lo que es difícil concluir de manera definitiva para un solo factor de forma individual.
2. Se determinó una interacción directa entre el medio de cultivo y el tipo de explante. En los clones UF-273, CC-137, CATIE R4 y CATIE R6 la mayor producción de embriones se obtuvo con el medio PCG y el explante estaminoide; por el contrario los clones EET-183, ICS-95 y CATIE R7 la mejor respuesta fue cuando se utilizó el medio de cultivo NT1 con el explante pétalo.
3. El patrón sobre el cual está injertado el clon afecta significativamente la respuesta *in vitro* de ese clon. Los clones CATIE R4 y CATIE R6 injertados sobre el patrón UF-613 tuvieron una mejor respuesta en la producción de embriones.
4. Se obtuvo la embriogénesis secundaria en los clones EET-183 y principalmente en el clon UF-273. En este último se observó un callo embriogénico friable que podría servir como material de inicio de suspensiones celulares. Esto no solamente favorecería la disponibilidad permanente de material embriogénico sino que también haría crecer de manera exponencial los cultivos embriogénicos y potencialmente la cantidad de plantas.
5. Para los clones EET-183 y UF-273, el mejor medio de cultivo para el desarrollo de los embriones y lograr una buena conversión en planta fue el medio PEC. El tamaño inicial de embrión de más de seis milímetros (+6mm) fue el que menos cantidad de embriones muertos y malformados produjo.
6. Es posible el desarrollo de embriones y la conversión en planta en medio líquido en recipientes con inmersión temporal. Durante la fase de desarrollo, las plantas en

medio de cultivo líquido (RITA[®]) presentaron un porcentaje menor de embriones malformados y muertos, con respecto al medio sólido.

7. La aclimatación de plantas del clon UF-273 fue posible con buen resultado en dos tipos diferentes de sustrato, lo que permitirá evaluar el comportamiento agronómico en el campo de las plantas producidas *in vitro*.

8. Los resultados obtenidos en esta investigación sirven de base para mejorar el proceso de multiplicación de plantas de cacao por medio de la embriogénesis somática, lo que abre la posibilidad de en el futuro establecer un protocolo eficiente de multiplicación masiva de los clones seleccionados por el Programa de Mejoramiento Genético del CATIE.

6. RECOMENDACIONES

- Es necesario profundizar la investigación sobre el efecto de los portainjertos en la respuesta embriogénica del clon y abarcar la totalidad de los portainjertos que se dispongan para los clones de interés con el propósito de corroborar el resultado obtenido y observar el efecto de nuevos portainjertos.
- Iniciar suspensiones celulares con el callo embriogénico friable encontrado en la embriogénesis secundaria para determinar la viabilidad de proliferación de las células embriogénicas y su capacidad de regeneración.
- Continuar la investigación del desarrollo de plantas en medio líquido en inmersión temporal, evaluando más densidades de cultivo, tiempos y frecuencias de inmersión.
- Iniciar ensayos tendientes a mejorar la conversión en planta para disminuir las anomalías y las plantas muertas.
- Llevar a campo las plantas aclimatadas para evaluar el comportamiento agronómico de las plantas producidas *in vitro* y determinar la posible existencia o no de variantes somaclonales.

7. LITERATURA CONSULTADA

- Adriazola, DJ. 2003. Producción del alimento de los dioses (*Theobroma cacao* L.) Universidad Nacional Agraria de la Selva Tingo María. Perú. 81 p.
- Adu-Ampomah, Y; Novak, F; Afza, R; Van Duren, M; Perea-Dallos, M. 1988. Initiation and Growth of Somatic Embryos of Cocoa (*Theobroma cacao*). *Café, Cacao, Thé* 32(3): 187-199
- Aguilar, ME; Villalobos, V; Vásquez, N. 1992. Production of Cocoa Plants (*Theobroma cacao* L.) vía Micrografting of Somatic Embryos. *In Vitro Cell. Dev* 28: 15-19.
- Ahnert, D. 2000. Use of QTL for Witches' Broom Resistance in Cocoa Breeding. *In Proceedings of the International Workshop on new Technologies and Cocoa Breeding*. Ingenic. Kota Kinabalu, Malaysia. 16-17 Octubre 2000.116-119 p.
- Aime, MC; Phillips-Mora, W. 2005. The causal agents of witches' broom and frosty pod rot of cocoa (*Theobroma cacao*) form a new lineage of Marasmiaceae. *Mycologia*. 97(5) 1012-1022.
- Albarrán, G. 1999. Influencia de los factores químicos y físicos sobre la regeneración de embriones somáticos de *Coffea arabica* en bioreactor simplificado. Tesis Mag. Sc. Turrialba, CR, CATIE. 100p.
- Albarrán, G; Bertrand, B; Lartaud, M; Etienne, H. 2005 Cycle characteristics in a temporary immersion bioreactor affect regeneration, morphology, water and mineral status of coffee (*Coffea arabica* L.) somatic embryos. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 81:27-36.

- Alemanno, L, 1995. Embryogenese Somatique du Cacaoyer *Theobroma cacao* L. Contraintes, Progres et Perspectives. Tesis Doctoral. Montpellier, Francia, Universite Montpellier II. 194 p.
- Alemanno, L; Berthouly, M; Michaux-Ferriere, N. 1996. Histology of somatic embryogenesis from floral tissues of cocoa. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 46:187-194.
- Alemanno, L; Berthouly, M; Michaux-Ferriere, M. 1997. A Comparision between *Theobroma cacao* L. Zigotic Embryogenesis and Somatic Embryogenesis from Floral Explants. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant.* 33:163-172.
- Alvard D., Cote F. y Teisson C. 1993. Comparison of methodes of liquid culture for banana propagation. Effects of temporary immersion of explant. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 32:55-60.
- Andebrhan, T. 1986. Witches' Broom, *Crinipellis pernicioso* (STAHEL) Singer: Principal diseases of Cacao (*Theobroma cacao* L.) in the Brazilian Amazon. p. 479–487.
- Archibald, J. 1954. Culture *in vitro* of cambial tissue of cacao. *Nature* 173: 351-352.
- Arciniegas, A. 2005. Caracterización de árboles superiores de cacao (*Theobroma cacao* L.) seleccionados por el programa de mejoramiento genético del CATIE. Tesis Mag. Sc. CATIE. Turrialba, Costa Rica. 126 p.
- Arévalo, E; Zúñiga, L; Arévalo, C; Adriazola; J. 2004. Cacao: Manejo integrado del cultivo y transferencia de tecnología en la Amazonía peruana. Instituto de cultivos tropicales. Perú. 184 p.
- Ariefdjohan MW, Savaiano DA. (2005) Chocolate and cardiovascular health: is it too good to be true? *Nutrition Reviews.* 63:427-30.

