

CENTRO AGRONÓMICO TROPICAL DE INVESTIGACION Y ENSEÑANZA
SUBDIRECCION GENERAL ADJUNTA DE ENSEÑANZA
PROGRAMA DE POSGRADO

"ESTUDIO DEL COMPORTAMIENTO DE ANTERAS DE CACAO (*Theobroma cacao* L.) EN CULTIVO *IN VITRO*"

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

Magister Scientiae

por

HECTOR ALFREDO SAGASTUME MENA

Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza
Turrialba, Costa Rica

1991


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

MAGISTER SCIENTIAE

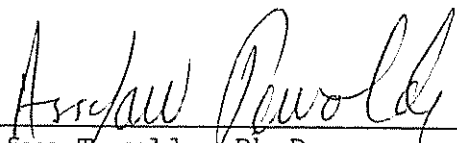
COMITE ASESOR:



Víctor Villalobos, Ph.D.
Profesor Consejero



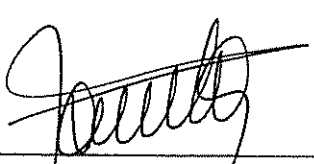
Jean Vincent Escalant, Ph.D.
Miembro del Comité



Assefaw Tewelde, Ph.D.
Miembro del Comité



Pedro Ferreira, Ph.D.
Miembro del Comité



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



Héctor Alfredo Sagastume Mena
Candidato

TESIS QUE DEDICO

A MIS ADORADAS HIJAS:

MARISA FABIOLA SAGASTUME DONIS

SARA PATRICIA SAGASTUME DONIS

A MI AMOR ETERNO:

SARA MARINA DONIS GUERRA DE SAGASTUME

A MI FAMILIA EN GENERAL

AGRADECIMIENTOS

Deseo en estas líneas dejar constancia de mi profundo y sincero agradecimiento a todas aquellas personas e instituciones que en una u otra forma contribuyeron a la feliz realización de éste trabajo, pero muy especialmente a:

- A la Deutscher Akademischer Austauschdienst (Servicio Alemán de Intercambio Académico, DAAD) y al Pueblo de Alemania por haber hecho posible realizar mis estudios de Posgrado.
- Al Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícolas (ICTA) de Guatemala, por permitirme venir a Costa Rica a enriquecer mis conocimientos.
- A la Red Regional de Generación y Transferencia de Tecnología en cacao (PROCACAO) por su valioso apoyo en la fase final de mi investigación.
- Al CATIE por permitirme la utilización de su banco de germoplasma de cacao y laboratorios para realizar mi investigación.
- A mi Comité Asesor: Víctor Villalobos, Ph.D. (Profesor Consejero); Jean Vincent Escalant, Ph.D.; Assefaw Tewolde, Ph.D.; y Pedro Ferreira, Ph.D.; por sus acertadas sugerencias, orientación, revisiones y correcciones de los manuscritos, apoyo a todo lo largo del tiempo que duró el trabajo de investigación y por sus sabias enseñanzas en las aulas de estudio.
- A Nelly Vásquez, M.Sc., por su orientación, comentarios, sugerencias, y apoyo en la parte histológica de la investigación.
- A Jorge Morera, Ph.D., por su guía y colaboración durante éstos dos años.
- A todo el personal de la Unidad de Biotecnología del CATIE, por su disposición, colaboración y amistad.

- A mis compañeros de Promoción y sus respectivas familias por las experiencias y amistad compartidas durante dos años.

BREVE BIOGRAFIA DEL AUTOR

El autor nació el dos de Noviembre de 1957 en San Francisco El Alto, Totonicapán, Guatemala.

Cursó estudios primarios en la Escuela Nacional del Puerto de San José, Colegio 12 de Octubre, Colegio San Francisco de Asís y Colegio Ciencia y Arte.

Realizó sus estudios secundarios en el Instituto Nacional Central Para Varones, obteniendo el Diploma de Bachiller en Ciencias y Letras, en 1975.

Hizo estudios superiores en la Universidad de San Carlos de Guatemala obteniendo el Título de Ingeniero Agrónomo, en el Grado Académico de Licenciado en Ciencias Agrícolas, en 1982.

Trabajó dos años para el Instituto Nacional de Comercialización Agrícolas (INDECA) como Administrador de la Estación de Compraventa Fray Bartolomé De Las Casas, en Alta Verapaz.

En 1984 ingresó al Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícolas (ICTA), institución para la cual labora actualmente.

En 1989 ingresó al Programa de Maestría del CATIE, obteniendo el Título de *Magister Scientieae* en Diciembre de 1991.

CONTENIDO

	Página
RESUMEN	xi
SUMMARY	xiii
LISTA DE CUADROS	xv
LISTA DE FIGURAS	xix
LISTA DE ABREVIATURAS	xxii
1. INTRODUCCION.	1
2. OBJETIVOS.	3
2.1. Objetivo general.	3
2.2. Objetivos específicos.	3
3. HIPOTESIS.	4
4. REVISION DE LITERATURA.	5
4. 1. Botánica del cacao.	5
4.1.1. Clasificación sistemática.	5
4.1.2. Origen, historia y dispersión.	6
4.1.3. Biología floral.	7
4. 2. Genética y mejoramiento del cacao.	10
4. 3. Cultivo de anteras.	13
4. 4. Genotipo.	16
4. 5. Estado de desarrollo de las anteras.	17
4. 6. Condiciones de la planta madre.	18
4. 7. Factores nutricionales.	19
4. 8. Factores físicos.	23
4. 9. Efecto del carbón activado.	25
4.10. Pretratamientos.	27
4.11. Biotecnología en cacao.	32
5. MATERIALES Y METODOS.	34
5.1. Estudio de la meiosis del cacao.	36
5.2. Efecto del hipoclorito de calcio sobre el control de contaminantes de cultivo.	37
5.3. Efecto del genotipo, meiosis, luz, ANA, CIN, BA, pH, sacarosa, carbón activado, y algunas de sus posibles interacciones, sobre la morfogénesis en anteras.	38
5.3.1. Efecto del genotipo, meiosis, luz, ANA	

CIN, y sus posibles interacciones, sobre la morfogénesis en anteras.	39
5.3.2. Efecto del genotipo, ANA y CIN sobre la morfogénesis en anteras.	40
5.3.3. Efecto del genotipo, meiosis, ANA y BA sobre la morfogénesis en anteras.	41
5.3.4. Efecto del genotipo y pH sobre la morfogénesis en anteras.	41
5.3.5. Efecto del genotipo y sacarosa sobre la morfogénesis en anteras.	42
5.3.6. Efecto del genotipo y carbón activado sobre la morfogénesis en anteras.	43
5.4. Estudio del origen de los callos.	43
5.5. Efecto de la CIN, ZEA, ANA y BA sobre la organogénesis en callos.	45
5.5.1. Efecto de la CIN y ZEA sobre la organogénesis en callos.	45
5.5.2. Efecto del ANA y CIN sobre la organogénesis en callos.	46
5.5.3. Efecto de la BA y ANA sobre la organogénesis en callos.	46
5.6. Efecto de la ZEA, GA ₃ , ABA, ANA y CIN sobre el establecimiento de suspensiones celulares a partir de callos.	47
5.6.1. Efecto de la ZEA y GA ₃ sobre el establecimiento de suspensiones celulares a partir de callos.	48
5.6.2. Efecto de la ZEA y ABA sobre el establecimiento de suspensiones celulares a partir de callos.	49
5.6.3. Efecto del ANA y CIN sobre el establecimiento de suspensiones celulares a partir de callos.	49
5.7. Diseños experimentales y estadística.	50
5.7.1. Modelo lineal.	50

6. RESULTADOS Y DISCUSIONES.	53
6.1. Estudio de la meiosis del cacao.	53
6.2. Efecto del hipoclorito de calcio sobre el control de contaminantes de cultivo.	54
6.3. Efecto del genotipo, meiosis, luz, ANA, CIN, BA, pH, sacarosa, carbón activado, y algunas de sus posibles interacciones, sobre la morfogénesis en anteras.	56
6.3.1. Efecto del genotipo, meiosis, luz, ANA y CIN, y sus posibles interacciones, sobre la morfogénesis en anteras.	57
6.3.2. Efecto del genotipo, ANA y CIN sobre la morfogénesis en anteras.	65
6.3.3. Efecto del genotipo, meiosis, ANA y BA sobre la morfogénesis en anteras.	69
6.3.4. Efecto del genotipo y niveles de pH sobre la morfogénesis en anteras.	74
6.3.5. Efecto del genotipo y niveles de sacarosa sobre la morfogénesis en anteras.	77
6.3.6. Efecto del genotipo y carbón activado sobre la morfogénesis en anteras.	80
6.4. Estudio del origen de los callos.	83
6.5. Efecto de la CIN, ZEA, ANA y BA sobre la organogénesis en callos.	84
6.5.1. Efecto de la CIN y ZEA sobre la organogénesis en callos.	85
6.5.2. Efecto del ANA y CIN sobre la organogénesis en callos.	85
6.5.3. Efecto de la BA y ANA sobre la organogénesis en callos.	87
6.6. Efecto de la ZEA, GA ₃ , ABA, ANA y CIN sobre el establecimiento de suspensiones celulares a partir de callos.	89
6.6.1. Efecto de la ZEA y GA ₃ sobre el establecimiento de suspensiones celulares a partir de callos.	89

6.6.2. Efecto de la ZEA y ABA sobre el establecimiento de suspensiones celulares a partir de callos.	89
6.6.3. Efecto del ANA y CIN sobre el establecimiento de suspensiones celulares a partir de callos.	91
7. CONCLUSIONES.	94
8. RECOMENDACIONES	96
9. BIBLIOGRAFIA.	97
10. APENDICE.	104

SAGASTUME MENA, H.A. 1991. Estudio del comportamiento de anteras de cacao (*Theobroma cacao* L.) en cultivo *in vitro*. Tesis Mag.Sc., CATIE, Turrialba, Costa Rica. 124 p.

PALABRAS CLAVE: cacao, *Theobroma cacao*, *in vitro*, callo, morfogénesis, rizogénesis, embriogénesis, androgénesis, haploide, haplométodos, Catongo, SPA-9, suspensiones celulares, mejoramiento genético.

RESUMEN

Tres estudios principales en anteras de cacao (*Theobroma cacao* L.) fueron hechos buscando la posibilidad de obtener líneas homocigóticas *in vitro* en la Unidad de Biotecnología del CATIE en Turrialba, Costa Rica. El primero comprendió el estudio de factores que influyen en la callogénesis y embriogénesis somática a partir de anteras de cacao con el objetivo de inducir embriogénesis directa o indirecta. El objetivo de éste fue obtener líneas homocigóticas originadas de cultivo *in vitro*. Los factores considerados en éste estudio fueron: genotipo (Catongo y SPA-9), luz (obscuridad y 3.000 lux), estado meiótico de las microsporas (tetrada y uninucleado), ácido naftalenacético (ANA), bencil adenina (BA), cinetina (CIN), pH, sacarosa y carbón activado, en siete diferentes experimentos y dos estudios descriptivos. El segundo estudio involucró tres experimentos para determinar los efectos de la CIN, ANA, BA y zeatina (ZEA) sobre la organogénesis en callos. El tercer estudio constó también de tres experimentos, con el objetivo de estudiar los efectos de la ZEA, ácido giberélico (GA₃), ácido abscísico (ABA), CIN y ANA sobre el establecimiento de suspensiones celulares a partir de callos. En todos los casos se estudiaron los efectos principales y las interacciones relevantes.

En todos los experimentos se utilizó el medio de Murashigue y Skoog (MS) en cantidad de 10 ml por vial. También se usó 7 g.l⁻¹ de agar como solidificante, mientras que el pH fue ajustado a 6,70 ± 0,01 antes de autoclavar. Todos los experimentos fueron incubados en cámara de crecimiento a una temperatura de 21 ± 2°C con un fotoperíodo de 16 horas de luz y una intensidad lumínica de 3.000 lux.

Los resultados obtenidos del primer estudio indican que los factores estudiados como: genotipo, estado de desarrollo de la microspora, condiciones de luz en el período de incubación de las anteras, pH del medio de cultivo, nivel de sacarosa en el medio, ANA y CIN juegan un papel significante en la formación de callos a partir de anteras. La formación de callos significativamente alta fue observada en anteras

del genotipo SPA-9 (82% aproximadamente, *vrs.* 54% aproximadamente en el genotipo Catongo) con microsporas en estado meiótico uninucleado, incubadas en obscuridad, con un medio MS suplementado con 2,5 mg.l⁻¹ de ANA, 0,2 mg.l⁻¹ de CIN, 46,7 g.l⁻¹ de sacarosa y pH ajustado a 5,9. Por otro lado el genotipo Catongo alcanza su máxima respuesta en la formación de callos con microsporas en estado meiótico de tetrada, también incubadas en obscuridad, con un medio MS suplementado con 0,5 mg.l⁻¹ de ANA, 0,2 mg.l⁻¹ de CIN, 45,2 mg.l⁻¹ de sacarosa y pH ajustado a 6,6. Los resultados sugieren la posibilidad de extrapolar la formación de callos hacia otros genotipos de cacao. Los mismos resultados de éste estudio muestran que el uso de carbón activado inhibe la formación de callos en anteras cuando es usado en dosis entre 0,25 y 0,75 g.l⁻¹ indicando la necesidad de probar dosis más bajas para determinar su efecto sobre la formación de callos. Por otra parte el almacenamiento del medio de cultivo a 21 ± 2°C con luz antes de su utilización no redujo la formación de callos aunque se hayan almacenado hasta por 22 días antes de ser sembrados. Con los mismos lineamientos la inmersión de botones florales en hipoclorito de calcio comercial al 1% (65,63% de ingrediente activo) controla suficientemente la contaminación del medio de cultivo por hongos y bacterias externas. De éste estudio, parece ser que el origen de la formación de los callos son células de la pared de la antera, a pesar de que no fue posible establecer la haploidía de los callos ni de las raíces; sugiriendo la necesidad de ulterior investigación en éste campo. En el segundo estudio se investigó la regeneración de raíces a partir de callos, lográndose hasta un 6% sin necesidad de agregar reguladores del crecimiento. Mientras que en el tercer estudio fue posible establecer suspensiones celulares a partir de callos y de éstas desarrollar proembriones através de la aplicación de 0,5 mg.l⁻¹ de ZEA + 2,0 mg.l⁻¹ de ABA (mala producción de células), 1,00 mg.l⁻¹ de ZEA + 2,0 mg.l⁻¹ de ABA (regular producción de células), 1,00 mg.l⁻¹ de CIN (también regular producción de células) ó 1,75 mg.l⁻¹ de CIN (buena producción de células)

En general, los estudios observados indican la posibilidad de producción de callos a partir de anteras de cacao, de los cuales es posible regenerar raíces. También se mostró que es posible obtener suspensiones celulares a partir de callos y en éstas suspensiones es posible producir proembriones. Sin embargo, no fue posible producir callos haploides por lo que el presente estudio sugiere más investigación sobre éstas líneas.

SAGASTUME MENA, H.A. 1991. Study of *in vitro* culture on the cocoa's (*Theobroma cacao* L.) anthers performance. Mag.Sc. Thesis. CATIE, Turrialba, Costa Rica. 124 p.

KEY WORDS: cocoa, *Theobroma cacao*, *in vitro*, callus, morphogenesis, rizhogenesis, embryogenesis, androgenesis, haploid, haplometods, Catongo, SPA-9, celular suspensions, genetic improvement.

SUMMARY

Three principal studies on cocoa's (*Theobroma cacao* L.) anthers were performed to look at the possibilities of obtaining homozygous lines on an *in vitro* basis at the Biotechnology Unit of CATIE in Turrialba, Costa Rica. The first study comprised on factors that influence callusing and somatic embryogenesis originating from cocoa's anthers in order to induce direct or indirect embryogenesis. The objective of this was to obtain homozygous lines originating from *in vitro* culture. Factors considered in this study were: genotype (Catongo and SPA-9), light (darkness and 3.000 lux), meiotic stage of the microspores (tetrad and uninucleate), naphthaleneacetic acid (NAA), benzyladenine (BA), kinetin (KIN), pH, sucrose and activated charcoal under seven different experiments and two descriptive studies. The second study involved three experiments to determine the effects of KIN, NAA, BA and zeatin (ZEA) on callus organogenesis. The third study involved also three experiments, to look at the effects of ZEA, gibberellic acid (GA₃), abscisic acid (ABA), KIN and NAA on the establishment of cellular suspensions from the callus. In all cases the main and relevant interaction effects were studied.

In all the experiments Murashigue and Skoog (MS) medium was used in a quantity of 10 ml per vial. Also 7 g.l⁻¹ of solidifying agar was used while the pH was adjusted to 6,70 ± 0,01 before autoclave. All experiments were incubated in a growth chamber at a temperature of 21 ± 2 °C with a photoperiod of 16 hours light and luminic intensity of 3.000 lux.

Results obtained from the first study indicate that factors studied as the genotype, microspore developmental stage, light conditions at the incubation period of the anthers, pH of the culture medium, sucrose level in the medium, NAA and KIN play a significant role in the callus formation of the anthers. Significantly higher callus formation was observed from anthers originating from the genotype SPA-9 (approximately 82% vrs. approximately 54% in Catongo) with microspores in the uninucleate meiotic stage incubated in darkness, with a medium of MS supplemented with 2,5 mg.l⁻¹ of NAA, 0,2 mg.l⁻¹ of KIN, 46,7 g.l⁻¹ sucrose and

pH adjusted to 5,9. On the other hand the Catongo genotype reaches its maximum response in callus formation with microspores in the tetrad meiotic stage, also incubated in darkness with a medium of MS supplemented with $0,5 \text{ mg.l}^{-1}$ of NAA, $0,2 \text{ mg.l}^{-1}$ of CIN, $45,2 \text{ mg.l}^{-1}$ sucrose and pH adjusted to 6,6. The results suggest the possibility of extrapolation on callus formation in other genotypes of cocoa. Same results of this study showed that the use of activated charcoal inhibit callus formation in the anthers when it is used at dosage between $0,25$ and $0,75 \text{ g.l}^{-1}$ indicating the necessity of proving lower dosage in order to determine its effect on callus formation. On the other hand the storage of the culture medium at $21 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ with light before its utilization did not reduce the formation of callus even when this were stored for 22 days prior to the sawing. On the same line the submerging of the flower buds in 1% commercial calcium hypochlorite (65,63% of active ingredient) can sufficiently control the culture medium contamination by external fungus and bacteria. From this study, therefore it seems to be that the origin of the callus formation is the anther cell wall, even though it was not possible to establish neither haploid callus nor roots; suggesting the need for further research on this. In the second study of this research the regeneration of roots from the callus up 6% was achieved without the necessity of adding growth regulators. Meanwhile in the third study it was possible to establish cellular suspensions from the callus and in this develop proembryos through the application of $0,5 \text{ mg.l}^{-1}$ of ZEA + $2,0 \text{ mg.l}^{-1}$ of ABA (producing very few cells), $1,00 \text{ mg.l}^{-1}$ of ZEA + $2,0 \text{ mg.l}^{-1}$ of ABA (regular in its cell production capacity), $1,00 \text{ mg.l}^{-1}$ of KIN (also regular in its cell production) or $1,75 \text{ mg.l}^{-1}$ of KIN (good in its cell production).

In general, the observed studies indicate the possibility of callus production from cocoa anthers and from which it is possible to regenerate roots. Also it is showing that it is possible to obtain cellular suspensions from the callus and in these suspensions it is possible to produce proembryos. However, it was not possible to produce haploid callus for which the present study suggests further research on these lines.