- Astorga, C. 2001. Mejoramiento genético. *In*. Memorias Semana Científica CATIE. Mejoramiento genético y conservación de cultivos agrícolas y especies forestales. pag. 51-59.
- Angiosperm Phylogeny Group (2003). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. *Botanical Journal of the Linnean Society*. 141:399-436.
- Barna, KS; Wakhlu, AK. 1995. Effects of thidiazuron on micropropagation of rose. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 31:44-46.
- Bowers, JH; Bailey, BA; Hebbar, PK; Sanogo, S; Lumsden, RD. 2001. The impact of plant diseases on world chocolate production. *American Phytopathological Society. APSnet Feature Story*, 1-28.
- Carvalho, E; Domingos, D; Santos, LC; Machado, R; Martin-Aitken W. 2003. Propagation of cocoa trees (*Theobroma cacao*, L.) Via somatic embryogenesis. 14th International Cocoa Research Conference. 425-430.
- CATIE (Centro Agronómico de Investigación y Enseñanza Tropical). 2007 Datos Meteorológicos (en línea). San José, CR. Consultado 5 oct. 2007. Disponible en <http://www.catie.ac.cr>.
- Chanatásig, C. 2004. Inducción de la embriogénesis somática en clones superiores de cacao (*Theobroma cacao* L.), con resistencia a enfermedades fungosas. Tesis Mag. Sc. CATIE. Turrialba, Costa Rica. 87 p.
- Chatelet, P; Michaux-Ferriere, N; Dublin, P. 1992. Potentialites embryogenes du nucelle et du tegument interne de graines immatures de cacaoyer (*Theobroma cacao* L.). *C. R. Acad. Sci. Paris*, t. 315, Serie III, pp. 55-62.

- Debergh, P; Harbaoui, Y; Lemeur, R. 1981. Mass propagation of globe artichoke (*Cynara scolymus*) / evaluation of different hypotheses to overcome vitrification with special reference to water potential. *Physiol. Plant.* 53:181-187.
- Ding, EL; Hutfless, SM; Ding, X; Girotra, S. (2006) Chocolate and Prevention of Cardiovascular Disease: A Systematic Review. *Nutrition Metabolism.* 3(2) 1-12.
- Driver, JA; Kuniyuki, AH. 1984. *In vitro* propagation of Paradox walnut root stock. *HortScience* 19:507-509.
- Dublin, P. 1984. Cacao. *In*: Amirato et al. (eds). Handbook of plant cell culture. MacMillan Publishing, Londres. (3) 541-563.
- Esan, EB. 1977. Tissue culture studies on cocoa (*Theobroma cacao* L.) A supplementation of current research. *En*: Proceeding, Fifth International Conference on Cocoa Research Ibadan, Nigeria, pp. 116-125.
- Espinal, C; Martinez, H; Ortíz, L. 2005. La cadena del cacao en Colombia: Una mirada global de su estructura y dinámica 1991-2005. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. Documento de trabajo N° 58. 51 p.
- Eskes, B. 2001. Introductory Notes. *In* Proceedings of the International Workshop on new Technologies and Cocoa Breeding. Ingenic. Kota Kinabalu, Malaysia. 16-17 Octubre 2000.190 p.
- Etienne, H., Lartaud, M., Carron, M. P., Michaux-Ferrière, N. 1997. Use of calcium to optimize long-term proliferation of friable embryogenic calluses and plant regeneration in *Hevea brasiliensis* (Müll. Arg.). *J. Exp. Bot.* 48 : 129-137.
- Etienne, H; Dechamp, E; Barry-Etienne, D; Bertrand B. 2006. Bioreactors in coffee micropropagation. *Braz. J. Plant Physiol.*, 18(1):45-54.

- Evans, HC; Edwards, DF; Rodriguez, M. 1977. Research on cocoa diseases in Ecuador: past and present. PANS 23:68-80.
- Evans, DA; Sharp, WR; Ammirato, PV; Yamada, Y. 1983. Handbook of Plant Cell Culture Vol. 1. Techniques for Propagation and Breeding. Nueva York, Macmillan.
- Evans, HC; Prior, C. 1987. Cocoa pod diseases: causal agents and control. Outlook on Agriculture 16:35-41.
- Figueira, A; Janick, J. 1993. Development of nucellar somatic embryo of *Theobroma cacao*. Acta Hort. 336: 231-236.
- FONCACAO. 1994. Situación actual y perspectivas del sector cacaotero nacional. Fondo Nacional del Cacao. 29 p. Mimeografiado.
- Fontanel, A; Gire-Bobin, S; Labbé, G; Favereau, P ; Alvarez, M; Von Rutte, S ; Pétiard, V. 2002. In vitro multiplication and plant regeneration of *Theobroma cacao* L. via stable embryogenic calli. In 10th IAPTC Congress, Plant Biotechnology 2002 and beyond, June 23-28, 2002, Orlando, Florida, USA.
- Furtek, D; Kasran, R; Tan, CL; Johnsiul, L; Mohammed, V; Hartney, V; Yusof, MM; Lamin, K; Tong, LM. 2000. Biotechnology research by the Malaysian Cocoa Board. In Proceedings of the International Workshop on new Technologies and Cocoa Breeding. Ingenic. Kota Kinabalu, Malaysia. 16-17 Octubre 2000.143-148 p.
- Gil-Izquierdo, A; Riquelme, M; Porras, I; Ferreres, F. (2004) Effect of the Rootstock and Interstock Grafted in Lemon Tree (*Citrus limon* (L.) Burm.) on the Flavonoid Content of Lemon Juice. J. Agric. Food Chem., 52 (2), 324 -331.
- Hall, R; Collin, H. 1975. Initiation and Growth of Tissue Cultures of *Theobroma cacao*. Annals of Botany. N°. 39: 555-570.