LISTA DE CUADROS

En el Texto	Página
Cuadro 1. Factores en estudio y niveles probados de cada factor. Experimento genotipo x meiosis x luz x ANA x CIN.	39
Cuadro 2. Análisis de varianza general para todos los experimentos, dependiendo del número de factores estudiados (ejemplo con tres factores).	51
Cuadro 3. Relación entre longitud del botón floral y el estado meiótico de los granos de polen, para los dos genotipos en estudio.	54
Cuadro 4. Análisis de varianza para la variable formación de callo, a los 60 días de incubación. Experimento genotipo x meiosis x luz x ANA x CIN.	58
Cuadro 5. Análisis de varianza para la variable formación de callo a los 60 días de incubación. Experimento genotipo x ANA x CIN.	66
Cuadro 6. Análisis de varianza para la variable porcentaje de formación de callo a los 90 días de incubación. Experimento genotipo x meiosis x ANA x BA.	70
Cuadro 7. Análisis de varianza para la variable porcentaje de formación de callo a los 60 días de incubación, através de dos genotipos. Experimento genotipo x pH.	74
Cuadro 8. Análisis de varianza de la regresión de porcentaje de callos formados sobre pH del medio, y sus respectivas constantes (β), para el genotipo Catongo, a los 60 días de incubación. Experimento genotipo x pH.	75
Cuadro 9. Análisis de varianza de la regresión de porcentaje de callos formados sobre pH del medio, y sus respectivas constantes (β), para el genotipo SPA-9, a los 60 días de incubación. Experimento genotipo x pH.	75
Cuadro 10. Análisis de varianza para porcentaje de formación de callo a los 60 días de incubación. Experimento genotipo x sacarosa.	77

Cuadro 11.	Análisis de varianza de la regresión de porcentaje de callos formados sobre dosis de sacarosa aplicada al medio de cultivo, y sus respectivas constantes (β), para el genotipo Catongo, a los 60 días de incubación. Experimento genotipo x sacarosa.	78
Cuadro 12.	Análisis de varianza de la regresión de porcentaje de callos formados sobre dosis de sacarosa aplicada al medio de cultivo, y sus respectivas constantes (β), para el genotipo SPA-9, a los 60 días de incubación. Experimento genotipo x sacarosa.	78
Cuadro 13.	Análisis de varianza para la variable porcentaje de formación de callo a los 60 días de incubación. Experimento genotipo x carbón activado.	81

En el Apéndice

Cuadro 1A.	Análisis de varianza de la superficie de respuesta para la variable formación de callo, y sus respectivas constantes (β), a través de dos genotipos, dos estados meióticos y dos condiciones de luz. Experimento genotipo x meiosis x luz x ANA x CIN.	105
Cuadro 2A.	Análisis de varianza de la superficie de respuesta para la variable formación de callo, y sus respectivas constantes (β), del genotipo Catongo, en estado de tetrada, incubado en luz. Experimento genotipo x meiosis x luz x ANA x CIN.	106
Cuadro 3A.	Análisis de varianza de la superficie de respuesta para la variable formación de callo, y sus respectivas constantes (β), del genotipo Catongo, en estado de tetrada, incubado en obscuridad. Experimento genotipo x meiosis x luz x ANA x CIN.	107
Cuadro 4A.	Análisis de varianza de la superficie de respuesta para la variable formación de callo, y sus respectivas constantes (β), del genotipo Catongo, en estado uninucleado, incubado en luz. Experimento genotipo x meiosis x luz x ANA x CIN.	108
Cuadro 5A.	Análisis de varianza de la superficie de respuesta para la variable formación de callo, y sus respectivas constantes (β), del	

	genotipo Catongo, en estado uninucleado, incubado en oscuridad. Experimento genotipo x meiosis x luz x ANA x CIN.	109
Cuadro 6A.	Análisis de varianza de la superficie de respuesta para la variable formación de <u>ca</u> llo, y sus respectivas constantes (β), del genotipo SPA-9, en estado de tetrada, <u>incu</u> bado en luz. Experimento genotipo x meio--sis x luz x ANA x CIN.	110
Cuadro 7A.	Análisis de varianza de la superficie de respuesta para la variable formación de <u>ca</u> llo, y sus respectivas constantes (β), del genotipo SPA-9, en estado de tetrada, <u>incu</u> bado en oscuridad. Experimento genotipo x meiosis x luz x ANA x CIN.	111
Cuadro 8A.	Análisis de varianza de la superficie de respuesta para la variable formación de <u>ca</u> llo, y sus respectivas constantes (β), del genotipo SPA-9, en estado uninucleado, <u>incu</u> bado en luz. Experimento genotipo x meio sis x luz x ANA x CIN.	112
Cuadro 9A.	Análisis de varianza de la superficie de respuesta para la variable formación de <u>ca</u> llo, y sus respectivas constantes (β), del genotipo SPA-9, en estado uninucleado, <u>incu</u> bado en oscuridad. Experimento genotipo x meiosis x luz x ANA x CIN.	113
Cuadro 10A.	Análisis de varianza de la superficie de respuesta para la variable formación de <u>ca</u> llo, y sus respectivas constantes (β), del genotipo Catongo, en estado de tetrada, <u>incu</u> bado en oscuridad. Experimento genotipo x ANA x CIN.	114
Cuadro 11A.	Análisis de varianza de la superficie de respuesta para la variable formación de <u>ca</u> llo, y sus respectivas constantes (β), del genotipo SPA-9, en estado uninucleado <u>incu</u> bado en oscuridad. Experimento genotipo x ANA x CIN.	115
Cuadro 12A.	Análisis de varianza de la superficie de respuesta para la variable formación de <u>ca</u> llo, y sus respectivas constantes (β), del genotipo Catongo, a través de dos estados meióticos, incubado en oscuridad. Experimento genotipo x meiosis x ANA x BA.	116
Cuadro 13A.	Análisis de varianza de la superficie de	

	respuesta para la variable formación de ca llo, y sus respectivas constantes (β), del genotipo SPA-9, através de dos estados me- ióticos, incubado en oscuridad. Experimen to genotipo x meiosis x ANA x BA.	117
Cuadro 14A.	Valores máximos predichos por la superfi-- cie de respuesta según genotipo, estado me iótico de la microspora y condición de luz. Experimento genotipo x meiosis x luz x ANA x CIN.	118
Cuadro 15A.	Valores máximos predichos por la superfi-- cie de respuesta según genotipo, estado me iótico de la microspora y condiciones de luz. Experimento genotipo x ANA x CIN.	118
Cuadro 16A.	Valores máximos predichos por la superfi-- cie de respuesta según genotipo y condicio nes de luz. Experimento genotipo x meiosis x ANA x BA.	118ö
Cuadro 17A.	Procedimiento para infiltración de anteras con parafina.	119
Cuadro 18A.	Formulación del medio de cultivo de Mura-- shigue y Skoog (1962).	121

LISTA DE FIGURAS

En el Texto	Página
Figura 1. Granos inmaduros de polen en estados de: A, anafase I. B, telofase II. C, tetrada. D, <u>n</u> inucleado.	55
Figura 2. Estudio de concentraciones de hipoclorito de calcio y tiempo de exposición para controlar contaminación del medio de cultivo.	56
Figura 3. Ilustración de una antera, de la cual se <u>em</u> pieza a formar un callo.	59
Figura 4. Superficie de respuesta de la interacción ANA x CIN, através de dos genotipos, dos <u>es</u> tados meióticos y dos condiciones de luz. Experimento genotipo x meiosis x luz x ANA x CIN.	59
Figura 5. Interacción genotipo x meiosis. Experimento genotipo x meiosis x luz x ANA x CIN.	61
Figura 6. Efecto de las condiciones de luz sobre la formación de callos. Experimento genotipo x meiosis x luz x ANA x CIN.	61
Figura 7. Superficies de respuesta en porcentaje de formación de callos, de la interacción ANA x CIN, para el genotipo Catongo. A, estado de tetrada, incubado en luz. B, estado de tetrada, incubado en oscuridad. C, estado uninucleado, incubado en luz. D, estado <u>un</u> nucleado incubado en oscuridad. Experimento genotipo x meiosis x luz x ANA x CIN.	63
Figura 8. Superficies de respuesta en porcentaje de formación de callos, de la interacción ANA x CIN, para el genotipo SPA-9. A, estado de tetrada incubado en luz. B, estado de tetr <u>a</u> da incubado en oscuridad. C, estado uninucleado incubado en luz. D, <u>es</u> tado uninuclea <u>a</u> do incubado en oscuridad. Experimento <u>gen</u> otipo x meiosis x luz x ANA x CIN.	64
Figura 9. Porcentaje de callos formados según días de almacenamiento del medio. Experimento <u>gen</u> otipo x meiosis x luz x ANA x CIN.	65
Figura 10. Superficies de respuesta en oscuridad (<u>por</u>	

centaje de formación de callos), de la interacción ANA x CIN. A, genotipo Catongo, estado de tetraada. B, genotipo SPA-9, estado uninucleado. Experimento genotipo x ANA x CIN.	68
Figura 11. Efecto de genotipo sobre la formación de callos en anteras. Experimento genotipo x meiosis x ANA x BA.	71
Figura 12. Interacción genotipo x meiosis. Experimento genotipo x meiosis x ANA x BA.	71
Figura 13. superficies de respuesta en obscuridad (porcentaje de formación de callos), de la interacción ANA x BA, através de dos estados meióticos. A, genotipo Catongo. B, genotipo SPA-9. Experimento genotipo x meiosis x ANA x BA.	72
Figura 14. Curvas de regresión de porcentaje de formación de callos sobre pH del medio, para los dos genotipos en estudio.	76
Figura 15. Curvas de regresión de porcentaje de callos formados, sobre dosis de sacarosa, para los dos genotipos en estudio.	79
Figura 16. Corte transversal de una antera, mostrando el inicio de la formación de un callo, a partir de células de la pared.	84
Figura 17. Efecto de reguladores de crecimiento sobre la organogénesis en callos. A, ZEA x CIN. B, ANA x CIN. C, ANA x BA.	86
Figura 18. Fotografía de una raíz formada a partir de un callo.	87
Figura 19. Efecto de la ZEA, GA ₃ , ABA, ANA y CIN sobre el establecimiento de suspensiones celulares a partir de callos. A, ZEA x GA ₃ . B, ZEA x ABA. C, ANA x CIN.	90
Figura 20. Proembriones obtenidos en suspensiones celulares con: A, 0,5 mg.l ⁻¹ de ZEA + 2,0 mg.l ⁻¹ de ABA. B, 1,0 mg.l ⁻¹ de ZEA + 2,0 mg.l ⁻¹ de ABA. C, 1,00 mg.l ⁻¹ de CIN. D, 1,75 mg.l ⁻¹ de CIN.	93

En el Apéndice

Figura 1A. Disección de una flor de cacao (León, 1987).	122
Figura 2A. Diagrama esquemático de las vías en la producción de plantas haploides. Tomado de Reinert y Bajaj (1977).	123
Figura 3A. Varios posibles eventos nucleares durante la androgénesis. Tomado de Reinert y Bajaj (1977).	124

LISTA DE ABREVIATURAS

ABA	Acido Abscísico ($C_{15}H_{20}O_4$) = 2-Cis, 4-Trans-ácido abscísico = Abscisina. Peso Molecular 264,32.
ANA	Acido Naftalenacético ($C_{10}H_7CH_2COOH$) = Acido Á-Naftalenacético = Acido 1-naftalenacético = Acido 1-naftilacético. Peso Molecular 186,21.
BA	N^6 Bencil Adenina ($C_{12}H_{11}N_5$) = BAP = 6 Bencil aminopurina = 6-BA. Peso Molecular 225,26.
CIN	Cinetina ($C_{10}H_9N_5O$) = 6 Furfuril Aminopurina = N^6 Furfuriladenina = Kinetina (K ó KIN). Peso Molecular 215,22.
GA ₃	Acido Giberélico ($C_{19}H_{22}O_6$) = GIA = (+) Acido giberélico = Giberelina A ₃ = Auxilina. Peso Molecular 346,38.
g.l ⁻¹	Gramos por litro.
Klx	Kilo lux.
mg.l ⁻¹	Miligramos por litro.
MS	Medio de cultivo de Murashigue y Skoog
ppm	Partes por millón.
ZEA	Zeatina ($C_{10}H_{13}N_5O$) = (trans) 6-4-Hidroxi-3-metilbutil-2-enilaminopurina. Peso Molecular 219,20.

1. INTRODUCCION.

El mejoramiento del cultivo de cacao (*Theobroma cacao* L.) incluye la hibridación mediante cruces de clones seleccionados. La F1 de éstos híbridos es muy variable, y con baja heterosis debido a que los clones distan mucho de ser homocigóticos en la mayoría de sus loci. Derivando líneas endogámicas de clones seleccionados y que sean genéticamente distantes, se puede llegar a una ganancia máxima por heterosis, sin variaciones en la F1 (Falconer, 1984). Por métodos convencionales el proceso de llevar a homocigosis un clon de cacao puede llevar mas de 18 años. Otra limitante para éste fin, es que solamente sería posible llevar a homocigosis los clones autocompatibles, mientras que los autoincompatibles es imposible por métodos de mejoramiento convencional y muchos clones autoincompatibles manifiestan características agronómicas deseables.

Mediante el uso del cultivo *in vitro* es posible inducir plantas haploides, a partir de la embriogénesis somática de las microsporas, si se realiza un uso adecuado de los reguladores del crecimiento (un balance adecuado de Auxinas y Citocininas) y en condiciones físicas apropiadas.

Los embriones haploides producidos a partir del cultivo de anteras, se pueden microinjertar sobre plántulas diploides provenientes de semilla diploide puesta a germinar *in vitro* (Aguilar, 1990). También es posible aplicar colchicina al meristemo de plántulas haploides, a fin de duplicar el número

de cromosomas y propiciar que los brotes nuevos (tallo o ramas) sean diploides (Dublin, 1974, 1978, 1984).

Bajo condiciones *in vitro* es posible inducir la germinación de los embriones y producir plántulas haploides las cuales se pueden injertar sobre plantas diploides y luego al aplicarle colchicina al meristemo producir brotes diploides homocigotos (Adu-Ampomah, 1987).

Uno de los pocos estudios al respecto, es el realizado por Esan (1981), quien cultivando anteras de cacao (*Theobroma cacao* L.) logró un 50% de ocurrencia de callos, de los cuales 15% formaron raíces en cinco meses. Los resultados de Esan, evidencian la posibilidad de lograr éxito en la inducción de embriones o callos haploides, en un período de tiempo corto.

Los usos prácticos de los haploides en cacao incluyen el proveer de material para estudios de genética y niveles de heterosis, así como también para investigar los efectos de factores externos (temperatura, humedad, cantidad de luz, etc.) sobre características agronómicas (rendimiento, altura de planta, grosor de tallo, etc.) y producción de híbridos.

En cacao se han identificado haploides espontáneos mediante separación de semillas aplanadas (Dublin, 1984; Palma y Villalobos, 1989; Lanaud, 1988) y su posible uso en el mejoramiento genético del cacao (Febres, 1990). Sin embargo, la tasa de haploides espontáneos en cacao es baja, variándose de 0 - 2%. La inducción de plantas haploides através del cultivo *in vitro* de anteras puede proveer cantidades casi ilimitadas de plantas haploides.

El objetivo de éste trabajo fue el de estudiar la posibilidad de inducir embriogénesis haploide directa o indirecta, a la vez de hacer un aporte en la investigación para el mejoramiento del cultivo de cacao, aplicando el cultivo de anteras en condiciones *in vitro*, para que con estos resultados se den los primeros pasos hacia la obtención de líneas homocigotas de cacao en el futuro.

Por las anteriores razones se plantean los siguientes objetivos:

2. OBJETIVOS.

2.1. Objetivo general.

Estudiar la posibilidad de inducir embriogénesis somática haploide directa o indirecta, mediante el cultivo *in vitro* de anteras de Cacao (*Theobroma cacao* L.).

2.2. Objetivos específicos.

2.2.1. Determinar el tamaño de botón floral relacionado con el estado de desarrollo de la microspora, para los genotipos Catongo y SPA-9.

2.2.2. Determinar la forma de disminuir al mínimo posible la contaminación de los medios de cultivo al sembrar anteras *in vitro*.

- 2.2.3. Determinar el grado de influencia de factores como el genotipo, luz, estado meiótico del grano de polen, ANA, BA, CIN, pH, sacarosa, carbón activado y algunas de sus posibles interacciones, sobre la morfogénesis en el cultivo de anteras de cacao.
- 2.2.4. Establecer el origen de los callos formados a partir de anteras.
- 2.2.5. Determinar la influencia de la CIN, ANA, ZEA y BA sobre la organogénesis en callos.
- 2.2.6. Estudiar el efecto de la ZEA, GA₃, ABA, CIN y ANA sobre el establecimiento de suspensiones celulares a partir de callos provenientes de anteras.

3. HIPOTESIS.

Toda célula diferenciada de una planta, si tiene núcleo y está viva, es posible modificar su patrón de diferenciación por medio de reguladores del crecimiento y producir una planta completa.

4. REVISION DE LITERATURA.

4.1. Botánica del cacao.

4.1.1. Clasificación sistemática.

El cacao pertenece al orden Malvales y a la familia de las Esterculiáceas, que incluye especies principalmente tropicales, herbáceas o leñosas, caracterizadas por flores en que los cinco estambres están unidos por la base y en varias especies alternan con otros tantos estaminodios. Dos Esterculiáceas: cacao y cola, son de importancia económica por los principios estimulantes contenidos en las semillas y por su valor alimenticio (León, 1987).

Theobroma cacao es una especie sumamente variable dentro de la que se ha creado varias entidades de rango específico. Hasta hace unos 20 años el cacao "lagarto" y el "calabacillo" fueron considerados como especies distintas: *T. pentágona* y *T. leiocarpa*, respectivamente; el cacao cultivado en Africa se describió como *T. sphaerocarpum* y se reservaba la denominación *T. cacao* para las poblaciones de "criollo". La existencia de tipos intermedios entre estas entidades y la carencia de barreras de fertilidad han hecho a casi todos los especialistas abandonar esta clasificación y reconocer una sola especie, *T. cacao*, para todas las poblaciones cultivadas y semisilvestres (León, 1987).

4.1.2. Origen, historia y dispersión.

La evidencia biológica sobre el área de origen del cacao es muy imprecisa. En México, Centro y Suramérica se ha informado que existen poblaciones silvestres pero en ningún caso se ha podido establecer claramente que no hayan tenido relación con asentamientos humanos (León, 1987).

La información arqueológica e histórica es más relevante. Representaciones de cacao en piedra, cerámica y en códices han sido encontradas en México y Guatemala, lo que indica que el cacao era conocido por los Mayas y otras culturas Mesoamericanas. Las fuentes lingüísticas de Mesoamérica, prueban que términos como "cacao" y "chocolate" son de origen Nahuatl y fueron españolizados por los primeros europeos que conocieron el uso del cacao en México. La evidencia histórica muestra que el cultivo prehispánico del cacao estuvo limitado al área comprendida entre el Sur de México y la actual frontera entre Costa Rica y Panamá (León, 1987).

La domesticación original en Mesoamérica se hizo quizás con "criollo" o "lagarto", que tienen cáscara más suave y semillas menos amargas. La información histórica indica que los españoles introdujeron el cultivo a América del Sur y que en ésta se aprovecharon las poblaciones nativas, las cuales se hibridizaron con las introducidas.

• La expansión a Africa, que exporta cerca del 70% de la producción mundial, se hizo en el siglo pasado y la mayoría

de los cultivares descienden de un tipo brasileño autocompatible. Al Sureste de Asia se introdujeron en el siglo XIX tanto "criollo" como "calabacillo" (León, 1987).

El cacao tiene una distribución natural muy amplia, del Amazonas a México, y es una planta de cultivo muy antiguo (León, 1987).

4.1.3. Biología floral.

La estructura y posición de las inflorescencias son los caracteres más notables del cacao. Las inflorescencias o cojines aparecen sólo en el tronco y ramas principales, fenómeno denominado caulifloria, que se presenta en numerosas especies tropicales; los cojines ocupan posiciones axilares a las hojas. En los troncos, y por la distorsión debida al crecimiento, no es posible situarlos según la filotaxia pero en estudios detallados se ha probado que tienen una distribución en espirales siguiendo el orden de $3/8$. Un cojín sencillo consiste de 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 ramilla que no se desarrolla aparece también como una ramificación de la

principal. La inflorescencia es pues un dicasio y el cojín una ramilla de entrenudos acortados (León, 1987).

La flor individual tiene un pedicelo largo y fino, de 1,0 - 1,5 cm de longitud. Al final hay 3 - 7, normalmente cinco sépalos agudos y rosados, de 6 - 8 mm de largo, pubescentes, que en la flor abierta se expanden formando ángulo recto con el pecíolo. La corola consiste de cinco pétalos blancos, de 6 - 8 mm de largo, formados por una base cóncava en forma de concha y por una lígula triangular, muy delgada en la base, ancha y cóncava hacia el ápice. El centro de la flor lo ocupa el tubo estaminal, compuesto por cinco estambres fértiles, cortos y doblados hacia afuera, cada uno encerrado en la concha de un pétalo, y de cinco estaminodios internos, agudos y largos, de posición erecta. Los estambres fértiles tienen dos anteras con dos sacos polínicos cada una. Los estaminodios, de color pardo y pubescentes, de 5 - 6 mm de largo, aristados y pilosos, rodean al pistilo. El ovario es un cuerpo ovoide, súpero, con cinco celdas y placentación central, con 30 - 50 óvulos. El estilo es cilíndrico y blanco, de 2 - 3 mm de largo, se abre arriba en cinco ramas estigmáticas, algunas de las cuales permanecen con frecuencia soldadas (León, 1987).

Del gran número de flores que produce el cacao menos de cinco por ciento es fecundado y llega a dar fruto, lo que se debe a dos factores: primero, es muy frecuente que la planta sea autoincompatible y por lo tanto necesite de

polen extraño para su fecundación; segundo, los mecanismos de polinización son muy poco eficientes. Esto último depende de los agentes de transmisión del polen, la estructura de la flor y su biología. Las flores del cacao 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 afuera están rodeadas por las conchas de los pétalos y separadas del pistilo por los estaminodios. Además, el polen es pegajoso, por lo que la polinización por el viento no puede ocurrir normalmente. Son entonces ciertos insectos diminutos, áfidos y otros, los que al andar por las flores pueden recoger el polen y depositarlo en los estigmas, sea de la misma flor, sea en otras del mismo árbol o llevarlo a otra planta. Las flores que no han sido fertilizadas caen al segundo o tercer día; en las que han sido fecundadas se desprenden los sépalos, pétalos y estambres y el ovario inicia su crecimiento. Muchos de los ovarios fecundados caen por diversas causas y sólo un porcentaje muy bajo llega a la maduración (León, 1987).

4.2. Genética y mejoramiento del cacao.

Theobroma cacao es una especie diploide ($2n=20$) (Glicenstein y Fritz, 1989).

El cacao es una especie altamente alógama, pues se estima que su polinización cruzada está por encima del 95%. La mayoría de esta polinización la realiza una población entomológica bastante especializada, de tamaño muy pequeño, especialmente unas mosquitas del género *Forcipomyia* (Enriquez, 1985).

El cacao es una especie de amplia variabilidad Genética, debida principalmente a cruzamientos y es determinada por la autocompatibilidad predominante, falta de barreras de esterilidad, difusión de cultivares por el hombre y aislamiento geográfico. El resultado es un continuum de poblaciones, entre las cuales la concentración de ciertos genes forma razas que reciben nombres especiales como "Cundeamor", "Angoleta", "Amelonado" y "Calabacillo", basados principalmente en la forma del fruto. Otro factor menos evidente en la evolución del cacao han sido las mutaciones, que pueden ser, como en "Catongo" de Brasil, de interés económico por su mayor resistencia a enfermedades y mayor producción (León, 1987).

Los diferentes tipos y grados de incompatibilidad y las mutaciones son factores de variación natural, a los que se suma la acción del hombre al introducir poblaciones foráneas. El caso más notable fue la introducción de "Criollos" de

América Central a Suramérica y la formación subsecuente de poblaciones híbridas con los cultivares locales. El resultado es que en el Norte de América del Sur se presenta un espectro continuo de variación, cuyos extremos son los "Criollos" y los "Calabacillos". Los grupos intermedios llamados complejo trinitario, incluyen las poblaciones conocidas en América del Sur como "Angoleta", "Cundeamor", "Amelonado" y otros, distinguidos por la forma del fruto. Hay, sin embargo, poblaciones aisladas con características distintivas, como el "Nacional" de Ecuador, "Porcelana" de Venezuela y otros que se han mantenido por aislamiento. Los "Criollos", originarios de América Central, han sido prácticamente suplantados por los trinitarios y sólo se mantienen en sitios aislados. Por otra parte, mutantes como "Catongo" de Brasil, constituyen poblaciones más homogéneas y recientemente se ha recogido los árboles silvestres de Amazonía para incorporar sus genes en los nuevos cultivares híbridos (León, 1987).

Predominan aún en todos los países cacaoteros los cultivares propagados por semilla, que en su mayoría son muy heterogéneos. El primer procedimiento seguido para establecer cultivares superiores fue reconocer un árbol excepcional por rendimiento o resistencia a enfermedades y propagarlo vegetativamente. Se obtuvo así centenares de clones, entre los que se escogieron los que tenían un alto grado de autocompatibilidad y mayor rendimiento o eran compatibles con otros clones superiores en siembras mixtas (León, 1987).

La tendencia actual, sin embargo, es abandonar la propagación clonal, cara y dificultosa, reemplazándola con la siembra de semilla híbrida, obtenida de cruces entre clones superiores. Este sistema facilita la siembra y permite plantar un mayor número de árboles por área (León, 1987).

Los principales objetivos del mejoramiento actual del cacao son: incrementar el potencial productivo de los árboles; obtener resistencia a las enfermedades presentes en el área de cultivo, especialmente "mal del machete" causado por el hongo *Ceratocystis fimbriata*, "pudrición negra de la mazorca", causada por el hongo *Phytophthora palmívora* y "moniliasis", causada por el hongo *Monilia rozeri*; y mejorar la calidad de las almendras (López, 1985).

Las bases para la selección de árboles sobresalientes en producción fueron desarrolladas en Trinidad por Pound en 1931 bajo los criterios de índice de mazorca (IM), índice de semilla (IS), y el número de mazorcas por árbol. El IM se refiere al número de mazorcas necesarias para hacer una libra de cacao fermentado, mientras que el IS expresa el peso individual de una almendra seca fermentada (López, 1985).

Aunque se han probado en varios países las generaciones de autopolinización para mejorar la homocigosis de los clones, aún no se ha podido encontrar nada práctico. En la Costa de Marfil se han hecho pruebas de plantas haploides por poliembrionía y luego duplicando los cromosomas con colchicina. Uno de los aspectos más importantes de estas plantas puede ser el de concentrar los genes para resistencia

y calidad, para formar híbridos más promisorios (Enriquez, 1985).

4.3. Cultivo de anteras.

Tuleke (1953), fue el primero en observar que el grano de polen maduro de *Ginkgo biloba*, podía ser inducido a la formación de callo haploide cuando se colocaban en un medio de cultivo artificial.

Desde el logro de Guha y Maheshwari en 1964 (Sunderland, 1974), de producir plantas haploides de *Datura innoxia* (Solanaceae), el método ha sido aplicado con éxito a 111 especies de cultivos importantes (Chu, 1982) como: tabaco, arroz, trigo, triticale, centeno, tomate, solanáceas tuberosas, chile, espárrago, maíz, soya, vid y caña de azúcar.

Bourgin y Nitsch (1967), fueron los primeros en obtener plantas haploides completas, partiendo de anteras de *Nicotiana sylvestris* y *N. tabacum*. Desde entonces genetistas y fitomejoradores se han interesado más y más en las numerosas posibilidades de uso práctico de ésta técnica.

Para la inducción de haploides por medio de cultivo de anteras se debe tener muy en cuenta los siguientes factores (Sunderland, 1974): a) condiciones y tipo de medio de cultivo, b) reguladores de crecimiento (presencia y cantidad), c) cantidad de sacarosa en el medio, d) etapa de desarrollo de la antera, e) condiciones de incubación

(temperatura y luz), f) pared de la antera, y g) estado fisiológico de la planta.

Haploides androgénicos y plantas homocigóticas, de cultivos de polen y anteras, pueden acelerar la hibridación, mutagénesis y selección de segregantes. Ascanio (1988) indica que plantas derivadas de polen han dado origen a variedades superiores de arroz, tabaco y trigo.

Los haploides y sus derivados son vistos por los mejoradores como una herramienta que puede ser utilizada para facilitar los programas de mejoramiento genético de muchos cultivos, ya sea en forma directa o indirecta (Ascanio, 1988).

Las células de las plantas haploides contienen un juego completo de cromosomas, lo que indica, que el fenotipo en éste caso es la expresión de una simple copia de la información genética, donde la interacción entre genes se ve reducida, como sería por ejemplo, el enmascaramiento de algunos genes por la acción de su alelo dominante (Ascanio, 1988).

En cacao uno de los métodos para la obtención de plantas haploides *in vivo* es la selección de semillas espontáneas aplanadas (Dublin, 1984; Lanaud, 1988; Palma y Villalobos, 1989; Bajaj, 1978). Existen otros métodos como la obtención de embriones a partir de ovarios tratados con: polen irradiado, polen de otra especie, shock térmico y polinización retrazada (Chu, 1982; Bajaj, 1978). El cultivo *in vitro* de anteras o granos de polen aislados, parece ser

una de las alternativas más promisorias para la formación masiva de éstas, y de plantas diploides homocigóticas (Ascanio, 1988).

Algunos autores han reportado resultados en la aplicación de ésta técnica en especies de la familia solanaceae, tales como *Nicotiana tabacum*, *Solanum tuberosum*, y *Datura innoxia*, donde el éxito alcanzado en la obtención de plantas haploides ha sido superior al logrado por otros métodos. También en gramíneas como *Oriza sativa*, *Zea mays* y *Triticum aestivum*, ésta técnica ha permitido la obtención de híbridos. Igualmente, en plantas ornamentales como *Saintpaulia ionantha*, *Anemone* sp., *Paeonia* sp., y en algunas plantas leñosas, el cultivo *in vitro* de anteras ha jugado un papel importante (Ascanio, 1988).

Guha y Maheshwari (1966), cultivaron granos de polen de *Datura innoxia* Mill., con el fin de determinar la viabilidad de éste sistema para el estudio de los factores que controlan la meiosis, observaron el desarrollo de embriones en un medio de cultivo con cinetina y agua de coco, pudiendo corroborar que éstos embriones contenían la mitad del número de cromosomas de la especie. Después de éstos trabajos, se han realizado una serie de estudios tendientes a mejorar la técnica de cultivo de anteras en otras especies, aunque se ha dicho que la inducción de haploides *in vitro* está restringida a especies de unas pocas familias tales como solanáceas y gramíneas, en la actualidad está claro que aunque las especies pertenecientes a esas dos familias responden

fácilmente a la androgénesis, aunque en baja frecuencia, ésta también ha sido lograda en muchas especies de otras familias (Ascanio, 1988).

Se ha observado que uno de los mayores problemas que presentan los investigadores en éste campo, es la poca respuesta a la androgénesis. Así, los estudios han sido enfocados a determinar los factores que influyen en la embriogénesis haploide, con el fin de incrementar su frecuencia. La manipulación de éstos factores ha hecho posible aumentar la eficiencia en la formación de haploides. Tales factores son descritos a continuación:

4.4. Genotipo.

Uno de los factores más importantes que gobiernan los sucesos en la inducción *in vitro* de haploides es el genotipo de la planta. Se ha observado repetidamente una respuesta diferencial entre distintas especies y aún entre cultivares de una misma especie. Gresshoff y Doy (1972), trabajando con 43 cultivares de *Lycopersicon esculentum* y 18 líneas de *Arabidopsis thaliana*, pudieron inducir tejido haploide únicamente en tres casos, para cada una de las especies.

El porcentaje de inducción de haploides en *Oriza sativa*, varias especies de *Nicotiana* y *Solanum*, difiere marcadamente. Del mismo modo, de 21 cultivares de *Triticum aestivum*, sólo se obtuvo tejido haploide en 10 cultivares. Esos estudios hacen ver claramente que en general se consideren varios

cultivares cuando se quiera estudiar la técnica en una especie determinada (Ascanio, 1988).

4.5. Estado de desarrollo de las anteras.

Numerosos estudios han demostrado que la respuesta del grano de polen a la formación de un callo haploide o embrión, depende del estado de desarrollo de la antera. Sunderland (1979), reportó que las flores de muchas especies caen en una de tres categorías: premitótica, mitótica o postmitótica. En la categoría premitótica se obtiene mejor respuesta al usar anteras en las cuales las microsporas han completado la meiosis, pero todavía no han comenzado la primera división mitótica del polen. Ejemplos de especies correspondientes a ésta categoría son: *Hyoscyamus niger*, *H. albus*, *Hordeum vulgare* y *Lolium* sp. Las anteras de las plantas del grupo mitótico responden a la embriogénesis durante la ocurrencia de la primera división mitótica. Ejemplos de ésta categoría son las especies *Nicotiana tabacum* y *Datura innoxia*. En las especies de la categoría postmitótica, el estado binuclear temprano de desarrollo del polen es el mejor para la embriogénesis. Ejemplo, *Atropa belladonna* y *Nicotiana knightiana*. En angiospermas, que generalmente cuentan con un gran número de anteras por flor, se deben examinar muchas de estas, para determinar el estado de desarrollo apropiado, ya que en éste tipo de flor las anteras no se desarrollan al mismo tiempo. Por otro lado, en especies con un número

determinado de anteras por flor, donde se desarrollan todas al mismo tiempo, se deben examinar botones florales con diferentes estados de desarrollo para así determinar el tamaño más adecuado.

4.6. Condiciones de la planta madre.

Nitsch (1981) indica que el éxito de la técnica de androgénesis radica en dos consideraciones importantes: a) el estado fisiológico de la planta donante, y b) la androgénesis, es decir, la aptitud y las condiciones necesarias para modificar el desarrollo normal del polen y forzarlo hacia una embriogénesis. Aún cuando las anteras sean tomadas en su óptimo estado de desarrollo, la respuesta del grano de polen está influenciada por muchas variables, especialmente por el estado fisiológico de la planta madre al momento de la excisión de las anteras. En algunas se han reportado variaciones estacionales en la respuesta de las anteras, ejemplo: *Solanum tuberosum*, *Hordeum vulgare* y *Triticum aestivum*. Estas variaciones estacionales están relacionadas con las condiciones ambientales (temperatura, fotoperíodo, intensidad de luz), bajo las cuales se desarrolla la planta madre en el momento de extraer las anteras.

Sunderland y Dunwell (1977), trabajando con *Nicotiana*, encontraron que un incremento de la temperatura en la cual se desarrollaban las plantas madre desde 10°C hasta 20°C,

permitió duplicar el número de anteras capaces de formar embriones.

Dunwell (1978), observó que la formación de granos de polen en *Nicotiana tabacum* era cinco veces mayor cuando las plantas crecían con un fotoperíodo de ocho horas, comparado con uno de 16 horas. Además, observó que la respuesta de los granos de polen fue mayor cuando la intensidad de luz que incidía sobre las plantas madre aumentó de 7 Klx a 14 Klx.

Otra condición fisiológica que afecta fuertemente la respuesta de las anteras aún cuando las plantas esten creciendo bajo condiciones favorables, es la edad de la planta madre. Así, Dunwell (1978), encontró que la mayor respuesta de las anteras (70%) de *Nicotiana tabacum* ocurrió cuando éstas fueron tomadas de plantas jóvenes al inicio de la floración y la respuesta declinaba en la medida que avanzaba la edad de la planta, hasta niveles menores al 20%.

4.7. Factores nutricionales.

Los requerimientos nutritivos para la inducción de callo o embriones haploides en general son simples.

En *Nicotiana*, la embriogénesis puede ser inducida al colocar las anteras en un gel agar, (Vasil, 1980) o sobre una simple solución de sacarosa al 2% con 0,8% de agar (Nitsch y Norrel, 1972).

En *Datura innoxia*, la androgénesis puede ser inducida simplemente con colocar las anteras en una solución de

sacarosa al 2% incubadas a 25°C (Sunderland, 1974). Bajo esas condiciones se forma un pequeño número de embriones que no se desarrollan más allá del estado globular.

Tanto en *Datura* como en *Nicotiana*, un medio simple con sales minerales y sacarosa, sin reguladores de crecimiento o vitaminas, es suficiente para asegurar el desarrollo hasta el estado de plántulas (Nitsch y Nitsch, 1969).

Lakshmana y Deepesh (1987) encontraron que 10% de sacarosa era óptimo para la androgénesis en *Peltophorum pterocarpum*.

Powell y Uhrig (1987) reportan concentraciones entre 6 y 15% de sacarosa como óptimos al estudiar cinco genotipos de *Solanum*.

La sacarosa y el hierro son los componentes del medio más importantes. Las sales minerales son necesarias sólo a bajas concentraciones y algunos medios como el MS (Murashigue y Skoog, 1962), se requiere generalmente a la mitad de la concentración. Otros medios, basados en la formulación de White (1963), han sido probados en algunas especies (Bourgin y Nitsch, 1967).

Los niveles de sacarosa varían con la especie. En las especies de categoría postmitótica (granos de polen binucleados), las concentraciones de sacarosa entre 2 y 4% producen la respuesta adecuada.

En *Hordeum vulgare*, *Solanum tuberosum*, *Oriza sativa*, *Lycopersicon esculentum* y *Triticum aestivum*, se ha probado con éxito 6-12% de sacarosa (Claphan, 1971; Wang et al, 1974;

Keller et al, 1975; Sopory et al, 1978). En general se requieren niveles altos de sacarosa en las especies de la categoría postmitótica o más avanzado. Sin embargo, éstos niveles sólo son críticos en la inducción del crecimiento, ya que posteriormente los requerimientos disminuyen (Keller et al, 1975).

Los reguladores de crecimiento, particularmente las auxinas y citocininas, han sido usados en la inducción del desarrollo androgenético. Las anteras de muchos cereales tales como *Hordeum vulgare* y *Oriza sativa* requieren de auxinas (Wang et al, 1974). La presencia de auxinas en el medio favorece una rápida proliferación celular y formación de callo, aunque el requerimiento de éstas no es absoluto y pueden ser eliminadas al usar el medio apropiado (Vasil, 1980). En las especies donde normalmente se producen embriones directos de las anteras, es posible obtener formación del callo al aplicar auxinas en el medio.

La presencia o ausencia de auxinas en el medio, así como el contenido endógeno de auxinas de las anteras, parece ser determinante en la formación de embriones en *Hyoscyamus niger* (Vasil, 1980). La eliminación de auxinas en el medio previene la formación de callos y estimula la formación de embriones.

En algunas especies las citocininas proporcionan la óptima respuesta de las anteras (Sopory et al, 1978).

El medio nutritivo suplementado con altas concentraciones de inositol y con aminoácidos como glutamina o serina, estimulan el desarrollo de embriones en algunas

especies (Nitsch, 1974; Keller et al, 1975). El hecho de que anteras de plantas como *Datura* y *Nicotiana*, responden a la androgénesis cuando son colocadas en agar o una solución de sacarosa, indica que la pared de la antera puede tener un papel crítico en los primeros estadios de desarrollo (Vasil, 1973).

El tejido más activo en la pared de la antera es el tapetum ya que todos los nutrientes para el desarrollo del grano de polen deben pasar através de éste o bien metabolizarse allí (Vasil, 1973). El papel del tapetum en el desarrollo normal del polen y en la androgénesis *in vitro*, ha sido propuesto por varios autores (Dunwell, 1978; Kohlenbach et al, 1978).

En *Hyoscyamus niger*, el polen embriónico está confinado a la periferia del lóculo de la antera, muy cerca del tapetum, por lo tanto un gradiente de sustancias pasados u originados en el tapetum puede tener un importante papel en la inducción de la embriogénesis (Vasil, 1973). La existencia de factores inhibitorios de la pared también ha sido propuesto por algunos autores (Dunwell, 1978; Kohlenbach et al, 1978).

4.8. Factores físicos.

4.8.1. Posición de la antera en el medio de cultivo.

Las anteras deben estar en contacto directo con el medio de cultivo. La manera de colocar éstas sobre el medio puede ser importante. Sopory y Maheshwari, citado por Vasil (1973) encontraron que colocando horizontalmente las anteras sobre la superficie del medio resulta en la formación de un gran número de embriones. La inmersión de parte de la antera en el medio, reduce la respuesta de la misma.

4.8.2. Medio líquido versus medio sólido.

El medio líquido ha mostrado ser superior en muchos casos, pudiendo ser debido a la presencia de inhibidores en el agar (White, 1963).

4.8.3. El número y densidad de anteras por recipiente y el tamaño y volumen del recipiente.

Esas variables determinan el ambiente donde se desarrolla la antera ya que afectan la composición de la atmósfera que rodea las mismas, tal como la presencia de dióxido de carbono o etileno, pudiendo influir negativamente en la embriogénesis (Wang et al, 1974). Sin

embargo, ha sido demostrado que ni la completa remoción del etileno, ni el flujo continuo de aire en el ambiente de cultivo, tienen efecto significativo en la androgénesis (Vasil, 1980).

4.8.4. Luz.

Se sabe que la luz es necesaria en la inducción de haploides androgenéticos en muchos cultivos, sin embargo su efecto no está completamente claro. La luz continua es generalmente inhibitoria. Las microsporas aisladas son más sensibles que las que están protegidas en la antera (Vasil, 1980).

La información disponible sugiere que el efecto de la luz puede tener diferencias marcadas entre especies y que es necesario realizar más estudios para determinar los requerimientos cualitativos y cuantitativos de luz para una óptima formación de haploides (Vasil, 1980).

4.8.5. Temperatura de incubación.

Normalmente el cultivo de anteras o microsporas se realiza a temperaturas de 25°C, pero en muchas especies se ha obtenido un aumento en la respuesta al incrementar la temperatura a 30°C (Vasil, 1980).

Una previa incubación de las anteras a 30-35°C y luego colocadas a 25°C ha mejorado considerablemente la respuesta

androgenética (Keller et al, 1981). Temperaturas menores a 25°C reducen la respuesta de las anteras.

4.9. Efecto del carbón activado.

La adición de carbón activado al medio puede aumentar la formación de haploides (Sopory et al, 1978; Wenzel, 1979; Powell y Uhrig, 1987) posiblemente por la absorción de inhibidores presentes en el agar o aquellos liberados de las paredes de las anteras en senescencia.

Ha sido comprobado que el carbón activado estimula el crecimiento de varios hongos (Butler y Bolkan, 1973; Parmentier, 1970), musgos (Proskaver y Berman, 1970), helechos y orquídeas (Bajaj, 1984). Estos trabajos fueron extendidos a Tabaco cv Havana por Anagnostakis (1974) quien observó un incremento en la formación de anteras androgénicas entre un 15 y un 45%.

Bajaj et al.(1978), reportan mejores resultados en el cultivar Badischer y Burley, observándose un incremento desde 41 a 91%, al suplementar el medio basal con 2% de carbón activado. Además el número de plantas regeneradas por antera fue mayor.

Un efecto similar del carbón activado sobre la androgénesis ha sido reportado en *Anemone* sp. (Johansson y Eriksson, 1977) y *Solanum tuberosum* (Sopory et al, 1978).

Este método de aumentar la frecuencia de androgénesis con la adición de carbón activado no está claro. Fridborg y

Eriksson (1975), observaron que el carbón activado aumenta la embriogénesis en zanahoria, mientras que normalmente ésta no puede ser inducida sin la omisión de la auxina del medio. Similarmente éstos autores obtuvieron formación de raíces en *Allium cepa* en un medio con carbón activado, pero no así en el mismo medio sin el carbón, esto sugiere que las auxinas están implicadas en el mecanismo de acción del carbón activado.

Weatherhead et al (1978), por otro lado, creen que el aumento en la androgénesis en tabaco es debido a la absorción del 5-hydroxy-methyl furfural por parte del carbón. Este compuesto es producido por la sacarosa durante la esterilización del medio en autoclave.

Aunque se cree que en tabaco, el carbón absorbe sustancias inhibitorias y talvez reduce el número de polen normalmente abortivo, quizá es más probable que el nivel de sustancias de crecimiento, tanto endógenas como exógenas, está regulado por la absorción del carbón (Weatherhead et al, 1978).

En general se puede decir que el uso del carbón activado es muy efectivo para el aumento de la respuesta androgenética, al menos en algunas especies y éstos resultados pueden extenderse a otras.

4.10. Pretratamientos.

4.10.1. Shock térmico.

Se ha observado que los haploides pueden ocurrir en forma natural o inducida experimentalmente después de algún trauma (Bajaj, 1978).

El primer estres inductor es dado cuando se rompen las relaciones fisiológicas entre el polen y la planta al cortar las flores. El tratamiento con frío es el secundario, el cual incrementa el número de granos de polen con dos núcleos iguales, estimulando la formación de embriones (Nitsch y Norrel, 1972).

Por la manipulación de la temperatura, el óvulo puede ser inducido a desarrollarse partenogenéticamente.

En 1922, Blakeslee et al (Polovochko, 1937), obtuvieron haploides de *Datura stramonium* al colocar las plantas a bajas temperaturas al momento de la fertilización.

Polovochko (1937), obtuvo haploides al exponer plantas de tabaco, tanto en altas como en bajas temperaturas. Simultáneamente, Muentzing (1937) y después Noerdenskiold (1939), obtuvieron plantas haploides de cebada con tratamiento a bajas temperaturas (3°C). En todos éstos casos los haploides se originaron del óvulo. Tanto el óvulo como el polen son susceptibles a éstos traumas.