- Halperin, W. 1995. In vitro embryogenesis: some historical issues and unresolved problems. In: Thorpe, Trevor A. ed. In vitro embryogenesis in plants. Current plant science and biotechnology in agriculture, vol. 20. Kluwer Academia Publishers, Dordrecht, Netherlands. p. 1-15.
- Hardy, F. 1961. Manual de Cacao. Edición en español. Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas. Turrialba, Costa Rica. 380p.
- Högberg, K; Bozhkov, P; Grönroos, R; Von Arnold, S. 2001. Critical Factors Affecting *Ex Vitro* Performance of Somatic Embryo Plants of *Picea abies*. Scandinavian Journal of Forest Research. 16(4) 295 – 304.
- ICT. 2003. Informe anual del proyecto “Renovación y rehabilitación de plantaciones de cacao en la Cuenca de Huallaga” Instituto de Cultivos Tropicales. Tarapoto. Perú.
- ICCO 2000. Boletín Trimestral de Estadísticas del Cacao, Vol. XXVII, No. 4 Año cacaotero 2000/01.
- ICCO 2005a. Boletín Trimestral de Estadísticas del Cacao, Vol. XXXI - No. 3 - Año cacaotero 2004/05.
- ICCO 2005b. Inventory of Health and Nutritional Attributes of Cocoa and Chocolate. ICCO Annual Report 2004-05
- ICCO 2007. Boletín Trimestral de Estadísticas del Cacao, Vol. XXXII. Año cacaotero 2005/06.
- Janick, J; Whipkey, A. 1985. Axillary Proliferation of Shoots from Cotyledonary Nodal Tissue of Cacao. Revista Theobroma. 15(3): 125-131.

- Kellam, MK; Zentmyer, GA. 1986. Morphological, physiological, ecological, and pathological comparisons of *Phytophthora species* isolated from *Theobroma cacao*. *Phytopathology* 76:159-164.
- Kilaru, A; Hasenstein KH. 2005. Development and Pathogenicity of the Fungus *Crinipellis pernicioso* on interaction with cacao leaves. *Phytopathology*. 95. p 101–107.
- Kononowickz, H; Kononowickz, A; Janick, J. 1984. Asexual Embryogenesis Via Callus of *Theobroma cacao* L. *Z. Pflanzenphysiologie* 113: 347-358.
- Kudo, H; Harada, T. 2007. A Graft-transmissible RNA from Tomato Rootstock Changes Leaf Morphology of Potato Scion. *HortScience* 42: 190-423.
- Lanaud, C. 2000. Use QTL Detected for Resistance to *Phytophthora* in *Theobroma cacao* L. *In Proceedings of the International Workshop on new Technologies and Cocoa Breeding*. Ingenic. Kota Kinabalu, Malaysia. 16-17 Octubre 2000. p 115.
- Lanaud, C; Motamayor, JC; Risterucci AM. 2000. Implications of New Insight into the Genetic Structure of *Theobroma cacao* L. for Breeding Strategies. *In Proceedings of the International Workshop on new Technologies and Cocoa Breeding*. Ingenic. Kota Kinabalu, Malaysia. 16-17 Octubre 2000. p 89-107.
- Lardet, L; Aguilar, ME; Michaux-Ferriere, N; Berthouly, M. 1998. Effect of strictly plant-related factors on the response of *Hevea brasiliensis* and *Theobroma cacao* nodal explants cultured in vitro. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 34:34-40.
- Lass, RA. 1985. Diseases. *In Wood, GAR; Lass, RA. Cocoa*. Longman Group Limited. 4th edition. New York. p 265-365.
- Legrand, B; Cilas, C; Mississo, E. 1984. Comportamiento de los tejidos de *Theobroma cacao* L. Var. Amelonado, cultivados *in vitro*. *Café Cacao Thé*. 28(4): 245-250.

- Li, Z; Traore, A; Maximova, S; Gultinan, M. 1998. Somatic embryogenesis and plant regeneration from floral explants of cacao (*Theobroma cacao* L.) using thidiazuron. *In Vitro Cell Dev.* 34:293-299.
- Litz, RE. 1986. Tissue culture studies with *Theobroma cacao*. *In*: Dimick, P. S. (ed) Cacao Biotechnology Symposium Proceedings. Pennsylvania State University, p. 111-120.
- Lloyd, G; McCown's, B. 1980. Commercially feasible micropropagation of Mountain Laurel, *Kalmia latifolia* by use of shoot-tip culture. *Pro. Int. Plant Prop. Soc.* 30:421-427.
- López, C. 1996. Enraizamiento y aclimatación de plantas obtenidas in vitro. Disponible en: www.ciencias.uma.es/publicaciones/encuentros/ENCUENTROS31/enraizamiento.html. Consultado el 21 de noviembre 2007.
- López-Baez, O; Bollon, H; Eskes, A; Pétiard, V. 1993. Embryogenese Somatique de cacaoyer (*Theobroma cacao*) a partir de pièces florales. *Compte-Rendus de L'Académie de Sciences* 316:579-584.
- Lopez-Baez, O; Bollon, H; Álvarez, M; Pétiard V. 1999. Ex-vitro performance and nuclear DNA ploidy of cocoa plants regenerated by somatic embryogenesis. *In*: International Cocoa Research Conference, 12, Proceedings. Cocoa Producers' Alliance, Lagos, p. 589-593
- López-Baez, O; Evans, MH.; Esponda-Galvez M; Ortiz MA; Hernandez, B; Fontanel, A; Fraire G. 2000a. Progresos recientes en la propagación vegetativa. Resúmenes de Memorias del Primer Congreso Venezolano del Cacao y su Industria
- Lopez-Báez, O; Moreno, J; Pacheco, S. 2000b. Avanzos en Propagación de Cacao- *Theobroma cacao*- por Embriogénesis Somática en México. *In* Proceedings of the

- International Workshop on new Technologies and Cocoa Breeding. Ingenic. Kota Kinabalu, Malaysia. 16-17 Octubre 2000. p 163-176.
- MAG. 1991. Aspectos Técnicos sobre Cuarenta y Cinco Cultivos Agrícolas de Costa Rica. Dirección General de Investigación y Extensión Agrícola. Ministerio de Agricultura y Ganadería. San José, Costa Rica.
- Masseret, B; Alvarez, M; Fontanel, A; Pétiard, V. 2005. Conformity of cocoa trees produced via somatic embryogenesis. Malaysian International Cocoa Conference, Kuala Lumpur.
- Mata, A. 2006. Establecimiento de un sistema de propagación vegetativa de genotipos superiores de cacao (*Theobroma cacao* L.) por medio de ramillas. Trabajo final de graduación. Instituto Tecnológico de Costa Rica. 103 p.
- Maximova, S; Alemanno, L; Young, A; Michaux-Ferriere, N; Traore, A; Guiltinan, M. 2002. Efficiency, Genotypic Variability, and Cellular Origin of Primary and Secondary Somatic Embryogenesis of *Theobroma cacao* L. In *Vitro Cell. Dev. Biol-Plant* 38:252-259.
- Maxwell, P; Blake, J. 1984. Micropropagation of cacao through Axillary bud Culture. *Plant Tissue Culture and its Agricultural Applications* Sep: 17-21.
- Merkle, S; Parrott, W; Williams, E. 1990. Applications of somatic embryogenesis and embryo cloning. In: Bhojwani, S. ed. *Plant tissue culture: applications and limitations*. Elsevier, Amsterdam, Netherlands. p. 67-101.
- Merkle, S. 1995. Strategies for dealing with limitations of somatic embryogenesis in hardwood trees. *Plant Tissue Culture and Biotechnology*, vol. 1, no. 3, p. 112-121.

- Merkle, S; Parrott, W; Flinn, B. 1995. Morphogenic aspects of somatic embryogenesis. In: Thorpe TA, editor. *In vitro* embryogenesis in plants. Kluwer Academic Publishers; p.155-203.
- Moreno, L; Cadavid, S; Cubillos, G; Sánchez, J. 1983. Manual para el Cultivo del Cacao. Compañía Nacional de Chocolates. Colombia. 151 p.
- Motamayor, JC; Risterucci, AM; Lanaud, C. 2000. Domestication du cacaoyers. II Germplasm è l'origine des cacaoyers Criollo/Trinitario cultivés avant 1950. In 13^{ème} Conférence Internationale sur la Recherche Cacaoyère. Kota Kinabalu, Malaisie, 9-20 Octobre 2000.
- Mroginski, L; Roca, W. 1991. Establecimiento de cultivos vegetales in vitro. In CIAT. Roca, W; Mroginski; eds. Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones. Colombia. p 19-40.
- Murashige, T.; Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassa y with tobacco tissue culture. *Physiol. Plantarum*, 15: 473-497.
- Murray, DB. 1975. The Botany of cocoa. In Wood, GAR. Cocoa. Longman Group Limited. 3rd edition. New York. Pag. 7-18.
- Omokolo, D; Ndzomo, G; Niemenak, N. 1997. Phenol Content, Acidic Peroxidase and IAA- oxidase During Somatic Embryogenesis in *Theobroma cacao* L. *Biologia Plantarum* 39(3): 337-347.
- Orchard, J; Collin, H; Hardwick, K. 1979. Culture of Shoot Apices of *Theobroma cacao*. *Physiología Plantarum* 47: 207-210.

- Palacios, J; Monteiro, W. 2000. Mass multiplication on a semi-industrial scale of cocoa clones by rooted cuttings in Brazil. *In* Proceedings of 13th Int. Cocoa Research Conf. Kota Kinabalu, Malaysia. Pag. 178-184.
- Penn State Cacao Research Lab (2003). Cacao tissue culture protocol book. Penn State University. 32p
- Park, Y.S. 2002. Implementation of conifer somatic embryogenesis in clonal forestry: technical requirements and deployment considerations. *Annals of Forestry Science*, vol. 59, p. 651-656.
- Parrot, W. 2002. La embriogénesis somática en las angiospermas. Resúmenes VI Simposio Internacional de Biotecnología Vegetal. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Villa Clara, Cuba. Junio 17-21.
- Passey, A; Jones, O. 1983. Shoot Proliferation and Rooting in vitro of *Theobroma cacao* L. type Amelonado. *J. Hort. Sci.* 58(4): 589-592.
- Pence, VC; Hasegawa, PM; Janick, J. 1979. Asexual embryogenesis in *Theobroma cacao* L. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 104:145-148.
- Phillips-Mora W, 1996. Studies at CATIE on moniliasis resistance (*Moniliophthora roreri* (Cif. & Par.). International Workshop on the Contribution of Disease Resistance to Cocoa Variety Improvement, 1999. Bahía, Brazil: Ingenic, 11–17.
- Phillips-Mora W, 2003. Origin, biogeography genetic diversity and taxonomic affinities of the cacao (*Theobroma cacao* L.) fungus *Moniliophthora roreri* (Cif.) Evans *et al.* as determined using molecular, phytopathological and morpho-physiological evidence. Tesis PhD. The University of Reading. United Kingdom. 349 p.