Stow (1930) y Sax (1935) observaron que el "shock" térmico dado a las plantas puede alterar el patrón de división del núcleo de las microsporas. Las yemas florales, o plantas enteras, sujetas a bajas temperaturas, o talvez alternando ambas, puede aumentar la capacidad androgénica de la antera.

Algunas anormalidades tales como la fusión nuclear, en petunias colocadas a baja temperatura por 24-48 horas, han sido reportados por diferentes autores (Izhar, 1973).

El efecto estimulador de "shock" térmico en el cultivo de anteras ha sido extendido a *Datura innoxia* (Nitsch, y Norrel, 1973) *Lycopersicon esculentum* (De Bergh y Nitsch, 1973), *Atropa belladonna* (Bajaj, 1974) y *Nicotiana* (De Vault et al, 1981), para aumentar la androgénesis en anteras o granos de polen aislados.

Se ha reportado que tanto el tratamiento con frío o una breve exposición en altas temperaturas, estimulan la división repetida del polen. Por ejemplo en *Brassica*, la embriogénesis es estimulada en anteras sujetas a 30°C por 24 horas o 40°C por sólo una hora (Keller et al, 1981).

El "shock" térmico aparentemente causa una disolución de los microtúbulos (Hepler y Palevitz, 1974) y un cambio en la orientación del huso, que causa una división anormal del núcleo de las microsporas, produciéndose dos núcleos iguales en lugar del núcleo generativo y el núcleo del tubo que se forma normalmente después de la primera división mitótica del polen. Esto trae como consecuencia un aumento

en la viabilidad del polen, previene la aborción y parece aumentar el número de granos de polen que están destinados a formar embriones (Bajaj, 1978).

Se ha observado que en algunas especies tratadas con frío, el grano de polen asume la condición de ocho núcleos, formando un saco embrionario. Este fenómeno había sido reportado por Nemec en 1898 y se conoce como fenómeno Nemec (De Mol, 1923; Geitler, 1961; Naithani, 1937; Ram, 1959).

4.10.2. Tratamientos químicos.

Se conocen varios agentes químicos que inducen partenogénesis. Yasuda (1940), observó que inyectando a ovarios de *Petunia*, el compuesto químico Belvitán, estimuló la división repetida del óvulo. Igualmente, los tratamientos con colchicina realizados por Smith (1943) y Levan (1945), permitieron obtener haploides de *Nicotiana langsdorfii* y *Beta vulgaris*, respectivamente. La eficiencia de la inducción de haploides de maíz dulce fue incrementada de 2,7/1000 a 7/1000 por la aplicación de 50 mg.l⁻¹ de hidrazida maléica (Vasil, 1980).

Aspersiones a las plantas con varios reguladores de crecimiento también han sido considerados. Así, Lower y Miller (1969), encontraron que ethrel (ácido 2-Cloroetil fosfórico), actúa como gameticida y causa esterilidad masculina.

Bennett y Hughes, citado por Vasil (1980), demostraron en plantas de *Triticum aestivum* y *Chinese spring*, que en la célula madre del polen ocurría una mitosis adicional que producía granos de polen multinucleados cuando eran asperjados con ethrel.

La inducción de una división adicional y formación de cuerpos nucleares ha sido también observado en *Medicago* y *Tradescantia* (McDonald y Grant, 1974), *Nicotiana* (Bajaj, 1974) y algunos cultivares de *Triticum aestivum*.

Bajaj (1978) reporta que flores de tabaco asperjadas con ethrel a la concentración de 100 ppm, muestran una división del núcleo vegetativo. Las anteras tomadas de esas flores, cuatro días después de la aspersion, mostraron un 25% de aumento en la androgénesis. Sin embargo, las anteras tuvieron la tendencia a formar callos de color marrón y las plántulas la tendencia a tornarse amarillas.

Bajaj (1975), reporta que plantas de trigo tratadas con ethrel a la concentración de 4000 ppm producían anteras que contenían granos de polen con 4-6 núcleos. En ambos casos, tanto el núcleo vegetativo como el generativo se dividieron repetidamente.

Es posible que el polen multinucleado de anteras tratadas con ethrel pueda inducir la formación de embriones al ser cultivado, aumentando así la formación de haploides.

4.10.3. Centrifugación.

Sangwan y Norreel (1977), reportan que al someter las anteras a varios estres se puede incrementar aún más el número de anteras androgenéticas de *Datura innoxia* Mill. Estos autores aplicaron un sistema de cultivo que comprendía tratamiento con frío aplicado a los botones florales y centrifugación de los granos de polen aislados a 120 gravedades durante 15 minutos. Estos factores favorecieron la formación de embriones androgenéticos en mayor cantidad al compararlos con el testigo. Las anteras no tratadas mostraron un porcentaje de embriogénesis de aproximadamente 48%, después de cinco semanas de cultivo, mientras que las anteras sometidas al doble estres (frío y centrifugación), mostraron después de cinco semanas un 82% de embriogénesis. Por otro lado, las anteras tratadas sólo en frío mostraron un 65% de embriogénesis. Los estudios realizados a nivel celular de éste tratamiento han sido muy pobres, sin embargo, se cree que tiene un efecto similar al "shock" térmico, es decir, que aumenta el número de granos de polen con dos núcleos iguales.

Existen otros pretratamientos que han resultado adecuados en algunos casos para la inducción de androgénesis, tales como la inmersión de los botones florales en agua durante un tiempo determinado (White, 1963) el cual ha permitido aumentar significativamente la respuesta androgénica de las anteras.

4.11. Biotecnología en cacao.

La biotecnología ha hecho algunos aportes al mejoramiento del cacao, entre ellos podemos mencionar los trabajos de Valverde (1989), quien encontró que para la inducción de embriogénesis somática en cacao era adecuado un pH de 6,7, 5% de sacarosa e incubar los embriones cigóticos inmaduros en oscuridad.

Aguilar (1990) diseñó una metodología para desarrollar embriones somáticos de cacao, utilizando la técnica del microinjerto, la que será muy útil para la micropropagación de individuos con características genéticas superiores o embriones provenientes de cultivo de anteras.

Febres (1990) demostró la utilidad que tiene el análisis RFLP (Polimorfismo de Fragmentos de Restricción) para estudiar la organización genómica, la taxonomía y la caracterización del germoplasma de cacao, con fines de mejoramiento.

Lanaud (1988) asoció la característica de semilla aplanada con haploidía, en cacao. Por su parte, Palma y Villalobos (1989) lograron rescatar *in vitro* embriones provenientes de semillas aplanadas, de las cuales 1% eran haploides. Este método de producir haploides en cacao no es eficiente ni práctico, pues se necesitan demasiadas mazorcas para obtener una planta haploide y no todos los genotipos producen semillas planas. La frecuencia de producción natural de haploides en cacao es muy baja, varía entre 0 y 0,1%

(Lanaud, 1988). La producción de haploides en forma natural es un proceso que depende mucho del azar. El uso de cultivo de anteras, una vez desarrollada la técnica, puede proveer de grandes cantidades de haploides, en cualquier genotipo, en forma eficiente y práctica.

La única referencia que se conoce actualmente en cuanto a cultivo de anteras en cacao es la de Esan (1981), quien para lograr ocurrencia de callos utilizó el medio MS (Murashigue y Skoog, 1962), suplementado con $1,0 \text{ mg.l}^{-1}$ de Acido Naftalenacético (ANA), $0,1 \text{ mg.l}^{-1}$ de Cinetina (CIN) y 100 mg.l^{-1} de Inositol. Las condiciones de incubación fueron: 14 horas diarias bajo luz diurna difusa, a $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ y 80 - 85% de Humedad Relativa. Esan logró 50% de formación de callos y de éstos 15% regeneró en raíces.

Glicenstein y Fritz (1989), encontraron en tres diferentes clones de cacao que la meiosis ocurre cuando los botones florales miden entre 1,5 y 2,2 mm de largo.

Dublin (1974), estudiando haploides de cacao observó que no son capaces de sobrevivir sobre su propio sistema radicular más allá de cinco a diez meses. Por lo que sugiere que injertando los haploides se pueden conservar. Además, experimentó con diploidización de haploides tratando botones florales de haploides injertados, con colchicina, encontrando respuesta positiva en un 70% de los casos.

5. MATERIALES Y METODOS.

El trabajo se realizó en la Unidad de Biotecnología del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE), Turrialba, Costa Rica, entre Noviembre de 1990 y Octubre de 1991.

Las muestras de botones florales pertenecientes a dos genotipos se obtuvieron de la colección de cacao.

Los genotipos en estudio fueron: Catongo (autocompatible, de buen rendimiento y resistente a pudrición negra de la mazorca, causado por el hongo *Phytophthora palmivora*) y SPA-9 (autoincompatible, resistente a la enfermedad Moniliasis, causada por el hongo *Monilia rozeri* y al "mal del machete" causado por el hongo *Ceratocystis fimbriata*) (Morera, 1990; López, 1985; Enríquez, 1985; León, 1987). Se utilizaron éstos genotipos debido a que se pudo contar con suficiente cantidad de árboles y botones florales disponibles para el estudio.

En todos los experimentos se utilizaron cinco anteras por vial de 96 x 26 mm . Cada vial contuvo diez mililitros de medio, y fue sellado herméticamente con "Plastic Wrap" para evitar contaminación.

El medio utilizado fue el MS (Murashigue y Skoog, 1962). Como solidificante del medio se usó siete gramos por litro de agar.

Salvo en casos específicos, el medio se ajustó a un pH de $6,70 \pm 0,01$, pH adecuado para la embriogénesis somática en

cacao (Valverde, 1989; Aguilar, 1990). Todos los experimentos fueron incubados en una cámara de crecimiento, a una temperatura de $21^{\circ}\text{C} \pm 2$, con un fotoperíodo de 16 horas de luz y una intensidad lumínica de 3.000 lux.

La esterilización de los medios se hizo en autoclaves Sterilmatic modelo STM-E, a una temperatura de 120°C , por 15 minutos, y una presión de 15 libras por pulgada cuadrada.

Las transferencias de material del campo hacia los viales se hicieron en cámara de flujo laminar, con la ayuda de microscopio estereoscópico.

Todos los medios fueron preparados con agua bidestilada.

Para la aplicación de las dosis de reguladores de crecimiento, previamente se hicieron soluciones madre de los mismos.

Todos los botones florales fueron desinfectados con hipoclorito de calcio (65,63% de ingrediente activo) al 1% durante cinco minutos, y lavados tres veces con agua bidestilada estéril, previo a ser sembradas las anteras.

Se tomó datos de todos los experimentos cada mes, por un período de dos y tres meses, según el caso.

Para lograr los objetivos planteados se condujeron 13 experimentos y dos estudios.

5.1. Estudio de la meiosis del cacao.

Con el objetivo de facilitar el montaje de posteriores experimentos, se trató de establecer una relación entre el tamaño de los botones florales y el estado meiótico de los granos de polen.

Para determinar el estado meiótico, se colectaron botones florales de ambos genotipos en estudio. Botones de entre 1,0 y 7,0 mm de largo (20 por cada rango de longitud), ejemplo: entre uno y dos mm, entre dos y tres mm, y así sucesivamente.

Una vez colectados los botones, se fijaron en una solución modificada de Carnoy (1:1:3; cloroformo: ácido acético glacial: etanol al 95% + 1 gota de FeCl_3) durante 4-8 días, en una refrigeradora a 4°C (Anonymous, 1990). El percloruro de hierro (FeCl_3) permite degradar la exina de los granos de polen, facilitando la observación de los núcleos en los estados uninucleado y binucleado.

Posteriormente los botones se almacenaron a 4°C en etanol al 70%, hasta que se observaron.

Con la ayuda de un estereoscopio, pinzas finas y una aguja de disección, se extrajeron las anteras y se aplastaron en un portaobjetos con una gota de colorante aceto carmín. Se observaron a microscopio de luz a 400X.

5.2. Efecto del hipoclorito de calcio sobre el control de contaminantes de cultivo.

Para evitar al máximo la contaminación de los cultivos de anteras, y debido a que no se encontró ninguna referencia, se hizo un experimento para determinar cuales eran las condiciones mínimas asépticas necesarias para conducir experimentos posteriores.

Para éste experimento se utilizó un medio simple con agar (7 g.l^{-1}) y sacarosa (30 g.l^{-1}). El desinfectante usado fue hipoclorito de calcio comercial a la concentración ya descrita.

Se probaron siete tratamientos, consistentes en dos concentraciones de hipoclorito de calcio (1 y 2%), cada uno con tres tiempos de exposición (5, 10 y 15 minutos), más un tratamiento testigo (sin desinfectante). El objetivo del tratamiento testigo fue determinar la posibilidad de sembrar sin ningún tipo de desinfectante, eliminando así la posibilidad de daño a los granos de polen por el desinfectante.

Antes de disectar los botones se lavaron tres veces en agua bidestilada estéril.

El genotipo utilizado en éste experimento fue Catongo, con granos de polen en estado uninucleado.

Por cada uno de los siete tratamientos se sembraron diez viales con cinco anteras cada uno (haciendo un total de 50

anteras por tratamiento), con polen inmaduro (botones de entre tres y cuatro mm de largo).

A la semana de sembrado se hizo la lectura de porcentaje de contaminación. En otro ensayo similar se evaluó el porcentaje de sobrevivencia para cada tratamiento inmediatamente después de aplicado el desinfectante. El porcentaje de sobrevivencia se determinó por medio de la solución de Alexander (Anonymous, 1990), la cual determina por método colorimétrico la viabilidad del polen.

5.3. Efecto del genotipo, meiosis, luz, ANA, CIN, BA, pH, sacarosa, carbón activado y algunas de sus posibles interacciones, sobre la morfogénesis en anteras.

Con el objetivo de estudiar algunos factores que inciden sobre la morfogénesis en anteras, se montaron seis experimentos.

El análisis de varianza se trabajó con rangos, ordenando todos los datos y teniendo en cuenta los empates, de acuerdo con la metodología propuesta por Conover e Iman (1981). Los rangos se hicieron de la siguiente manera:

Rango 0 = Cero anteras desarrolladas.

Rango 1 = Una antera desarrollada.

Rango 2 = Dos anteras desarrolladas.

Rango 3 = Tres anteras desarrolladas.

Rango 4 = Cuatro anteras desarrolladas.

Rango 5 = Cinco anteras desarrolladas.

Los rangos se multiplicaron por 20 para obtener porcentaje de formación de callos y luego, se ordenaron todas las observaciones.

Los seis experimentos se describen a continuación:

5.3.1. Efecto del genotipo, meiosis, luz, ANA, CIN, y sus posibles interacciones, sobre la morfogénesis en anteras.

Para determinar cual era el mejor balance de los reguladores de crecimiento, genotipo, estado meiótico del grano de polen, luz, y sus posibles interacciones, sobre la morfogénesis en anteras, se probaron 96 tratamientos, resultantes de todas las combinaciones posibles de todos los factores a todos sus niveles (Cuadro 1).

Cuadro 1. Factores en estudio y niveles probados de cada factor. Experimento genotipo x meiosis x luz x ANA x CIN.

FACTORES EN ESTUDIO	NIVELES	DESCRIPCION
GENOTIPOS	2	Catongo y SPA-9
CONDICIONES DE LUZ	2	luz y oscuridad
ESTADOS MEIOTICOS	2	tetrada y uninucleado
ANA	4	0,0; 0,5; 1,0 y 1,5 mg.l^{-1}
CIN	3	0,0; 0,1 y 0,2 mg.l^{-1}

Para la aplicación de los reguladores de crecimiento se hicieron soluciones madre poniendo 10 mg de ANA en 100 ml de agua bidestilada y 10 mg de CIN en 100 ml de agua bidestilada. El ANA se disolvió en tres ml de etanol al

95%. La CIN se disolvió en 3 ml de HCl 1 N + H₂O bidestilada.

El diseño experimental fue bloques al azar con arreglo factorial 2 x 2 x 2 x 4 x 3, con 10 repeticiones por tratamiento y cinco anteras por repetición. Existió la limitante de no poder hacer más de 100 viales por día, por lo que se hicieron 96 diarios, constituyendo un bloque. Estos cubrieron los 48 tratamientos de cada genotipo. Se trabajó 10 días en la fase de sembrado de anteras.

Cuando se encontró interacción ANA x CIN, se ajustó una superficie de respuesta (Haaland, 1989).

5.3.2. Efecto del genotipo, ANA y CIN sobre la morfogénesis en anteras.

Con el objetivo de tratar de inducir morfogénesis en las anteras de cacao y ampliar la información obtenida en el primer experimento sobre niveles de ANA y CIN, se montó otro experimento, probando cinco niveles de ANA (0,5; 1,0; 1,5; 2,0 y 2,5 mg.l⁻¹), cinco niveles de CIN (0,2; 0,4; 0,6; 0,8 y 1,0 mg.l⁻¹) en todas las combinaciones posibles, para los dos genotipos estudiados.

El diseño empleado fue bloques al azar, con arreglo factorial 2 x 5 x 5 de los tratamientos, haciendo un total de 50 tratamientos, cada uno repetido cinco veces. Cada bloque lo constituyó un día de trabajo, en el cual se sembraron 50 tratamientos.

5.3.3. Efecto del genotipo, meiosis, ANA y BA sobre la morfogénesis en anteras.

Con el objetivo de tratar de inducir morfogénesis en las anteras de cacao, se probaron 48 tratamientos, consistentes en cuatro niveles de BA (0,0; 1,5; 3,0 y 4,5 mg.l^{-1}), tres niveles de ANA (0,0; 1,0 y 2,0 mg.l^{-1}), dos genotipos (Catongo y SPA-9) y dos estados meióticos de cada genotipo (tetrada y uninucleado), en todas sus combinaciones posibles.

La solución madre de BA se hizo con 18,75 mg en 100 ml de agua bidestilada. La solución madre de ANA se hizo con 12,5 mg en 100 ml de agua bidestilada. La BA se disolvió en tres ml de KOH 1 N + H₂O bidestilada.

El diseño empleado fue bloques al azar, con los tratamientos en arreglo factorial 4 x 3 x 2 x 2. Cada tratamiento se repitió seis veces. Un bloque lo constituyó un día de trabajo, en el cual se hicieron 48 tratamientos.

5.3.4. Efecto del genotipo y pH sobre la morfogénesis en anteras.

Con el objetivo de inducir morfogénesis en anteras, se probaron seis niveles de pH (3,7; 4,7; 5,7; 6,7; 7,7 y 8,7), con los genotipos Catongo y SPA-9.

El genotipo Catongo se utilizó en el estado meiótico de tetrada, con 1,0 mg.l^{-1} de ANA y 0,1 mg.l^{-1} de CIN. El

genotipo SPA-9 se utilizó en estado meiótico uninucleado, con $1,0 \text{ mg.l}^{-1}$ de ANA y $0,2 \text{ mg.l}^{-1}$ de CIN, siendo las mejores condiciones para la formación de callo para cada genotipo, según experimentos previos.

El diseño empleado fue bloques al azar, con arreglo de los tratamientos en un factorial 2×6 , haciendo un total de 12 tratamientos, cada uno repetido 10 veces, y cada repetición se consideró como un bloque.

5.3.5. Efecto del genotipo y sacarosa sobre la morfogénesis en anteras.

Con el objetivo de inducir morfogénesis en anteras, se probaron seis niveles de sacarosa (0, 30, 60, 90, 120 y 150 g.l^{-1}), con los genotipos Catongo y SPA-9.

El genotipo Catongo se utilizó en el estado meiótico de tetrada, con $1,0 \text{ mg.l}^{-1}$ de ANA y $0,1 \text{ mg.l}^{-1}$ de CIN. El genotipo SPA-9 se utilizó en estado meiótico uninucleado, con $1,0 \text{ mg.l}^{-1}$ de ANA y $0,2 \text{ mg.l}^{-1}$ de CIN, siendo las mejores condiciones para la formación de callo para cada genotipo, según experimentos previos.

El diseño empleado fue bloques al azar, con arreglo de los tratamientos en un factorial 2×6 , haciendo un total de 12 tratamientos, cada uno repetido 10 veces. Cada bloque lo constituyó una repetición.

5.3.6. Efecto del genotipo y carbón activado sobre la morfogénesis en anteras.

Con el objetivo de inducir morfogénesis en anteras, se probaron cuatro niveles de carbón activado (0,00; 0,25; 0,50 y 0,75 g.l⁻¹), cada uno con los genotipos Catongo y SPA-9.

El genotipo Catongo se utilizó en el estado meiótico de tetrada, con 1,0 mg.l⁻¹ de ANA y 0,1 mg.l⁻¹ de CIN. El genotipo SPA-9 se utilizó en estado meiótico uninucleado, con 1,0 mg.l⁻¹ de ANA y 0,2 mg.l⁻¹ de CIN, siendo las mejores condiciones para la formación de callo para cada genotipo, según experimentos previos.

El diseño empleado fue bloques al azar, con arreglo de los tratamientos en un factorial 2 x 4, haciendo un total de ocho tratamientos, cada uno repetido cinco veces. Cada bloque lo constituyó una repetición.