- Phillips-Mora, W; Castillo, J; Krauss, U; Rodríguez, E; Wilkinson, MJ. 2005. Evaluation of cacao (*Theobroma cacao*) clones against seven Colombian isolates of *Moniliophthora roreri* from four pathogen genetic groups. *Plant Pathology* 54:483–490.
- Phillips-Mora, W; Coutiño, A; Ortiz, CF; López, AP; Hernández, J; Aime MC. 2006. First report of *Moniliophthora roreri* causing frosty pod rot (moniliasis disease) of cocoa in Mexico. *Plant Pathology*. 55(4)584-584.
- PROAMAZONÍA. 2004. Manual del cultivo del cacao. Programa para el desarrollo de la Amazonía. Ministerio de Agricultura. Perú. 83p.
- Puigderrajols, P; Mir, G; Molinas, M. 2001. Ultrastructure of early secondary embryogenesis by multicellular and unicellular pathways in cork oak (*Quercus suber* L.). *Ann. of Bot.* 87:179-189.
- Raemakers, M; Jacobsen, E; Visser, F. 1995. Secondary somatic embryogenesis and applications in plant breeding. *Euphytica* 81:93–107
- Reinert, J. 1958. Morphogenese and ihre kontrolle an gewebeulturen aus karotten. *Naturewissenschaften*. 45: 344-345.
- Reinert, J. 1967. Some aspects of embryogenesis in somatic cells of *Daucuscarota*. *Phytomorphology*, vol. 17, no. 1-6, p. 510-518.
- Rondón, JG. 2000. Mejoramiento genético del cacao. *In*: Mejía, LA; Argüello C. Eds. *Tecnología para el Mejoramiento del sistema de producción de cacao*. CORPOICA. Colombia. Pag. 37-49.

- Rorer, JB. 1918. Enfermedades y plagas del cacao en el Ecuador y métodos modernos, apropiados al cultivo del cacao. Report presented to the Agricultural Society of Ecuador. Guayaquil.
- Saunders, J; Hemeida, A; Mischke, S. 2000. USDA DNA Fingerprinting Programme for Identification of *Theobroma cacao* accessions. In Proceedings of the International Workshop on New Technologies and Cocoa Breeding. Malaysia, October 2000. pag. 108-114.
- Steward, F; Mapes, M; Mears, K. 1958. Growth and organized development of cultured cells. II. Organization in cultures growth from freely suspended cells. Am. J. Bot. 45: 704-708.
- Silva, J; Montes, S; Acosta, L; Arias, E; García, A. 2004. Embriogénesis somática: una alternativa para la propagación, mejoramiento y conservación de germoplasma en cacao. En: Cuadernos de biodiversidad, número 16. Centro Iberoamericano de la Biodiversidad. Cuba. Pag. 9-12.
- Soberanis, W; Ríos, R; Arévalo, E; Zúniga, L; Cabezas, O; Krauss, U. 1999. Increased frequency of phytosanitary pod removal in cacao (*Theobroma cacao*) increases yield economically in eastern Peru. Crop Protection 18:677-685.
- Solano, W. 2001. Efecto de las características de cultivo en suspensión celular y en bioreactor con inmersión temporal sobre la propagación masiva de *Coffea arabica* por embriogénesis somática. Tesis Licenciatura. Universidad de Costa Rica. 86p.
- Sondhal, M; Sereduk, T; Chen, Z; Bellato, C. 1989. Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration of Cacao Patent. Republic of South Africa.
- Sondahl, MR; Liu, S; Bellato, C. 1993. Cacao somatic embryogenesis. Acta Hort. 336: 245-248.

- Surujdeo-Maharad, S; Umaharan, P; Iwaro, A. 2001. A study of genotype-isolate interaction in cacao (*Theobroma cacao* L.): resistance of cacao genotypes to isolates of *Phytophthora palmivora*. *Euphytica* 118:295-303.
- Sutton, B. 2002. Commercial delivery of genetic improvement to conifer plantation using somatic embryogenesis. *Annals of Forestry Science*, vol. 59, p. 657-661.
- Tan, CL; Davey, MR; Lowe, KC; Power, JB; Furtek, D. 2000. A study on factors affecting somatic embryogenesis in *Theobroma cacao* L. *In Proceedings of 13th Int. Cocoa Research Conf.* Kota Kinabalu, Malaysia.
- Teisson, C; Alvard, D; Berthouly, M; Côte, F; Escalant, JV. Etienne, H. 1995. Cultivo *in vitro* por inmersión temporaria: un nuevo recipiente. *Plantation Recherche Développement*. 2 : 29-34.
- Toxopeus, H. 1985. Botany, Types and Population. *In Wood, GAR; Lass, RA. Cocoa.* New York. Longman. p 11-37.
- Traore, A., 2000, Somatic embryogenesis, embryo conversion, micropropagation and factors affecting genetic transformation of *Theobroma cacao* L.: PhD Thesis, The Pennsylvania State University, University Park.
- Traore, A; Maximova, S; Gultinan, M. 2003. Micropropagation of *Theobroma cacao* L. using Somatic Embryo- Derived Plants. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 39:332-337.
- Traore, A; Abdourahamane, S; Adu-Ampomah, Y; Jeanne, N; Maximova, S; Gultinan, M. 2003b. Cacao somatic embryogenesis technology transfer to Cote d'Ivoire and Ghana. 14th International Cocoa Research Conference. Ghana. p.43-49

- Tulecke, W; McGrahan, G. 1985. Somatic embryogenesis and plant regeneration from cotyledons of walnut (*Juglans regia* L.) Plant Sci. 40:57-63
- van Bostel, J; Berthouly, M. 1996. High frequency embryogenesis from coffee leaves. Plant Cell Tissue and Organ Culture. 44 : 7-17.
- Villalobos, V; Aguilar ME. 1990. Plant regeneration of cacao (*Theobroma cacao* L.) by micro-grafting somatic embryos. In Abstr. VIIth Int. Congr. Plant Tissue and Cell Culture. Amsterdam. Assoc. For Plant Tissue Culture. p. 140
- Williams, EG; Maheswaran, G. 1986. Somatic embryogenesis: factors influencing coordinated behaviour as an embryogenic group, Ann. Bot. 57: 443–462.
- Wood, GAR. 1975. Cocoa. Longman Group Limited. 3rd edition. New York. 292 pag
- Wood, GAR. 1985. Cacao. Compañía Editorial Intercontinental S. A. México. 207 p.
- Wood, GAR; Lass, RA. 1985. Cocoa. Longman Group Limited. 4th edition. New York. 620p.
- Yucesan, B; Turker A; Gurel, E. 2007. TDZ-induced high frequency plant regeneration through multiple shoot formation in witloof chicory (*Cichorium intybus* L.). Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 91 (3) 243-25

ANEXOS

Anexo 1

A.1 Salidas de SAS

A.1.1 Análisis estadístico del experimento Inducción I

```

The SAS System
10:49 Sunday, December 31, 2006
3

The GLM Procedure

Dependent Variable: EMBPROM_RC

Source              DF          Sum of
                   Squares    Mean Square    F Value    Pr > F
Model                15    39.78319439     2.65221296    136.65    <.0001
Error                717    13.91582136     0.01940840
Corrected Total      732    53.69901575

R-Square      Coeff Var      Root MSE    EMBPROM_RC Mean
0.740855      17.58761      0.139314      0.792115

Source              DF          Type I SS    Mean Square    F Value    Pr > F
CLON                 3     9.62155629     3.20718543    165.25    <.0001
MEDIO                1     1.81310889     1.81310889     93.42    <.0001
EXPL                 1     1.38833793     1.38833793     71.53    <.0001
CLON*MEDIO          3     6.87827629     2.29275876    118.13    <.0001
CLON*EXPL           3     8.48581749     2.82860583    145.74    <.0001
MEDIO*EXPL          1     3.44226632     3.44226632    177.36    <.0001
CLON*MEDIO*EXPL    3     8.15383119     2.71794373    140.04    <.0001

Source              DF          Type III SS    Mean Square    F Value    Pr > F
CLON                 3     9.52069228     3.17356409    163.51    <.0001
MEDIO                1     2.09303770     2.09303770    107.84    <.0001
EXPL                 1     1.44422693     1.44422693     74.41    <.0001
CLON*MEDIO          3     7.26304966     2.42101655    124.74    <.0001
CLON*EXPL           3     7.98453637     2.66151212    137.13    <.0001
MEDIO*EXPL          1     3.69122781     3.69122781    190.19    <.0001
CLON*MEDIO*EXPL    3     8.15383119     2.71794373    140.04    <.0001

```

A.1.2 Análisis estadístico experimento Embriogénesis secundaria

MEDIAS INTERACCION MEDIO EXPL

1
09:04 Tuesday, November 7, 2006

The TTEST Procedure

Statistics

Variable	Clon	N	Lower CL		Upper CL	Lower CL	
			Mean	Mean	Mean	Std Dev	Std Dev
Emb_prod	EET-183	13	13.368	22.769	32.17	11.156	15.557
Emb_prod	UF-273	25	0.4633	1.6	2.7367	2.1502	2.7538
Emb_prod	Diff (1-2)		14.748	21.169	27.59	7.5296	9.2591
Agreg	EET-183	13	0.6282	1.5385	2.4488	1.0802	1.5064
Agreg	UF-273	25	0.0611	0.32	0.5789	0.4897	0.6272
Agreg	Diff (1-2)		0.5185	1.2185	1.9184	0.8208	1.0093

Statistics

Variable	Clon	Upper CL		Minimum	Maximum
		Std Dev	Std Err		
Emb_prod	EET-183	25.681	4.3148	2	50
Emb_prod	UF-273	3.8309	0.5508	0	10
Emb_prod	Diff (1-2)	12.027	3.1661		
Agreg	EET-183	2.4867	0.4178	0	5
Agreg	UF-273	0.8725	0.1254	0	2
Agreg	Diff (1-2)	1.311	0.3451		

T-Tests

Variable	Method	Variances	DF	t Value	Pr > t
Emb_prod	Pooled	Equal	36	6.69	<.0001
Emb_prod	Satterthwaite	Unequal	12.4	4.87	0.0004
Agreg	Pooled	Equal	36	3.53	0.0012
Agreg	Satterthwaite	Unequal	14.2	2.79	0.0142

Equality of Variances

Variable	Method	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
Emb_prod	Folded F	12	24	31.92	<.0001
Agreg	Folded F	12	24	5.77	0.0003

A.1.3 Análisis estadístico experimento Desarrollo de embriones

The SAS System 39
13:30 Sunday, December 31, 2006

The GLM Procedure

Dependent Variable: CRECTOTAL_RC

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	13	54.90965917	4.22381994	4.09	0.0012
Error	25	25.81548000	1.03261920		
Corrected Total	38	80.72513917			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	CRECTOTAL_RC Mean
0.680205	29.54762	1.016179	3.439122

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
CLON	1	4.76453644	4.76453644	4.61	0.0416
MEDIO	1	13.56180786	13.56180786	13.13	0.0013
TAMANO	3	2.10510924	0.70170308	0.68	0.5728
CLON*MEDIO	1	9.16149051	9.16149051	8.87	0.0064
CLON*TAMANO	2	15.03742327	7.51871163	7.28	0.0032
MEDIO*TAMANO	3	1.57799569	0.52599856	0.51	0.6794
CLON*MEDIO*TAMANO	2	8.70129616	4.35064808	4.21	0.0265

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
CLON	1	5.54528030	5.54528030	5.37	0.0290
MEDIO	1	21.83950097	21.83950097	21.15	0.0001
TAMANO	3	1.78638438	0.59546146	0.58	0.6357
CLON*MEDIO	1	10.45953148	10.45953148	10.13	0.0039
CLON*TAMANO	2	14.44849871	7.22424936	7.00	0.0039
MEDIO*TAMANO	3	0.48413205	0.16137735	0.16	0.9246
CLON*MEDIO*TAMANO	2	8.70129616	4.35064808	4.21	0.0265