5.4. Estudio del origen de los callos.

Con el objetivo de saber si los callos se originan de la pared de la antera, en cuyo caso los callos serían diploides (2n); o si se originan a partir de un grano de polen inmaduro, en cuyo caso serían callos haploides (n), se hizo un estudio, dividido en dos partes: en la primera, se sembraron 500 anteras en 100 viales. Se utilizó el medio MS (Murashigue y Skoog, 1962), suplementado con 46,7 g.l⁻¹ de

sacarosa, $0,2 \text{ mg.l}^{-1}$ de CIN y $1,0 \text{ mg.l}^{-1}$ de ANA. Las anteras sembradas provenían del genotipo SPA-9, en estado meiótico uninucleado, y se incubaron en obscuridad. Se hicieron muestreos, colectándose 20 anteras cada cuatro días. En la segunda, se sembraron 100 anteras en 20 viales de cada uno de los cuatro tratamientos siguientes: primero, genotipo Catongo, con microsporas en estado meiótico de tetraada, con un medio MS suplementado con $0,5 \text{ mg.l}^{-1}$ de ANA, $0,2 \text{ mg.l}^{-1}$ de CIN, $45,2 \text{ g.l}^{-1}$ de sacarosa y pH ajustado a 6,6; segundo, genotipo Catongo, con microsporas en estado meiótico uninucleado, con un medio MS suplementado con $1,5 \text{ mg.l}^{-1}$ de ANA, $0,19 \text{ mg.l}^{-1}$ de CIN, $45,2 \text{ g.l}^{-1}$ de sacarosa y pH ajustado a 6,6; tercero, genotipo SPA-9, con microsporas en estado meiótico de tetraada, con un medio MS suplementado con $1,2 \text{ mg.l}^{-1}$ de ANA, $0,14 \text{ mg.l}^{-1}$ de CIN, $46,7 \text{ g.l}^{-1}$ de sacarosa y pH ajustado a 5,9; cuarto, genotipo SPA-9, con microsporas en estado meiótico uninucleado, con un medio MS suplementado con $2,5 \text{ mg.l}^{-1}$ de ANA, $0,2 \text{ mg.l}^{-1}$ de CIN, $46,7 \text{ g.l}^{-1}$ de sacarosa y pH ajustado a 5,9. Se tomaron 15 muestras al azar de anteras con callo, de cada tratamiento. Las anteras se colocaron en agar al 2% para facilitar su manejo posterior en la infiltración con parafina. Luego de la infiltración se procedió a una tinción cuádruple de las láminas (detalles en Cuadro 17A).

Se hicieron cortes de las anteras, de nueve micras de grosor, con un micrótopo. Los cortes se observaron al microscopio de luz a 400x.

5.5. Efecto de la CIN, ZEA, ANA y BA sobre la organogénesis en callos.

Con el objetivo de inducir embriogénesis u organogénesis sobre callos provenientes de anteras de cacao, se montaron tres experimentos, los cuales se describen a continuación:

5.5.1. Efecto de la CIN y ZEA sobre la organogénesis en callos.

Del experimento donde se estudió la influencia del genotipo, estado meiótico de los granos de polen, luz, ANA y CIN, se produjeron callos, los cuales fueron transferidos a diferentes medios, consistentes en diferentes combinaciones de niveles de CIN y ZEA. Se probaron cuatro niveles de CIN y ZEA o sea respectivamente CIN: 0,0; 0,5; 1,0 y 1,5 mg.l^{-1} ; y ZEA: 0,0; 0,5; 1,0 y 1,5 mg.l^{-1} , haciendo un total de 16 tratamientos. Cada tratamiento se repitió 50 veces, consistiendo cada repetición en un vial con un callo. Se consideró el tratamiento anterior de cada callo como una covariable.

La edad de los callos al ser transferidos era de dos meses, contados a partir del día que se sembraron las anteras. Los callos se empezaron a visualizar a partir de un mes de haber sido sembradas las anteras.

El diseño empleado fue bloques al azar, con arreglo factorial 4 x 4 de los tratamientos, haciendo un total de

16 tratamientos, cada uno repetido 50 veces. Cada bloque lo constituyó un día de trabajo, en el cual se sembraron 10 repeticiones.

5.5.2. Efecto del ANA y CIN sobre la organogénesis en callos.

En éste experimento se probaron nueve tratamientos, consistentes en la combinación de tres niveles de ANA (0,5, 1,0, y 1,5 mg.l^{-1}), con tres niveles de CIN (0,5; 1,0 y 1,5 mg.l^{-1}). Las soluciones madre se hicieron poniendo 12,5 mg de ANA en 100 ml de agua bidestilada y 12,5 mg de CIN en 100 ml de agua bidestilada.

Los callos empleados provenían del experimento de genotipo x ANA x CIN (factorial 2 x 5 x 5).

El diseño empleado fue bloques al azar, con los tratamientos en arreglo factorial 3 x 3. Cada tratamiento se repitió 50 veces. Un bloque lo constituyó el tratamiento previo del cual provenían los callos.

5.5.3. Efecto de la BA y ANA sobre la organogénesis en callos.

En éste experimento se probaron nueve tratamientos, consistentes en la combinación de tres niveles de BA (1,5; 3,0 y 4,5 mg.l^{-1}) con tres niveles de ANA (0,5; 1,0 y 1,5 mg.l^{-1}). Las soluciones madre se hicieron poniendo 18,75 mg

de BA en 100 ml de agua bidestilada y 12,5 mg de ANA en 100 ml de agua bidestilada.

Los callos empleados en éste experimento fueron producidos con el genotipo SPA-9 en estado meiótico uninucleado, $1,0 \text{ mg.l}^{-1}$ de ANA y $0,2 \text{ mg.l}^{-1}$ de CIN.

Se empleó un diseño completamente al azar, con los tratamientos en arreglo factorial 3 x 3. Cada tratamiento se repitió 50 veces.

5.6. Efecto de la ZEA, GA₃, ABA, ANA y CIN sobre el establecimiento de suspensiones celulares a partir de callos.

Con el objetivo de tratar de establecer suspensiones celulares y en ellas inducir embriogénesis, a partir de callos provenientes de anteras de cacao, se hicieron tres experimentos descriptivos, debido a que no se contaba con suficiente espacio en los agitadores orbitales para poder hacer réplicas.

Los callos empleados en éstos experimentos fueron producidos con el genotipo SPA-9 en estado meiótico uninucleado, en un medio MS suplementado con $1,0 \text{ mg.l}^{-1}$ de ANA y $0,2 \text{ mg.l}^{-1}$ de CIN.

Cada tratamiento se colocó en Erlenmeyers de 50 ml de capacidad, con 20 ml de medio cada uno. El medio empleado fue el MS (Murashigue y Skoog, 1962). Previo a ser autoclavado, el pH del medio se ajustó a $5,90 \pm 0,01$.

Los agitadores orbitales se ajustaron a 110 revoluciones por minuto las primeras tres semanas, y de allí en adelante se ajustó a 80 revoluciones por minuto.

La lectura de la respuesta se hizo en forma objetiva, calificándose la producción de células en tres categorías: buena (abundante separación de células de los callos, llegando a ponerse densa la suspensión, y buena división celular), regular (con alguna separación de células de los callos y alguna división celular) y mala (muy pocas o ninguna células separadas de los callos, sin división celular).

Los experimentos se observaron durante dos meses, cambiándoles a medio fresco cada semana (a partir de la quinta semana, debido a que en las primeras semanas la proliferación y división celulares fue muy escasa y no se consideró necesario, y se quería también evitar al máximo la manipulación de los frascos, pues se contaminan con suma facilidad y no se contaba con repeticiones) y filtrando las suspensiones muy densas, haciéndolas pasar por una malla de metal con orificios de 50 micras de ancho. Al mes de la transferencia de los callos, se tomaron muestras de las suspensiones para hacer observaciones histológicas.

5.6.1. Efecto de la ZEA y GA₃ sobre el establecimiento de suspensiones celulares a partir de callos.

En éste experimento se probaron 12 tratamientos, consistentes en la combinación de tres niveles de GA₃ (0,0;

1,0 y 2,0 mg.l^{-1}) con cuatro niveles de ZEA (0,0; 0,5; 1,0 y 1,5 mg.l^{-1}). Las soluciones madre se hicieron poniendo 6,25 mg de GA_3 en 250 ml de agua bidestilada y 6,25 mg de ZEA en 250 ml de agua bidestilada. El GA_3 y la ZEA se disolvieron en tres ml de etanol al 95% + H_2O bidestilada.

En éste experimento se empleó un arreglo factorial 3 x 4 de los tratamientos.

5.6.2. Efecto de la ZEA y ABA sobre el establecimiento de suspensiones celulares a partir de callos.

En éste experimento se probaron 12 tratamientos, consistentes en la combinación de tres niveles de ABA (0,0; 1,0 y 2,0 mg.l^{-1}) con cuatro niveles de ZEA (0,0; 0,5; 1,0 y 1,5 mg.l^{-1}). Las soluciones madre se hicieron poniendo 6,25 mg de ABA en 250 ml de agua bidestilada y 6,25 mg de ZEA en 250 ml de agua bidestilada. El ABA se disolvió en tres ml de KOH 1 N + H_2O bidestilada.

En éste experimento se aplicó un arreglo factorial 3 x 4 de los tratamientos.

5.6.3. Efecto del ANA y CIN sobre el establecimiento de suspensiones celulares a partir de callos.

En éste experimento se probaron 32 tratamientos, consistentes en cuatro niveles de ANA (0,0; 0,5; 1,0 y 1,5 mg.l^{-1}) y ocho niveles de CIN (0,00; 0,25; 0,50; 0,75;

1,00; 1,25; 1,50 y 1,75 mg.l⁻¹), en todas las combinaciones posibles. Las soluciones madre se hicieron poniendo 6,25 mg de ANA en 250 ml de agua bidestilada y 6,25 mg de CIN en 250 ml de agua bidestilada.

En éste experimento se aplicó un arreglo factorial 4 x 8 de los tratamientos.

5.7. Diseños experimentales y estadística.

La mayoría de los experimentos se hicieron con un diseño de bloques al azar, con los tratamientos en arreglo factorial (Steel y Torrie, 1985). Los factores variaron entre dos y cinco. A continuación se dá el modelo lineal general cuyo esquema fue similar para todos los experimentos, con ligeras variantes en el número de factores estudiados.

5.7.1. Modelo lineal.

El modelo lineal general y el análisis de varianza (Cuadro 2) para la mayoría de los experimentos y para una observación fue el siguiente (se ilustra como ejemplo el caso para tres factores en estudio):

$$Y_{ijkl} = \mu + \bar{\alpha}_i + \bar{\beta}_j + \bar{\gamma}_k + \bar{\delta}_l + (\bar{\alpha}\bar{\beta})_{jk} + (\bar{\alpha}\bar{\delta})_{jl} + (\bar{\beta}\bar{\delta})_{kl} + (\bar{\alpha}\bar{\beta}\bar{\delta})_{jkl} + \check{Y}_{ijkl}.$$

Donde: Y_{ijkl} = L-ésima observación registrada para la ijk -ésima celda.
 u = Media general.
 $\hat{\alpha}_i$ = Efecto del i -ésimo bloque
 $\hat{\alpha}_j$ = Efecto del j -ésimo nivel del factor A.
 $\hat{\beta}_k$ = Efecto del k -ésimo nivel del factor B.
 $\hat{\gamma}_l$ = Efecto del l -ésimo nivel del factor C.
 $(\hat{\alpha}\hat{\beta})_{jk}$ = Efecto de la interacción del j -ésimo nivel del factor A con el k -ésimo nivel del factor B.
 $(\hat{\alpha}\hat{\gamma})_{jl}$ = Efecto de la interacción del j -ésimo nivel del factor A con el l -ésimo nivel del factor C.
 $(\hat{\beta}\hat{\gamma})_{kl}$ = Efecto de la interacción del k -ésimo nivel del factor B con el l -ésimo nivel del factor C.
 $(\hat{\alpha}\hat{\beta}\hat{\gamma})_{jkl}$ = Efecto de la interacción del j -ésimo nivel del factor A con el k -ésimo nivel del factor B y el l -ésimo nivel del factor C.
 $\hat{\epsilon}_{ijkl}$ = Error aleatorio asociado a la $ijkl$ -ésima observación.

Cuadro 2. Análisis de varianza general para todos los experimentos, dependiendo del número de factores estudiados (ejemplo con tres factores).

F.V.	G.L.
bloques	$r-1$
A	$a-1$
B	$b-1$
C	$c-1$
AB	$(a-1) (b-1)$
AC	$(a-1) (c-1)$
BC	$(b-1) (c-1)$
ABC	$(a-1) (b-1) (c-1)$
Error	$(r-1) (abc-1)$
TOTAL	$(rabc-1)$

Todos los análisis de varianza, regresiones y superficies de respuesta se hicieron con la ayuda del "software" estadístico SAS (1985). Los gráficos se elaboraron con el "software Harvard Graphics".

En la mayoría de los casos, cuando los coeficientes de variación eran muy elevados, los análisis de varianza se hicieron previamente transformando los datos por medio de rangos, ordenando todos los datos y teniendo en cuenta los empates (Conover e Iman, 1981). Esto se hizo para que los datos se ajustaran a una distribución normal. Para hacer esto se utilizó el procedimiento RANK de SAS.

Cuando el efecto principal de los tratamientos con niveles cuantitativos fue significativo, se hizo un análisis de regresión, con el fin de obtener ecuaciones de predicción para ajustar las curvas correspondientes. Para ésto se utilizó el procedimiento GLM de SAS. Por otro lado, cuando el efecto de las interacciones entre dos factores con niveles cuantitativos fue significativo, se utilizó un proceso de ajuste empleando superficies de respuesta (Haaland, 1989). Para ello se utilizó el procedimiento RSREG de SAS.

Cuando se tuvieron datos perdidos por contaminación se utilizó la suma de cuadrados tipo III de SAS, para ajustar las sumas de cuadrados por el número diferente de observaciones (datos desbalanceados) y todas las medias se ajustaron por medio de mínimos cuadrados (procedimiento LSMEANS de SAS).

6. RESULTADOS Y DISCUSIONES.

6.1. Estudio de la meiosis del cacao.

Los resultados obtenidos del estudio de la meiosis del cacao se resumen en el Cuadro 3.

Estos resultados permiten determinar en forma indirecta el estado meiótico de los botones florales (Figura 1), mediante la medición de la longitud del botón floral, sin necesidad de hacer una observación al microscopio cada vez que se tenía que sembrar una antera. Estos resultados fueron muy útiles en los experimentos montados posteriormente, sin embargo no se deben considerar fijos y únicos, pues dependen de muchos factores, tales como: genotipo y condición fisiológica de la planta. Esta última depende de varios factores como temperatura ambiental, precipitación, época del año, daño de plagas y enfermedades, y condiciones nutricionales de la planta, entre otros. Por lo que se recomienda repetir éste estudio cada vez que se vaya a montar un experimento en el que se involucre el estado meiótico de las microsporas.

Cuadro 3. Relación entre longitud del botón floral y el estado meiótico de los granos de polen, para los dos genotipos en estudio.

GENOTIPO	LONGITUD DEL BOTON FLORAL (mm)	ESTADO MEIOTICO DE LA MICROSPORA
CATONGO	2,0 - 2,5	TETRADA
	3,0 - 5,0	UNINUCLEADO
	> 6,0	BINUCLEADO
SPA-9	2,0	TETRADA
	2,5 - 4,0	UNINUCLEADO
	> 5,0	BINUCLEADO

6.2. Efecto del hipoclorito de calcio sobre el control de contaminantes de cultivo.

Los resultados de éste experimento se muestran en la Figura 2, en la cual se consideran como contaminantes en condiciones *in vitro* tanto los hongos como las bacterias. Se puede apreciar que el mejor tratamiento fue el de aplicar el hipoclorito de calcio al 1% durante cinco minutos, ya que, si bien es cierto que otros tratamientos tuvieron igual efecto, la menor concentración durante el menor tiempo de exposición tiene mayores posibilidades de causar menor daño a las microsporas, por lo que se consideró como el más adecuado. Es importante hacer notar que éste tratamiento únicamente controló los hongos y bacterias que se encuentran en la superficie de los botones florales, no así las bacterias que se pueden encontrar dentro de las anteras, por lo que no se pudo lograr un 100% de tejidos sanos.

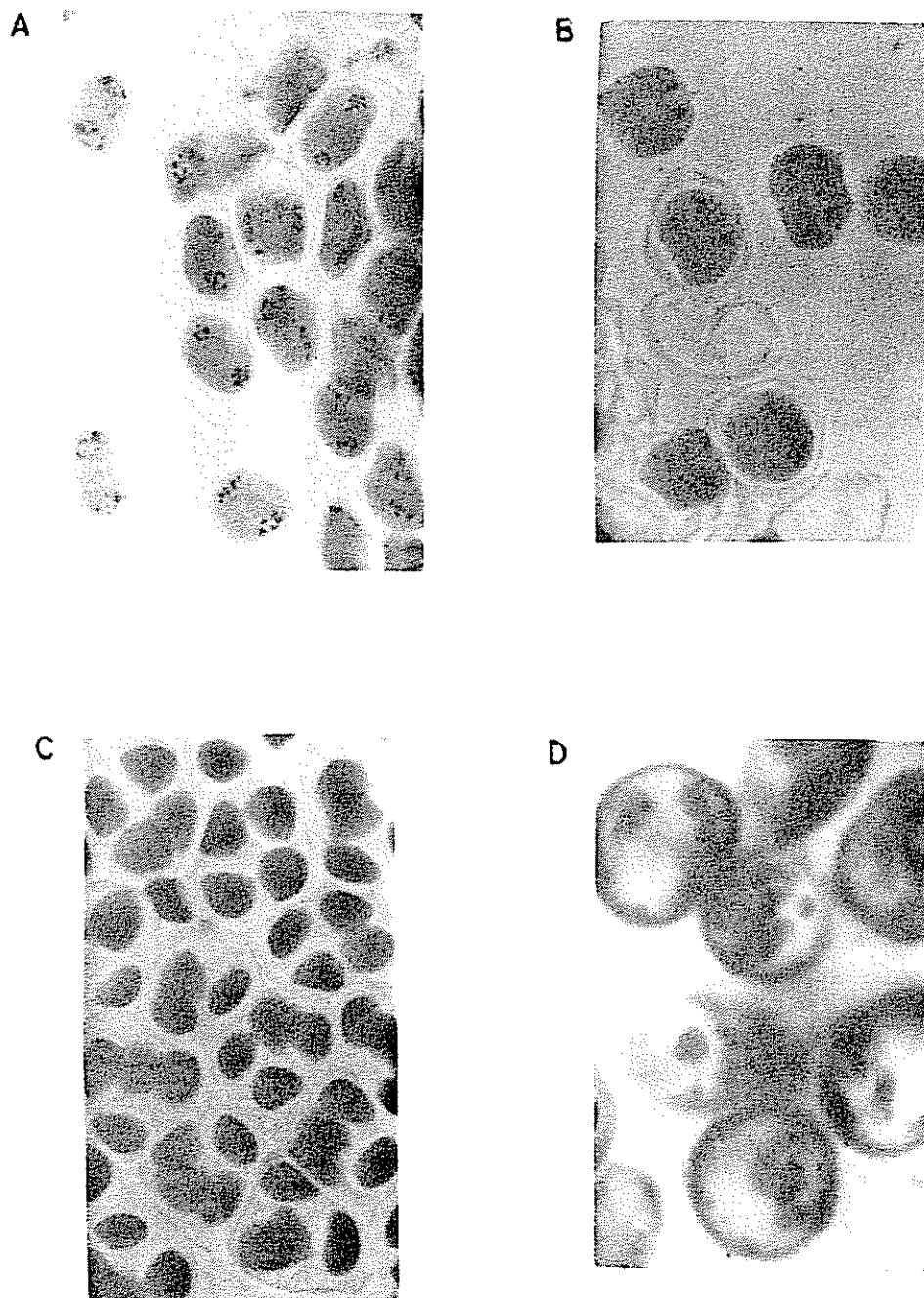


Figura 1. Granos inmaduros de polen en estados: A, anafase I. B, telofase II. C, tetrada. D, uninucleado.

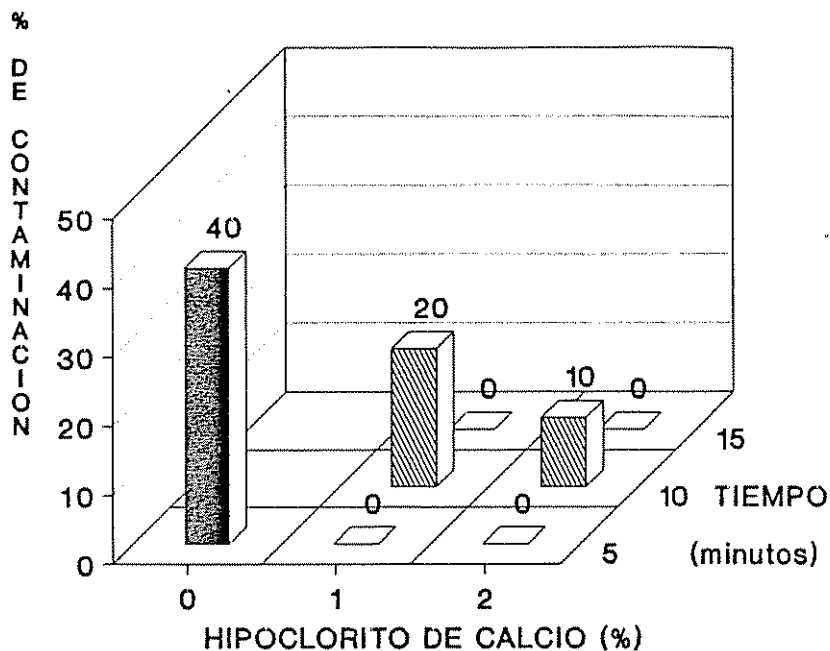


Figura 2. Estudio de concentraciones de hipoclorito de calcio y tiempo de exposición para controlar contaminación del medio de cultivo.

Pruebas posteriores sumergiendo botones en etanol al 70% durante un minuto, mostraron resultados similares a los obtenidos con el hipoclorito de calcio al 1% durante cinco minutos, siendo más práctico el uso de etanol, y probablemente menos tóxico para las microsporas.

La prueba con el colorante de Alexander mostró que los granos de polen inmaduro no sufrían ningún daño.

6.3. Efecto del genotipo, meiosis, luz, ANA, CIN, BA, pH, sacarosa, carbón activado y algunas de sus posibles interacciones, sobre la morfogénesis en anteras.

Con el objetivo de estudiar algunos factores que inciden en la morfogénesis sobre anteras de cacao, se montaron seis

experimentos, de los cuales se describen a continuación sus resultados:

6.3.1. Efecto del genotipo, meiosis, luz, ANA, CIN, y sus posibles interacciones, sobre la morfogénesis en anteras.

El análisis de varianza de éste experimento (Cuadro 4) detectó diferencias significativas entre bloques, ANA, CIN, luz, interacción ANA x CIN, e interacción meiosis x genotipo.

En éste experimento se logró la formación de callos a partir de anteras (Figura 3), en el 44% de los 96 tratamientos probados.

La superficie de respuesta de la interacción ANA x CIN, através de dos genotipos, dos estados meióticos de las microsporas y dos condiciones de luz, se ilustra en la Figura 4. Se observa una tendencia de mayor respuesta con valores mayores de CIN y ANA, evidenciando la necesidad de probar niveles más altos de los dos reguladores de crecimiento, para observar su comportamiento.

No se encontraron diferencias entre genotipos, lo cual evidencia la posibilidad de lograr callos en otros.

Se detectó una interacción entre el genotipo y el estado meiótico de los granos de polen, siendo el estado meiótico de tetrada el de mayor respuesta en el genotipo Catongo, mientras que con el genotipo SPA-9 la mayor respuesta se

Cuadro 4. Análisis de varianza para la variable formación de callo, a los 60 días de incubación. Experimento genotipo x meiosis x luz x ANA x CIN.

FV	GL	CM
BLOQUE	9	9,182**
ANA	3	205,059**
Lineal	1	4500772**
Cuadrática	1	1654612**
Cúbica	1	256789**
CIN	2	509,180**
Lineal	1	8376064**
Cuadrática	1	2163710**
ANA x CIN	6	52,876**
MEIOSIS	1	6,017
ANA x MEIOSIS	3	1,386
CIN x MEIOSIS	2	1,857
ANA x CIN x MEIOSIS	6	1,072
GENOTIPO	1	0,733
ANA x GENOTIPO	3	0,139
CIN x GENOTIPO	2	0,486
ANA x CIN x GENOTIPO	6	0,244
MEIOSIS x GENOTIPO	1	19,545**
ANA x MEIOSIS x GENOTIPO	3	4,416
CIN x MEIOSIS x GENOTIPO	2	4,639
ANA x CIN x MEIOSIS x GENOTI	6	2,042
LUZ	1	12,396*
ANA x LUZ	3	1,272
CIN x LUZ	2	3,544
ANA x CIN x LUZ	6	0,691
MEIOSIS x LUZ	1	3,133
ANA x MEIOSIS x LUZ	3	1,454
CIN x MEIOSIS x LUZ	2	0,784
ANA x CIN x MEIOSIS x LUZ	6	0,919
GENOTIPO x LUZ	1	0,012
ANA x GENOTIPO x LUZ	3	1,887
CIN x GENOTIPO x LUZ	2	0,797
ANA x CIN x GENOTIPO x LUZ	6	1,697
MEIOSIS x GENOTIPO x LUZ	1	0,380
ANA x MEIOSIS x GENOTI x LUZ	3	1,876
CIN x MEIOSIS x GENOTI x LUZ	2	5,202
ANA x CIN x MEI x GENO x LUZ	6	1,303
ERROR	751	2,1655
TOTAL	855	

CV = 34% (Datos transformados por rangos)

*(P<.05)

** (P<.01)

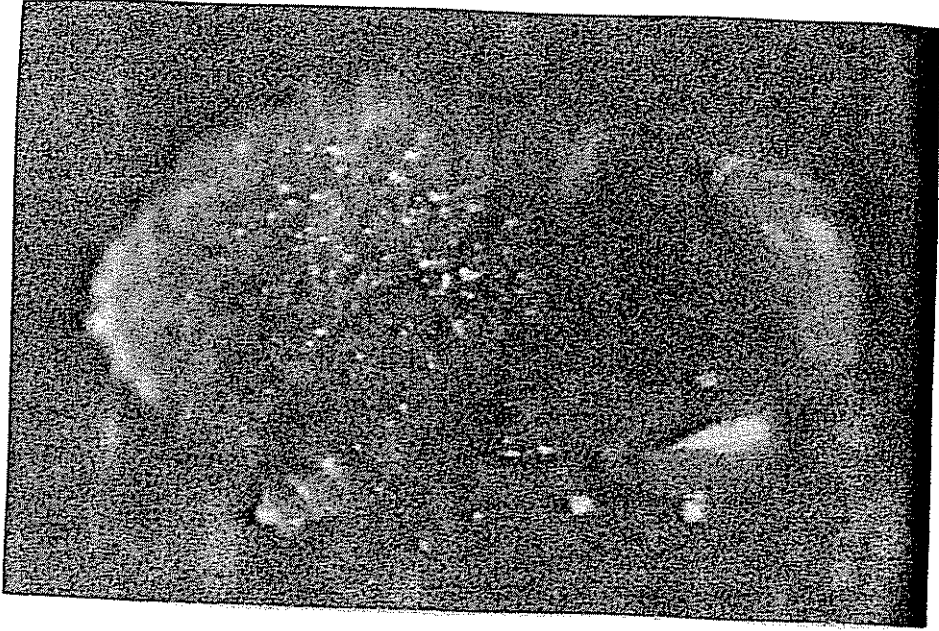


Figura 3. Ilustración de una antera, de la cual se empieza a formar un callo.

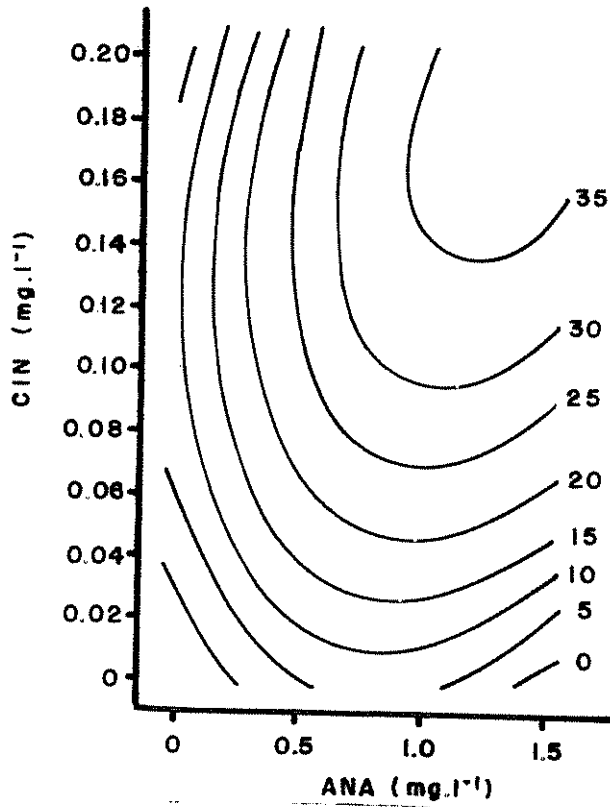


Figura 4. Superficie de respuesta de la interacción ANA x CIN, através de dos genotipos, dos estados meióticos y dos condiciones de luz. Experimento genotipo x meiosis x luz x ANA x CIN.

obtiene con el estado meiótico uninucleado (Figura 5). La mayoría de la literatura reporta mayores respuestas en el estado meiótico uninucleado y pocas veces en los estados tetrada y binucleado (Chu, 1982). De acuerdo con Sunderland (1979), los genotipos Catongo y SPA-9 caerían en las categorías de especies premitóticas y mitóticas, respectivamente. Parece ser que existe un mecanismo genético en cada genotipo que hace que a determinado estado de desarrollo de la microspora responda al estímulo de los reguladores del crecimiento. Es menos probable que las células de la pared de la antera tengan una diferenciación más rápida que las microsporas, y por lo tanto el cambio en la respuesta parece depender más del estado de desarrollo de las microsporas que del estado de diferenciación de las células de la pared. Por lo tanto, esto sugiere una mayor probabilidad de que el origen de los callos sea la microspora y no células de la pared de la antera.

Se encontró una mayor respuesta al incubar las anteras en obscuridad (Figura 6) que con luz (17,0 y 14,1% de formación de callo, respectivamente). Estos resultados coinciden con los obtenidos por Valverde (1989) y Aguilar (1990) en embriogénesis somática en cacao. En muchos cultivos la luz es necesaria para la inducción androgenética (Vasil, 1980), pero de acuerdo con los resultados para cacao parece que no es necesaria.

Debido a que la interacción CIN x meiosis x genotipo x luz fue casi significativa, se decidió hacer ocho superfi--

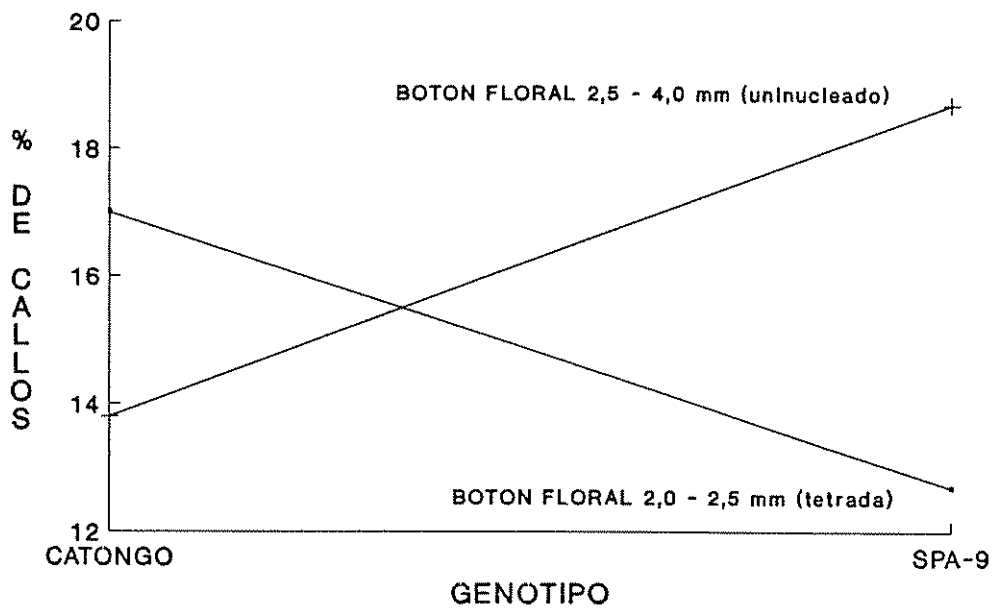


Figura 5. Interacción genotipo x meiosis. Experimento genotipo x meiosis x luz x ANA x CIN.

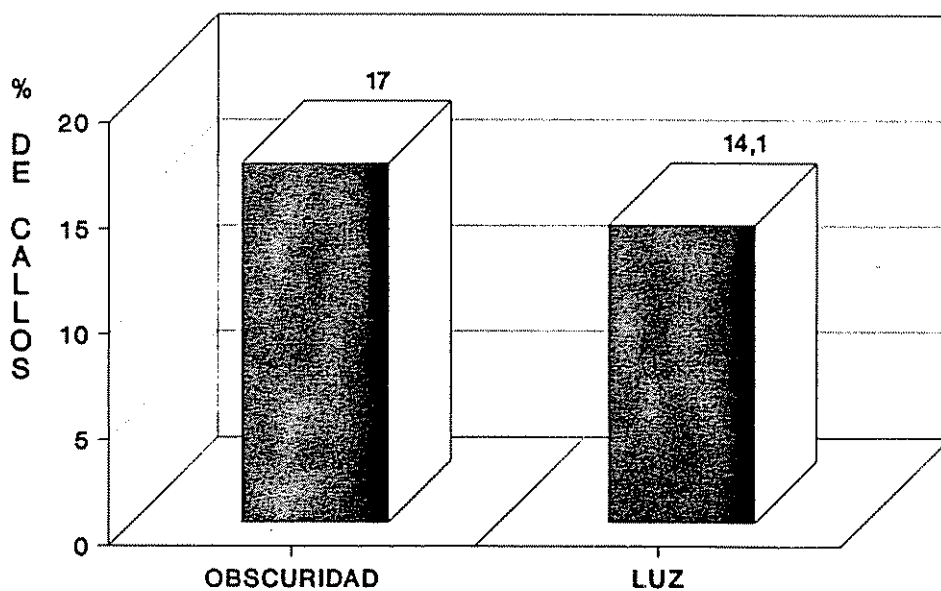


Figura 6. Efecto de las condiciones de luz sobre la formación de callos. Experimento genotipo x meiosis x luz x ANA x CIN.

cies de respuesta de ANA x CIN, una para cada combinación de genotipo x meiosis x luz (Figuras 7 y 8), éstas permiten llegar a predecir más rápido los niveles óptimos de cada factor cuya respuesta es máxima, a la vez que sirven de base para futuros trabajos. Para el genotipo Catongo se detectó que la mayor respuesta (alrededor del 41%) se consiguió en el estado meiótico de tetrada, incubado en obscuridad, con $1,5 \text{ mg.l}^{-1}$ de ANA y $0,20 \text{ mg.l}^{-1}$ de CIN (Figura 7.B.). También se observó la posibilidad de una mayor respuesta con niveles más altos de ANA y CIN. Para el genotipo SPA-9 se observó lo mismo, con la única diferencia que la mayor respuesta se obtiene en el estado meiótico uninucleado (Figura 8.D.). En todos los casos se observa que para lograr un buen porcentaje de callos es necesaria la presencia de ambos reguladores de crecimiento (interacción ANA x CIN).

Debido a que en éste experimento se necesitaron 960 viales, y que no se disponía de un refrigerador lo suficientemente grande para almacenar el medio de cultivo mientras se sembraban, se guardaron en la misma cámara de crecimiento bajo condiciones de luz. Para determinar si existía diferencias entre el porcentaje de callos producidos según los días transcurridos de la preparación de los medios, se hizo una gráfica para determinar la influencia de las condiciones de almacenamiento (Figura 9), en la que se observó que no influyeron las condiciones de almacenamiento, tal y como se esperaba.

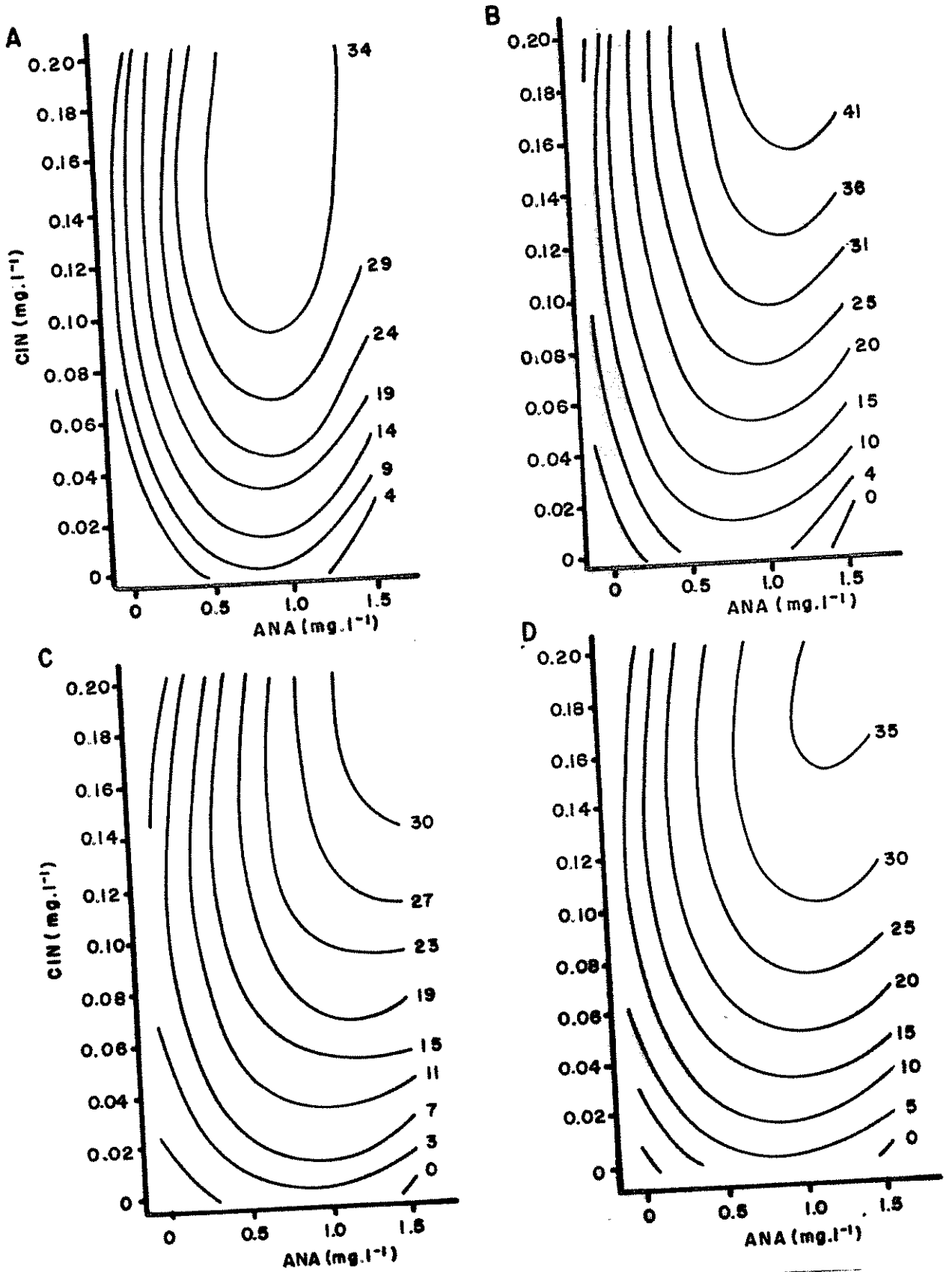


Figura 7. Superficies de respuesta en porcentaje de formación de callos, de la interacción ANA x CIN, para el genotipo Catongo. A, estado de tetrada incubado en luz. B, estado de tetrada incubado en oscuridad. C, estado uninucleado incubado en luz. D, estado uninucleado incubado en oscuridad. Experimento genotipo x meiosis x luz x ANA x CIN.

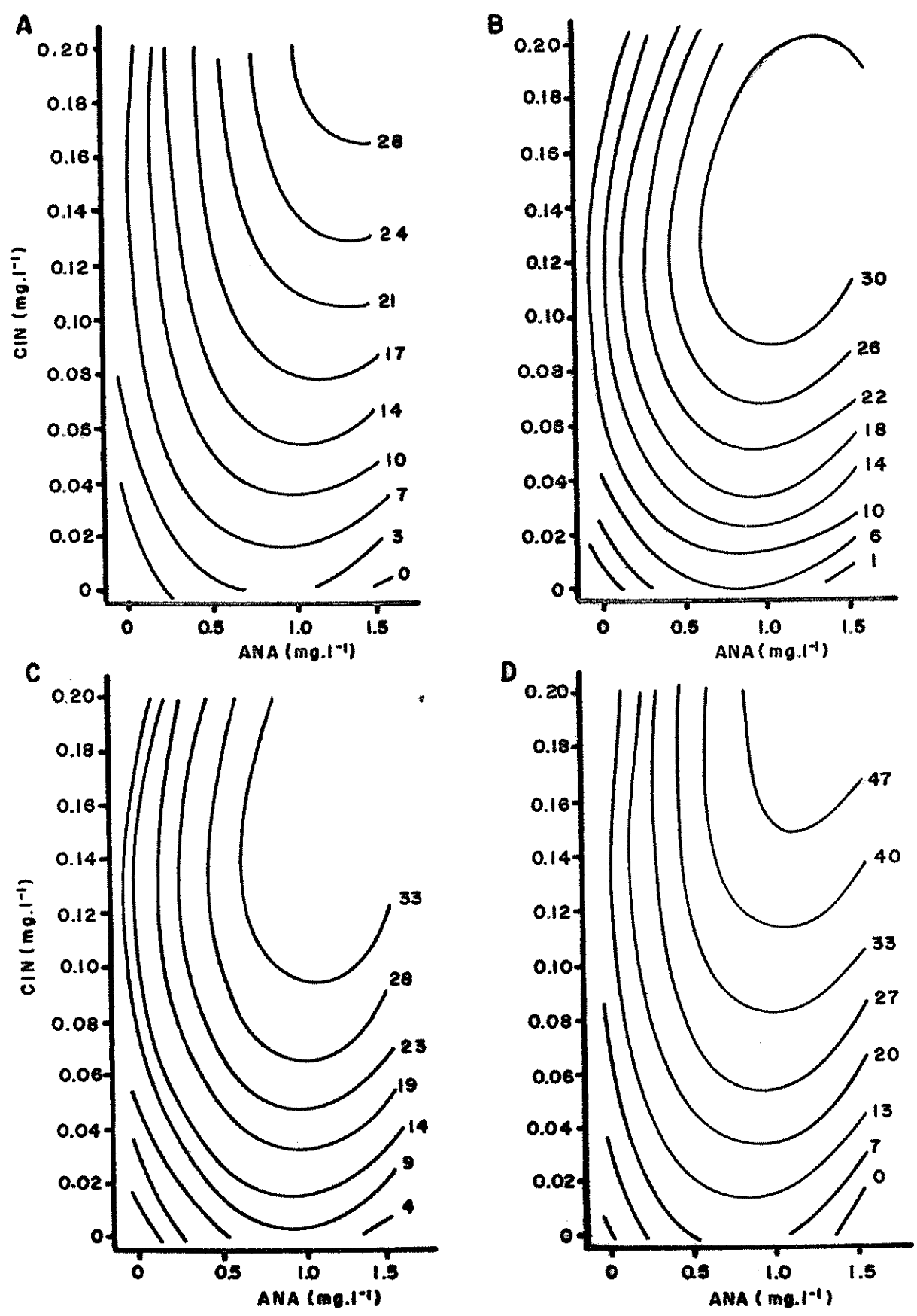


Figura 8. Superficies de respuesta en porcentaje de formación de callos, de la interacción ANA x CIN, para el genotipo SPA-9. A, estado de tetrada incubado en luz. B, estado de tetrada incubado en obscuridad. C, estado uninucleado incubado en luz. D, estado uninucleado incubado en obscuridad. Experimento genotipo x meiosis x luz x ANA x CIN.