A.1.4 Análisis estadístico experimento Medio Líquido – Medio Sólido

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
RAIZ_Hojas verdadera	17	0.45	0.20	72.69

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	46.77	5	9.35	1.81	0.1916
Tipo medio	0.94	1	0.94	0.18	0.6775
Densidad	30.73	2	15.36	2.97	0.0930
Tipo medio*Densidad	18.15	2	9.08	1.76	0.2180
Error	56.88	11	5.17		
Total	103.65	16			

Test:Duncan Alfa:=0.05

Error: 5.1707 gl: 11

Tipo medio	Medias	n	
Sólido	2.92	9	A
Líquido	2.41	8	A

Letras distintas indican diferencias significativas(p<= 0.05)

Test:Duncan Alfa:=0.05

Error: 5.1707 gl: 11

Densidad	Medias	n	
10	4.44	9	A
40	2.07	4	A
20	1.48	4	A

Letras distintas indican diferencias significativas(p<= 0.05)

Test:Duncan Alfa:=0.05

Error: 5.1707 gl: 11

Tipo medio	Densidad	Medias	n		
Líquido	10	5.47	4	A	
Sólido	10	3.42	5	A	B
Sólido	20	2.96	2	A	B
Sólido	40	2.37	2	A	B
Líquido	40	1.77	2	A	B
Líquido	20	0.00	2		B

Letras distintas indican diferencias significativas(p<= 0.05)

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
RAIZ_Raíces	17	0.90	0.86	13.17

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	78.00	5	15.60	20.48	<0.0001
Tipo medio	3.76	1	3.76	4.93	0.0483
Densidad	67.44	2	33.72	44.27	<0.0001
Tipo medio*Densidad	11.43	2	5.72	7.50	0.0088
Error	8.38	11	0.76		
Total	86.38	16			

Test:Duncan Alfa:=0.05

Error: 0.7618 gl: 11

Tipo medio	Medias	n	
Sólido	6.45	9	A
Líquido	5.44	8	B

Letras distintas indican diferencias significativas(p<= 0.05)

Test:Duncan Alfa:=0.05

Error: 0.7618 gl: 11

Densidad	Medias	n			
10	8.37	9	A		
20	5.95	4		B	
40	3.52	4			C

Letras distintas indican diferencias significativas(p<= 0.05)

Test:Duncan Alfa:=0.05

Error: 0.7618 gl: 11

Tipo medio	Densidad	Medias	n					
Líquido	10	8.92	4	A				
Sólido	10	7.81	5	A	B			
Sólido	20	6.67	2		B	C		
Líquido	20	5.24	2			C	D	
Sólido	40	4.87	2				D	
Líquido	40	2.16	2					E

Letras distintas indican diferencias significativas(p<= 0.05)

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
RAIZ_Malformados	17	0.67	0.51	31.80

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	46.77	5	9.35	4.37	0.0195
Tipo medio	27.41	1	27.41	12.81	0.0043
Densidad	15.57	2	7.79	3.64	0.0613
Tipo medio*Densidad	11.82	2	5.91	2.76	0.1067
Error	23.54	11	2.14		
Total	70.31	16			

Test:Duncan Alfa:=0.05

Error: 2.1400 gl: 11

Tipo medio	Medias	n		
Sólido	5.58	9	A	
Líquido	2.85	8		B

Letras distintas indican diferencias significativas(p<= 0.05)

Test:Duncan Alfa:=0.05

Error: 2.1400 gl: 11

Densidad	Medias	n		
10	5.48	9	A	
20	3.81	4	A	B
40	3.35	4		B

Letras distintas indican diferencias significativas(p<= 0.05)

Test:Duncan Alfa:=0.05

Error: 2.1400 gl: 11

Tipo medio	Densidad	Medias	n		
Sólido	20	6.04	2	A	
Sólido	10	5.76	5	A	
Líquido	10	5.19	4	A	
Sólido	40	4.93	2	A	
Líquido	40	1.77	2		B
Líquido	20	1.58	2		B

Letras distintas indican diferencias significativas(p<= 0.05)