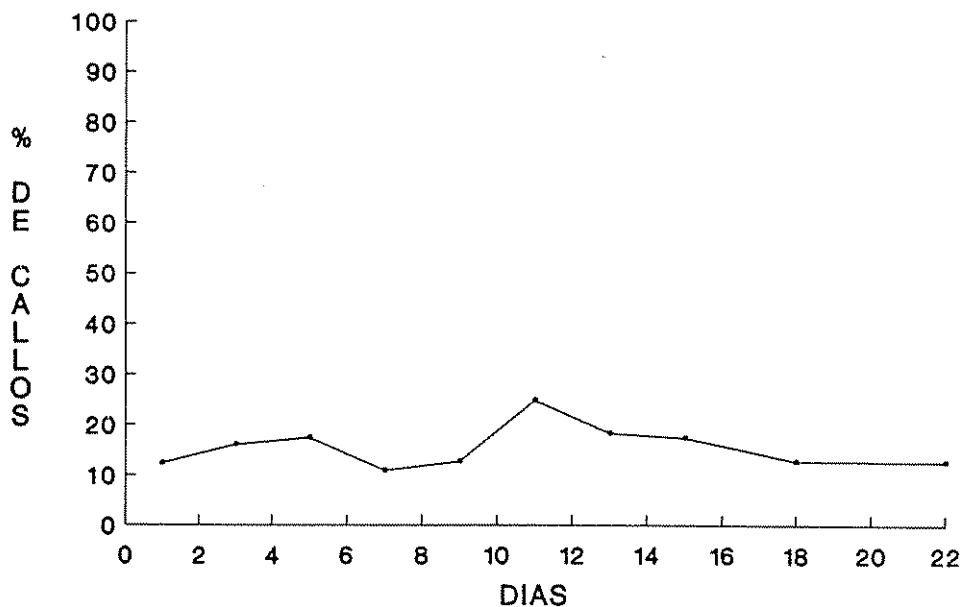


Figura 9. Porcentaje de callos formados según días de almacenamiento del medio. Experimento genotipo x meiosis x luz x ANA x CIN.

De los 960 viales que se utilizaron se contaminó el 9,2%, cifra que se considera aceptable.

6.3.2. Efecto del genotipo, ANA y CIN sobre la morfogénesis en anteras.

El análisis de varianza del experimento (Cuadro 5) detectó diferencias significativas entre genotipos a diferencia del experimento de genotipo x meiosis x luz x ANA x CIN (Cuadro 4). A pesar de que hubo diferencias en respuesta entre genotipos, existe la posibilidad de encontrar una respuesta similar en otros genotipos, pues ambos genotipos produjeron callos en buena cantidad (54 y 82% de callos para Catongo y SPA-9, respectivamente). La

diferencia en respuesta de los dos experimentos puede deberse a que en el primer experimento se probaron niveles menores de reguladores, mientras que en el segundo se probaron niveles mucho mayores, y el genotipo SPA-9 responde a niveles altos de ANA y CIN, mientras que el genotipo Catongo también responde, pero en una menor medida.

Cuadro 5. Análisis de varianza para la variable formación de callo a los 60 días de incubación. Experimento genotipo x ANA x CIN.

FV	GL	CM
BLOQUES	4	1170
GENOTIPO	1	72932**
ANA	4	838
Lineal	1	2309
Cuadrática	1	577
Cúbica	1	13123*
Grado Cuarto	1	3718
GENOTIPO x ANA	4	922
CIN	4	1800**
Lineal	1	18526*
Cuadrática	1	4876
Cúbica	1	8887
Grado Cuarto	1	6583
GENOTIPO x CIN	4	108
ANA x CIN	16	639
GENOTIPO x ANA x CIN	16	643
ERROR	196	520
TOTAL	249	

CV = 41% (Datos sin transformar)

*(P<.05)

** (P<.01)

El análisis no detectó ninguna interacción entre ANA y CIN, ni diferencias entre niveles de ANA, ésto significa que posiblemente se deben aplicar dosis más grandes de ANA

para obtener respuestas mayores. El análisis detectó diferencias entre niveles de CIN, lo cual evidencia que en éste experimento uno de los factores más importantes fue la CIN.

Debido a que se deseaba conocer la respuesta de la interacción ANA x CIN para cada genotipo, se hizo una superficie de respuesta para cada uno (Figura 10). La máxima respuesta del genotipo Catongo (alrededor del 54%, Figura 10.A.), en lo que a formación de callo se refiere, se obtuvo con $0,5 \text{ mg.l}^{-1}$ de ANA y con $0,2 \text{ mg.l}^{-1}$ de CIN, correspondiendo muy bien con los resultados obtenidos en el experimento genotipo x meiosis x luz x ANA x CIN (Figura 7.B.). Niveles superiores de cualquiera de los dos reguladores causa una baja en la formación de callos, posiblemente debido a toxicidad por exceso del regulador. La máxima respuesta del genotipo SPA-9 (alrededor del 82%, Figura 10.B.), se logró con $2,5 \text{ mg.l}^{-1}$ de ANA y $0,20 \text{ mg.l}^{-1}$ de CIN. Existe la posibilidad de aumentar la formación de callos aumentando un poco más el nivel de ANA. Las gráficas 10.B. y 8.D. no coinciden exactamente debido a la variabilidad de los datos medido por su coeficiente de variación (Cuadros 11A y 9A), sin embargo lo importante es observar las tendencias y predecir los niveles de reguladores de crecimiento que dan la máxima respuesta.

En general, se puede decir que el genotipo SPA-9 soporta o responde mejor a niveles más altos de auxina que el genotipo Catongo, probablemente debido a que Catongo pro

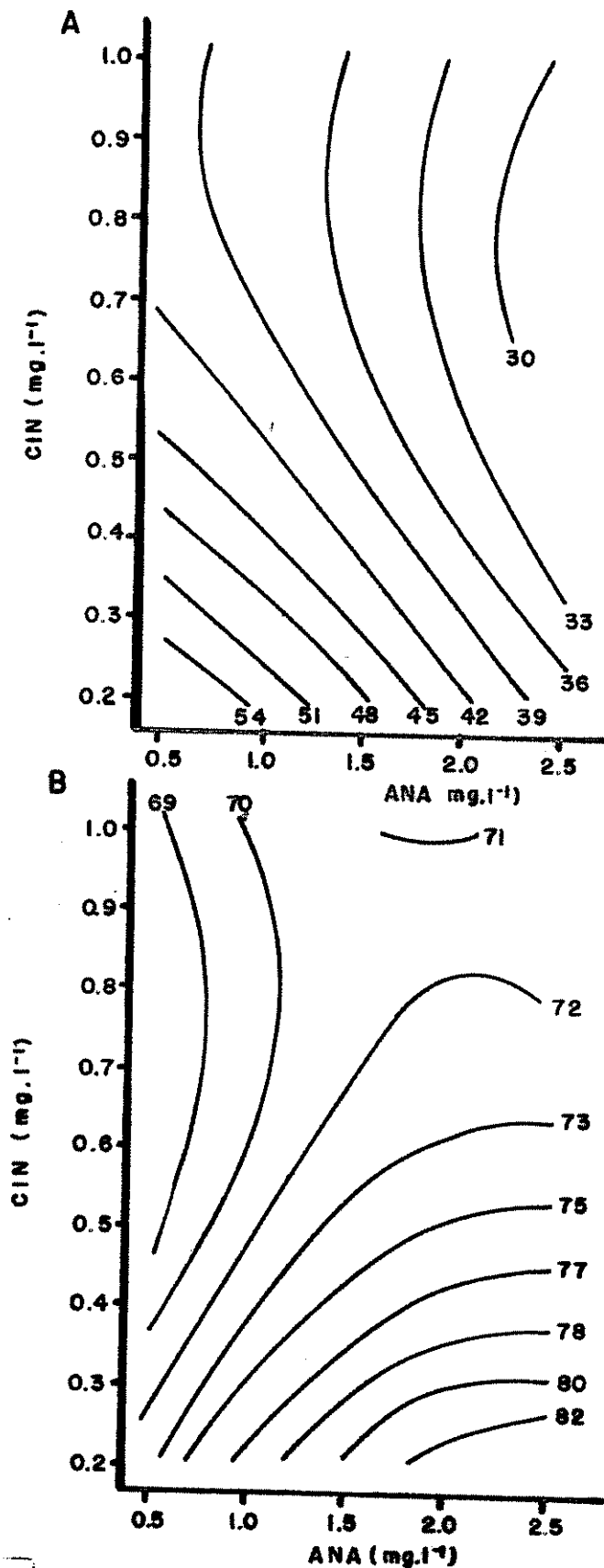


Figura 10. Superficies de respuesta en obscuridad (porcentaje de formación de callos), de la interacción ANA x CIN. A, genotipo Ca tongo, estado de tetradia. B, genotipo SPA-9, estado uninucleado. Experimento genotipo x ANA x CIN.

duce más auxinas en forma endógena que SPA-9.

En éste experimento no se tuvo ninguna contaminación.

6.3.3. Efecto del genotipo, meiosis, ANA y BA sobre la morfogénesis en anteras.

El análisis de varianza de éste experimento (Cuadro 6) detectó diferencias significativas entre genotipos, produciendo el genotipo SPA-9 4,2% más callos que el genotipo Catongo (Figura 11) a diferencia del experimento hecho con ANA y CIN, en el cual no hubo diferencias entre genotipos (Cuadro 5), ésto nos dice que es mejor utilizar combinaciones de ANA y CIN, que combinaciones de ANA y BA, ya que en la primera combinación no hay diferencias entre genotipos, mientras que en la segunda si hay. Además, la respuesta con ANA y CIN en términos generales es mayor que con ANA y BA. Las diferencias entre éstos dos experimentos puede deberse también a que en el experimento con BA se utilizaron niveles mucho más altos de reguladores que en el experimento con CIN.

Se encontró interacción entre genotipo x meiosis, respondiendo mejor el genotipo Catongo en estado meiótico de tetrada, mientras que el genotipo SPA-9 responde mejor en estado uninucleado (Figura 12), el comportamiento fue igual que en el experimento con ANA y CIN (Figura 5).

También se encontraron diferencias significativas entre niveles de BA y entre niveles de ANA. Finalmente, se

detectó una interacción triple entre genotipo x BA x ANA, para cuyo análisis e interpretación se hizo una superficie de respuesta entre BA y ANA para cada genotipo (Figura 13), las cuales permiten predecir los niveles óptimos de los reguladores para una respuesta máxima, a la vez que sirven

Cuadro 6. Análisis de varianza para la variable porcentaje de formación de callo a los 90 días de incubación. Experimento genotipo x meiosis x ANA x BA.

FV	GL	CM
BLOQUES	5	4380
GENOTIPO	1	11316*
MEIOSIS	1	15
GENOTIPO x MEIOSIS	1	18804*
BA	3	9265*
Lineal	1	6
Cuadrática	1	5767
Cúbica	1	21740**
GENOTIPO x BA	3	5442
MEIOSIS x BA	3	1274
GENOTIPO x MEIOSIS x BA	3	2375
ANA	2	328449**
Lineal	1	388933**
Cuadrática	1	262256**
GENOTIPO x ANA	2	2873
MEIOSIS x ANA	2	142
GENOTI x MEIOSIS x ANA	2	3899
BA x ANA	6	2835
GENOTIPO x BA x ANA	6	6346*
MEIOSIS x BA x ANA	6	2809
GENO x MEIO x BA x ANA	6	3566
ERROR	224	3028
TOTAL	276	

CV = 40% (Datos transformados por rangos)

*(P<.05)

** (P<.01)

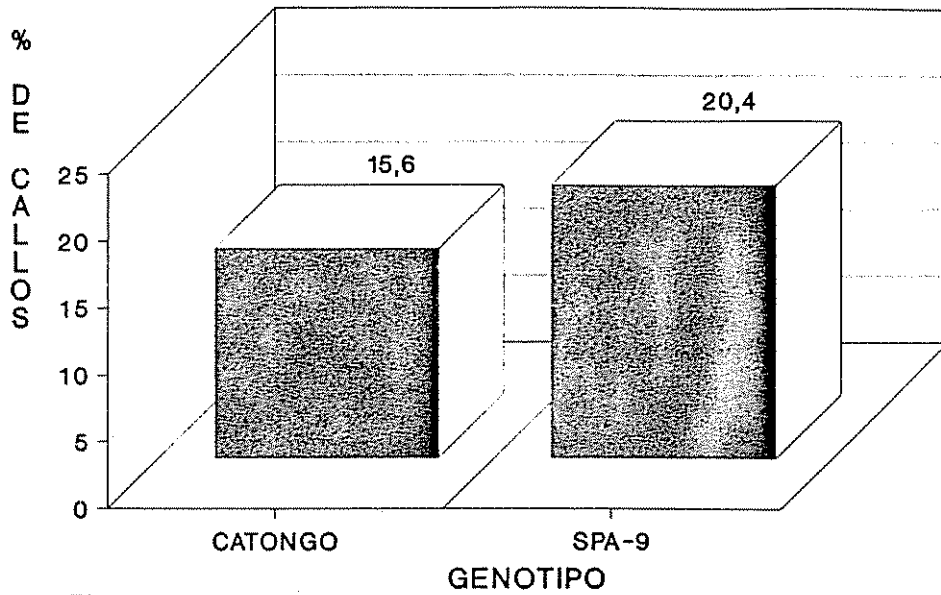


Figura 11. Efecto de genotipo sobre la formación de callos en anteras. Experimento genotipo x meiosis x ANA x BA.

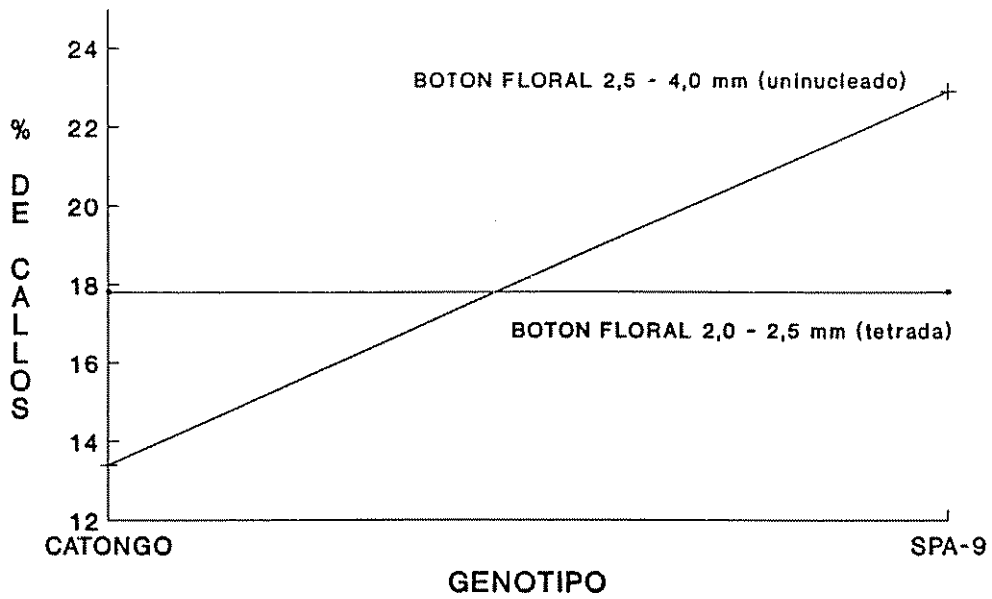


Figura 12. Interacción genotipo x meiosis. Experimento genotipo x meiosis x ANA x BA.

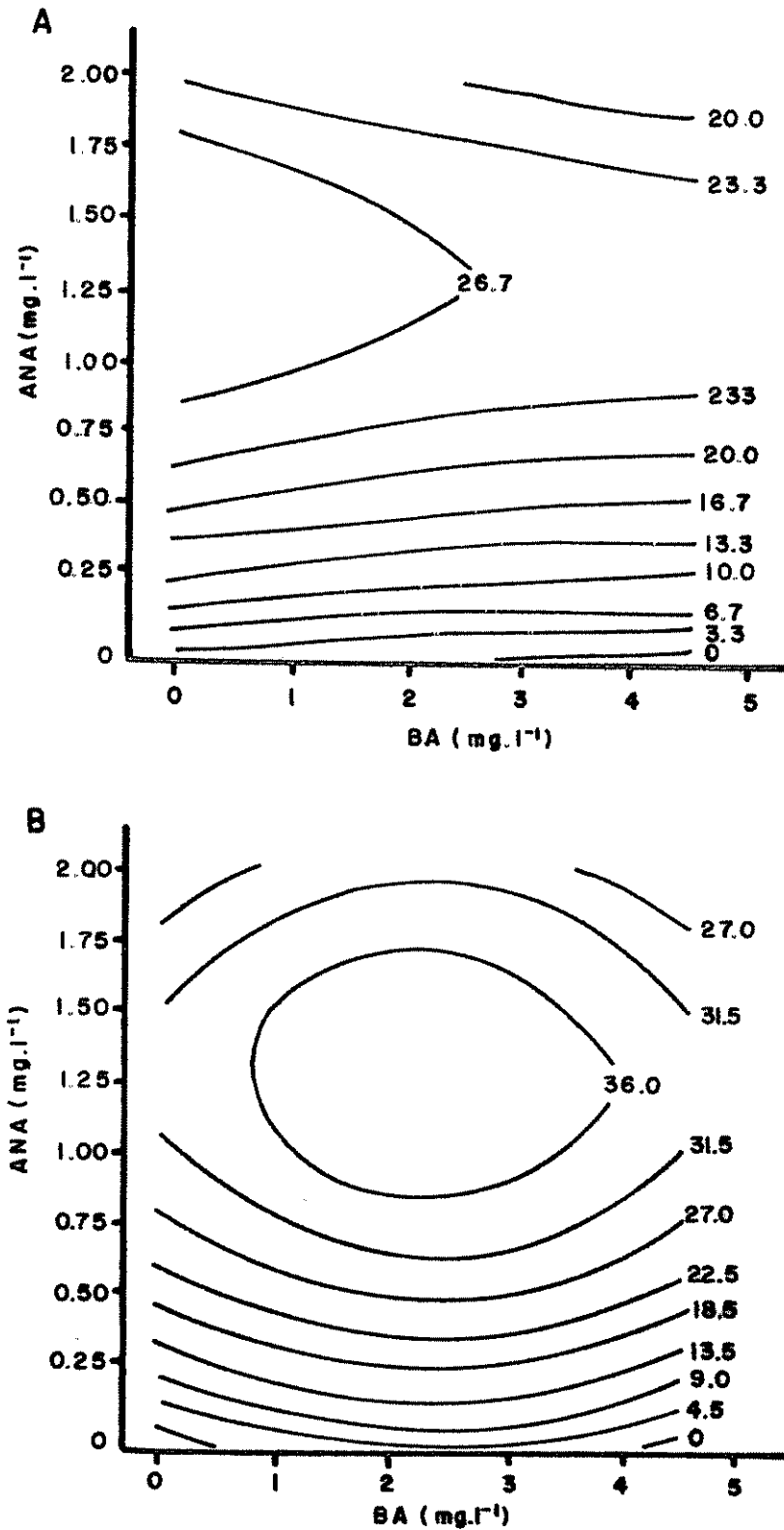


Figura 13. Superficies de respuesta en obscuridad (porcentaje de formación de callos), de la interacción ANA x BA, a través de dos estados melóuticos. A, genotipo Catongo. B, genotipo SPA-9. Experimento genotipo x meiosis x ANA x BA.

de base para trabajos futuros.

De acuerdo con la superficie de respuesta los valores máximos de formación de callo para el genotipo Catongo (Figura 13.A.), se consiguen aplicando únicamente $1,37 \text{ mg.l}^{-1}$ de ANA, no observándose ninguna interacción ANA x BA, mientras que para el genotipo SPA-9 (Figura 13.B.) la máxima respuesta se consigue aplicando $1,25 \text{ mg.l}^{-1}$ de ANA + $2,50 \text{ mg.l}^{-1}$ de BA, en cuyo caso si hay interacción entre ANA y BA. Se puede decir que existe un comportamiento diferente según sea el genotipo, el nivel de ANA y el nivel de BA. Existe un mecanismo regulado genéticamente que hace que la respuesta sea diferente según sean los niveles de ANA y BA. En general, se puede decir que el genotipo SPA-9 tolera niveles más altos de citocinina que Catongo, al igual que en el experimento genotipo x ANA x CIN, probablemente debido a que Catongo produce endógenamente citocininas.

No está demás aclarar que las superficies de respuesta tienen coeficientes de variación altos de 28 a 154% (Cuadros 1A al 13A) y por lo tanto hay que interpretarlas con cierta reserva o cuidado, pero son útiles para predecir niveles óptimos de combinaciones de reguladores de crecimiento, con cierto margen de error.

En éste experimento se tuvo 3,8% de contaminación de los 288 viales sembrados, el cual se considera aceptable.

6.3.4. Efecto del genotipo y niveles de pH sobre la morfogénesis en anteras.

El análisis de varianza del experimento (Cuadro 7) detectó diferencias significativas entre genotipos, niveles de pH y una interacción genotipo x pH, razón por la que se hizo un análisis de regresión para pH hasta de grado cinco, ya que se probaron seis niveles de pH y por lo tanto se cuenta con cinco grados de libertad, para cada genotipo. Con ésto se buscó la ecuación de regresión que ajustara mejor el comportamiento de los datos, a la vez que permite predecir el nivel óptimo para la máxima respuesta, y sirve de base para trabajos futuros. Se presentan los análisis de regresión sólo hasta el grado que fueron significativos (Cuadros 8 y 9).

Cuadro 7. Análisis de varianza para la variable porcentaje de formación de callo a los 60 días de incubación, através de dos genotipos. Experimento genotipo x pH.