Anexo 2

A.2 Composición de los medios de cultivo

A.2.1 Medios de Penn State University

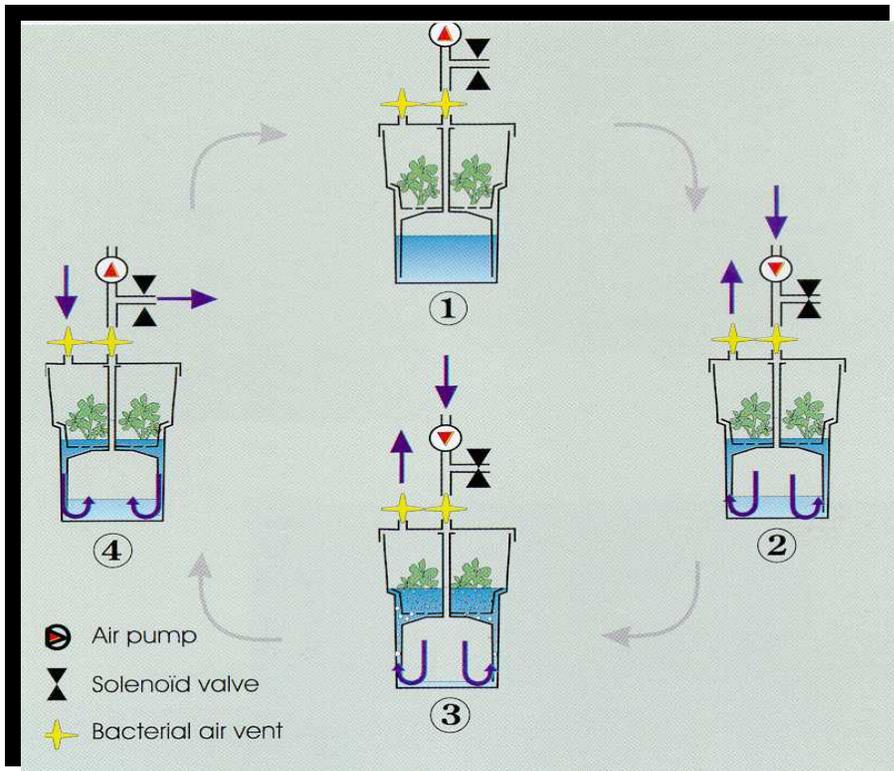
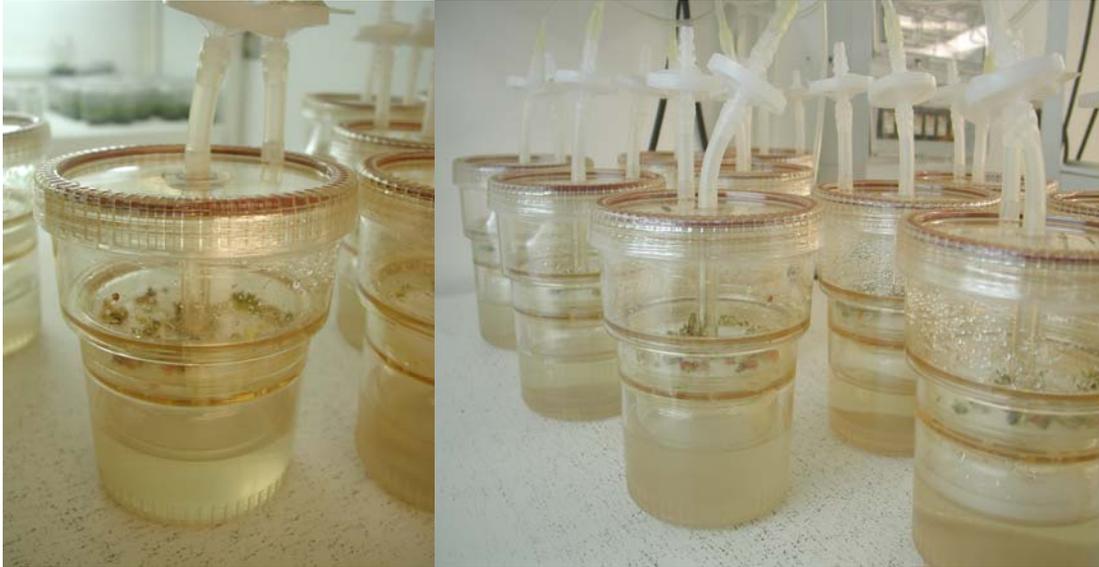
Medio Solución	PCG	SCG1	ED	PEC
Macro DKW (A)(10X)	100 ml	-	100 ml	100 ml
Macro DKW (B)(10X)	100 ml	-	100 ml	100 ml
Sales McCown's	-	2.3 g	-	-
Micro DKW (100X)	10 ml	-	10 ml	10 ml
Vitaminas DKW (200X)	5 ml	-	5 ml	5 ml
Vitaminas B5 (200X)	-	5 ml	-	-
Aminoácidos (1000X)	-	-	-	1 ml
Glutamina	250 mg	-	-	-
Myo-Inositol	100 mg	-	-	-
2,4-D (1mg/ml)	2 ml	2 ml	-	-
TDZ (0.2mg/ml)	25 µl	-	-	-
Kinetina (1mg/ml)	-	1 ml	-	-
KNO ₃	-	-	-	300 mg
Agua de coco	-	50 ml	-	-
Glucosa	20 g	20 g	1 g	20 g
Sacarosa	-	-	30 g	10 g
pH	5.8	5.7	5.7	5.8
Phytigel	2 g	2.2 g	2 g	1.75 g

A.2.2 Medios de NESTLE

Medio Solución	NT1	NT2	G80	ENR-6	M21
Macro DKW (A)(10X)	100 ml	-	-	-	-
Macro DKW (B)(10X)	100 ml	-	-	-	-
Macro MS (200X)	-	50 ml	25 ml	25 ml	50 ml
Micro DKW (100X)	10 ml	10 ml	-	5 ml	10 ml
Micro MS (200X)	-	-	2.5 ml	-	-
Fe-EDTA MS (200X)	-	-	2.5 ml	-	-
Vitaminas DKW(200X)	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml
Aminoácidos (1000X)	1 ml	1 ml	1 ml	-	1 ml
Glicina	-	-	-	2 mg	-
Myo-Inositol	-	-	-	-	-
2,4-D (1mg/ml)	1 ml	-	-	-	-
2,4,5 – T (1mg/ml)	-	-	-	-	1 ml
Kinetina (1mg/ml)	0.25 ml	-	-	-	-
GA ₃ 10 ⁻⁴	-	-	0.2 ml	-	-
ANA 10 ⁻⁵	-	-	1 ml	-	-
2 iP 10 ⁻⁴	-	-	2 ml	-	-
ABA 10 ⁻³	-	-	1 ml	-	-
Carbón activado	-	-	1 g	-	-
Adenina 10 ⁻⁴	-	0.25 ml	-	-	2.5 ml
Glucosa	30 g	30 g	1 g	10 g	30 g
Sacarosa	-	-	40 g	5 g	-
pH	5.8	5.6	5.8	5.8	5.6
Phytigel	3 g	3 g	3 g	1.75 g	3 g

Anexo 3

Recipiente de inmersión temporal RITA®



Funcionamiento del sistema de inmersión temporal RITA®

1. Explantes y medio líquido en el recipiente
2. Entrada de aire al recipiente
3. Inmersión de los explantes en el medio de cultivo líquido
4. Retorno del medio líquido por gravedad a la sección inferior del recipiente