FV	GL	CM
BLOQUES	9	507,05
GENOTIPO	1	8551,41**
pH	5	14307,17**
Lineal	1	690,21
Cuadrática	1	69660,19**
Cúbica	1	59,29
Grado Cuarto	1	135,04
Grado Quinto	1	991,12
GENOTIPO x pH	5	996,14*
ERROR	99	437,65
TOTAL	119	

CV = 35% (Datos transformados por rangos)

*(P<.05)

** (P<.01)

Cuadro 8. Análisis de varianza de la regresión de porcentaje de callos formados sobre pH del medio, y sus respectivas constantes (β), para el genotipo Catongo, a los 60 días de incubación. Experimento genotipo x pH.

FV	GL	CM	$\beta \pm \sigma_{\beta}$
pH	5		
LINEAL	1	6865,5**	-31,1910 \pm 7,7350
CUADRATICA	1	11119,7**	12,4847 \pm 2,4327
CUBICA	1	13159,6**	-1,0261 \pm 0,1838
ERROR	54	422,2	
TOTAL	59		

CV = 91%

$R^2 = 0,6658$

** (P < .01)

Cuadro 9. Análisis de varianza de la regresión de porcentaje de callos formados sobre pH del medio, y sus respectivas constantes (β), para el genotipo SPA-9, a los 60 días de incubación. Experimento genotipo x pH.

FV	GL	CM	$\beta \pm \sigma_{\beta}$
pH	5		
LINEAL	1	5495,3**	-118,1031 \pm 38,0533
CUADRATICA	1	5555,8**	59,7019 \pm 19,1311
CUBICA	1	4459,2**	-8,6225 \pm 3,0841
GRADO CUATRO	1	3242,3*	0,3819 \pm 0,1602
ERROR	54	570,5	
TOTAL	59		

CV = 58%

$R^2 = 0,8155$

* (P < .05)

** (P < .01)

Con base en los parámetros estimados se llegó a establecer la ecuación de predicción para el genotipo Catongo, siendo la siguiente (Figura 14):

$$Y\% \text{ callos} = -31,19 \text{ pH} + 12,48 \text{ pH}^2 - 1,03 \text{ pH}^3$$

El punto de máxima formación de callos (43,0%) con base en la regresión se alcanza cuando el pH es 6,6.

Para el genotipo SPA-9 la ecuación encontrada es la siguiente:

$$Y\% \text{ callos} = -118,10 \text{ pH} + 59,70 \text{ pH}^2 - 8,62 \text{ pH}^3 + 0,38 \text{ pH}^4$$

El punto de máxima formación (73,5%) con base en la regresión se alcanza cuando el pH es 5,9 (Figura 14).

Debido a que biológicamente se espera que a pH cero el porcentaje de formación de callo sea cero, el cálculo de las ecuaciones se hizo sin intercepto.

En éste experimento no se tuvo ninguna contaminación.

Estos resultados coinciden con los encontrados por Valverde (1989) y Aguilar (1990) para embriogénesis somáti-

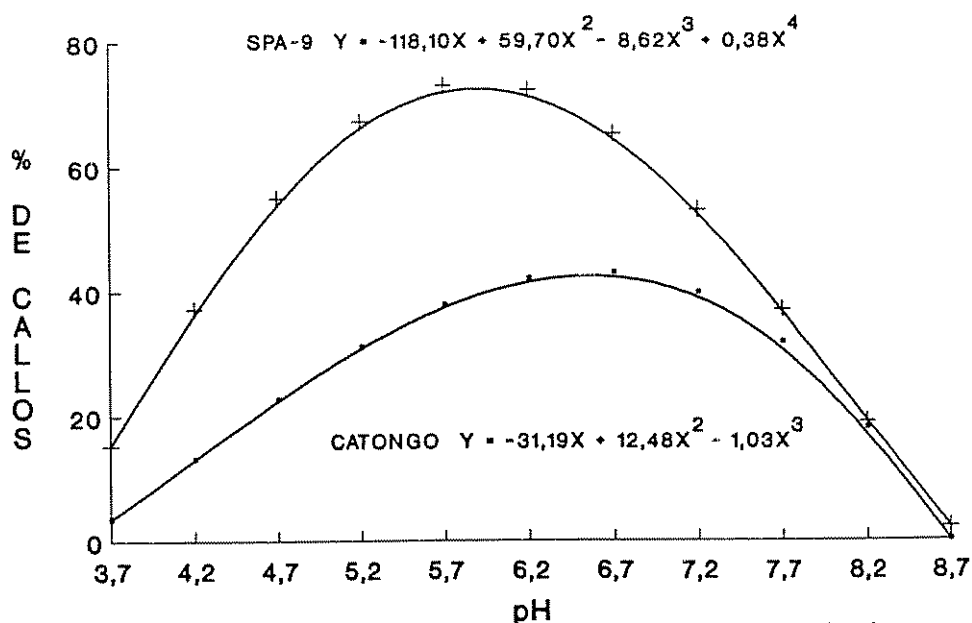


Figura 14. Curvas de regresión de porcentaje de formación de callos sobre pH del medio, para los dos genotipos en estudio.

ca en cacao, únicas referencias encontradas en lo que a pH se refiere, y demuestran que el pH es importante tanto en la embriogénesis somática como en la callogénesis.

Cada genotipo tiene mayor o menor capacidad genética de combinar los iones de Hidrógeno libres en el medio, con otros elementos químicos, para construir los compuestos necesarios para desarrollar callos.

6.3.5. Efecto del genotipo y niveles de sacarosa sobre la morfogénesis en anteras.

El análisis de varianza de éste experimento (Cuadro 10) reveló una diferencia altamente significativa entre

Cuadro 10. Análisis de varianza para porcentaje de formación de callo a los 60 días de incubación. Experimento genotipo x sacarosa.

FV	GL	CM
BLOQUES	9	677,69
GENOTIPO	1	4113,59**
SACAROSA	5	13905,42**
Lineal	1	74,45
Cuadrática	1	46963,04**
Cúbica	1	18967,64**
Grado Cuarto	1	2756,97*
Grado Quinto	1	163,26
GENOTIPO x SACAROSA	5	444,08
ERROR	97	470,09
TOTAL	117	

CV = 36% (Datos transformados por rangos)

*(P<.05)

** (P<.01)

Cuadro 11. Análisis de varianza de la regresión de porcentaje de callos formados sobre dosis de sacarosa aplicada al medio de cultivo, y sus respectivas constantes (β), para el genotipo Catongo, a los 60 días de incubación. Experimento genotipo x sacarosa.

FV	GL	CM	$\beta \pm \sigma_B$
DOSIS DE SACAROSA	5		
LINEAL	1	25630**	2,4246 \pm 0,2787
CUADRATICA	1	13114**	-0,0336 \pm 0,0054
CUBICA	1	7709**	0,0001 \pm 0,0000
ERROR	54	339	
TOTAL	59		

CV = 75%

$R^2 = 0,7513$

**($P < .01$)

Cuadro 12. Análisis de varianza de la regresión de porcentaje de callos formados sobre dosis de sacarosa aplicada al medio de cultivo, y sus respectivas constantes (β), para el genotipo SPA-9, a los 60 días de incubación. Experimento genotipo x sacarosa.

FV	GL	CM	$\beta \pm \sigma_B$
DOSIS DE SACAROSA	5		
LINEAL	1	30699**	2,6916 \pm 0,3331
CUADRATICA	1	14579**	-0,0358 \pm 0,0064
CUBICA	1	8602**	0,0001 \pm 0,0000
ERROR	53	470	
TOTAL	58		

CV = 63%

$R^2 = 0,7786$

**($P < .01$)

genotipos y entre niveles de sacarosa, sin embargo, con fines de precisión en los resultados, se hizo una regresión hasta de grado cinco de los niveles de sacarosa, para cada

genotipo en estudio (Cuadros 11 y 12). Esto permite predecir el nivel óptimo para la máxima respuesta.

Con base en los parámetros estimados se llegó a establecer la ecuación de predicción para el genotipo Catongo, siendo la siguiente (Figura 15):

$$Y_{\% \text{callos}} = 2,4246 \text{ DOSIS} - 0,0336 \text{ DOSIS}^2 + 0,0001 \text{ DOSIS}^3$$

El punto de máxima formación de callos (50,2 %) con base en la regresión se alcanza cuando el nivel de sacarosa es de 45,2 g.l⁻¹.

Para el genotipo SPA-9 la ecuación encontrada es la siguiente:

$$Y_{\% \text{ callos}} = 2,6916 \text{ DOSIS} - 0,0358 \text{ DOSIS}^2 + 0,0001 \text{ DOSIS}^3$$

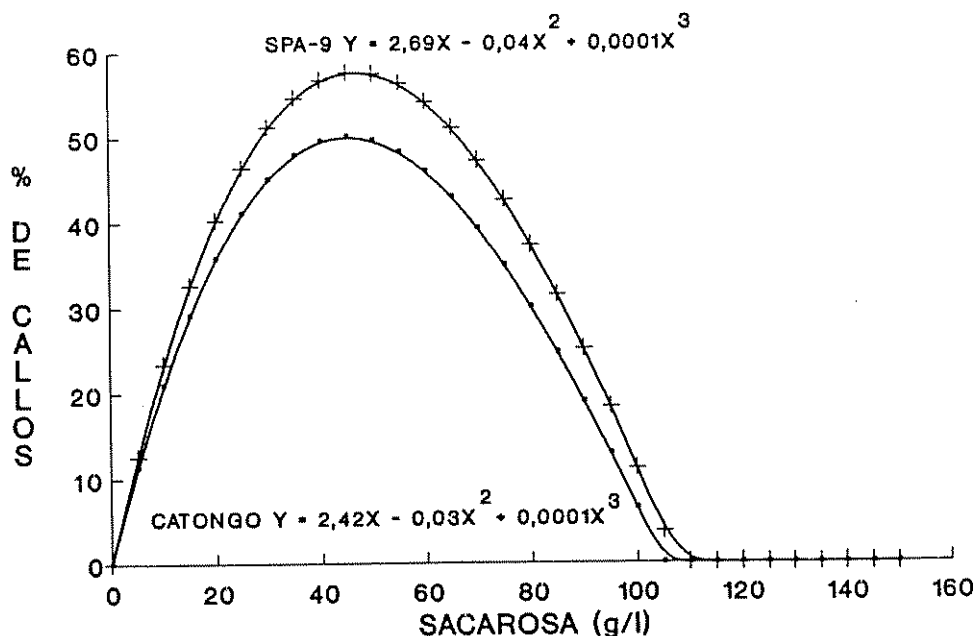


Figura 15. Curvas de regresión de porcentaje de callos formados, sobre dosis de sacarosa, para los dos genotipos en estudio.

El punto de máxima formación (57,8 %) con base en la regresión se alcanza cuando el nivel de sacarosa es de 46,7 g.l⁻¹ (Figura 15).

Debido a que biológicamente se espera que con un nivel de cero sacarosa el porcentaje de formación de callo sea cero, el cálculo de las ecuaciones se hizo sin intercepto.

Estos resultados coinciden con los encontrados por Valverde (1989) para embriogénesis somática en cacao. En términos generales éstos resultados coinciden también con los de Ascanio (1987), Nitsch y Norrel (1972), Sunderland (1974), Claphan (1971), Wang et al (1974), Keller et al (1975) y Sopory et al (1978), quienes reportan rangos óptimos entre 2 y 16% de sacarosa, para cultivo de anteras en diferentes especies.

En éste experimento se tuvo 1,7% de contaminación.

6.3.6. Efecto del genotipo y carbón activado sobre la morfogénesis en anteras.

El análisis de varianza del experimento (Cuadro 13) detectó diferencias altamente significativas entre niveles de carbón activado, sin embargo, no se hicieron regresiones debido a que sólo se encontró respuesta con el nivel cero de carbón (32 y 60% de respuesta para los genotipos Catongo y SPA-9, respectivamente), es decir, que niveles entre 0,25 y 0,75 g.l⁻¹ de carbón inhiben la formación de callos.

En éste experimento no se tuvo ninguna contaminación.

Cuadro 13. Análisis de varianza para la variable porcentaje de formación de callo a los 60 días de incubación. Experimento genotipo x carbón activado.

FV	GL	CM
BLOQUES	4	11,08
GENOTIPO	1	24,02
CARBON	3	810,00**
GENOTIPO x CARBON	3	24,02
ERROR	28	9,86
TOTAL	39	

** (P<.01)

Estos resultados no coinciden con los trabajos de Sopory et al (1978), Wenzel (1979), Anagnostakis (1974), Bajaj (1978), Johansson y Eriksson (1977), Fridborg y Eriksson (1975), ni Weatherhead et al (1978), en los cuales se encontró que el carbón activado estimula la formación de callos. El carbón activado absorbe inhibidores del crecimiento que se encuentran presentes en el agar o que se liberan de las paredes de las anteras en senescencia (Sopory et al, 1978; Wenzel, 1979), o también por la absorción del 5-hydroxy-methyl furfural producido por la sacarosa durante la esterilización del medio en autoclave (Weatherhead et al, 1978). En nuestro experimento con carbón activado es probable que no hayan habido inhibidores del crecimiento en el agar, ni se hayan liberado de las paredes de las anteras. Lo que ocurrió fue que el carbón activado absorbió los reguladores del crecimiento que estimulan la formación de los callos, sin dejar cantidades suficientes para su inducción. Es necesario probar otros niveles en cacao, probablemente niveles más bajos de carbón

activado que los probados puedan absorber los posibles inhibidores de la embriogénesis, pero dejar disponible alguna cantidad de reguladores aplicados al medio para que las anteras desarrollen embriones, o aplicar cantidades mucho mayores de reguladores de crecimiento para que cuando el carbón activado absorba los inhibidores de la embriogénesis aún quede disponible alguna cantidad suficiente para inducir la embriogénesis.

En términos generales, concluidos los seis experimentos, se puede decir que se superó los resultados de Esan (1981), en cuanto a la formación de callos a partir de anteras, pues él obtuvo un 50% de callos a partir de anteras, mientras que en éste trabajo se logró hasta un 82% de callos.

No se obtuvo embriogénesis directa, probablemente debido a que se utilizaron niveles muy altos de Auxinas y niveles muy bajos de Citocininas, ya que las Auxinas promueven el desarrollo de callos, mientras que generalmente se necesita un balance adecuado entre Auxinas y Citocininas para inducir la embriogénesis. Es necesario probar niveles más bajos de Auxinas con niveles más altos de Citocininas para tratar de inducir la embriogénesis directa sobre anteras, o embriogénesis indirecta u organogénesis sobre callos formados.

6.4. Estudio del origen de los callos.

En la primera parte del estudio, de las 140 anteras que se estudiaron durante el muestreo que duró 28 días, no se pudo observar ninguna microspora en división, únicamente se observó en una antera de 28 días de sembrada que empezaba a formar un callo, originándose de la pared de la antera (Figura 16). También se observó un alargamiento de las células de la pared de la antera y divisiones celulares transversales. No se observó acumulación de sustancias de reserva y los núcleos y nucleolos, aunque se pudieron observar, no eran demasiado grandes como para decir que las células eran embriogénicas.

En la segunda parte del estudio, de las 60 anteras con callo estudiadas, pertenecientes a cuatro diferentes tratamientos, se pudo observar que todos los callos tenían su origen en la pared de la antera. Esto hace pensar que la pared de la antera es un obstáculo para el desarrollo de la androgénesis, ya que absorbe los reguladores del crecimiento y no los deja disponibles a las microsporas, ó bien, las células de la pared responden más rápido al estímulo de los reguladores ó a los niveles que se probaron. Es necesario buscar los niveles más adecuados de citocininas y auxinas que induzcan la respuesta de las microsporas y no de células de la pared. Una forma de eliminar el problema puede ser tratando de cultivar microsporas inmaduras de polen, en forma aislada.



Figura 16. Corte transversal de una antera, mostrando el inicio de la formación de un callo, a partir de células de la pared.

Debido a que éste fue un estudio preliminar se recomienda hacer un estudio más completo, incluyendo más tratamientos, ya que únicamente se estudiaron cuatro.

6.5. Efecto de la CIN, ZEA, ANA y BA sobre la organogénesis en callos.

Para estudiar el efecto de la CIN, ZEA, ANA y BA sobre la organogénesis en callos, se montaron tres experimentos, cuyos resultados se describen a continuación:

6.5.1. Efecto de la CIN y ZEA sobre la organogénesis en callos.

En éste experimento se logró regenerar raíces a partir de callos.

Debido a que la respuesta fue muy baja (12 raíces de 800 viales), no se hizo un análisis de varianza, únicamente se hizo una interpretación gráfica de los resultados (Figura 17.A.), y en la cual podemos observar que ni la ZEA ni la CIN, ni la interacción de ambas influyen en la formación de raíces, debido a que el tratamiento testigo produjo igual cantidad de raíces (6%). Se observó que seis de los tratamientos anteriores con los cuales se formaron callos, formaron raíces. Estos tratamientos pueden ser cualquier combinación de ANA entre 0,5 y 1,5 mg.l⁻¹ y CIN entre 0,1 y 0,2 mg.l⁻¹.

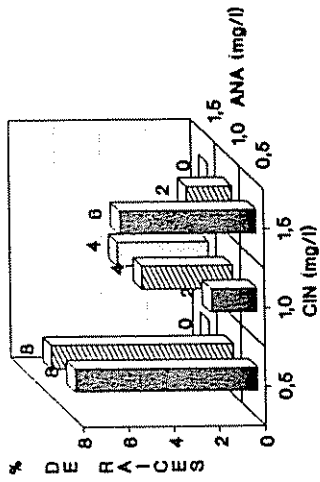
Detalle de una de las raíces obtenidas se ilustra en la Figura 18.

El porcentaje de viales contaminados en éste experimento fue de 0,7%.

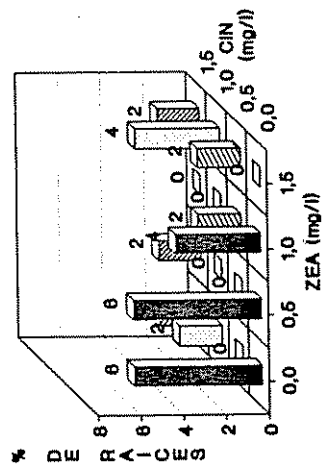
6.5.2. Efecto del ANA y CIN sobre la organogénesis en callos.

Se logró la regeneración de raíces a partir de callos, sin embargo, la respuesta también fue muy baja (de 450 callos sólo 17 formaron raíz), no pasando de un 8% por tratamiento, razón por la cual no se hizo análisis de vari-

B.



A.



C.

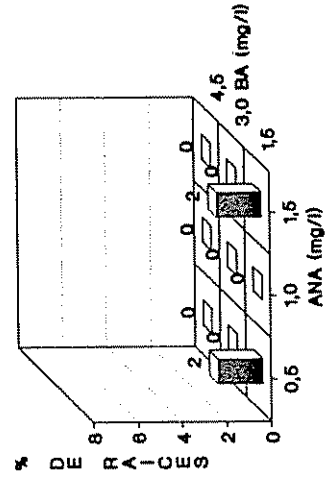


Figura 17. Efecto de reguladores de crecimiento sobre la organogénesis en callos. A, ZEA x CIN. B, ANA x CIN. C, ANA x BA.

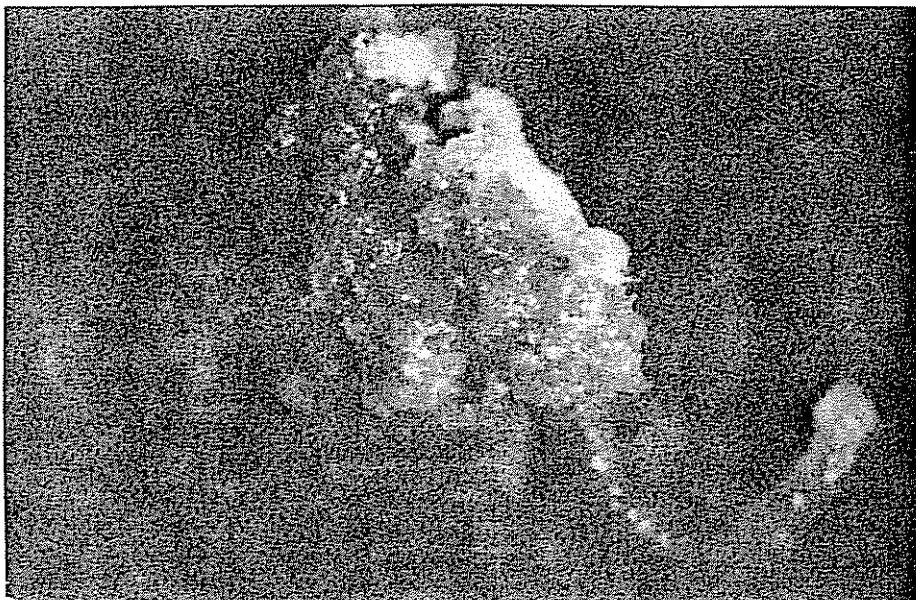


Figura 18. Fotografía de una raíz formada a partir de un callo.

anza. Se observó que a medida que se aumentan los niveles de CIN y ANA la respuesta en cuanto a formación de raíces es menor (Figura 17.B.), es decir, que el efecto del ANA y CIN es más bien inhibitorio que promotor.

En éste experimento se tuvo un 0,2% de viales contaminados.

6.5.3. Efecto de la BA y ANA sobre la organogénesis en callos.

En éste experimento también se logró la regeneración de raíces a partir de callos, sin embargo la respuesta fue aún más baja que en los experimentos precedentes (de 450

callos sólo se formaron dos raíces (2% máximo por tratamiento, Figura 17.C.), razón por la cual no se hizo análisis de varianza. Únicamente hubo respuesta en dos tratamientos.

La contaminación de los viales en éste experimento fue de 1,1%.

Los resultados en los tres experimentos fueron muy similares, observándose, en términos generales, que al cambiar de regulador con el que se forman los callos, la respuesta a rizogénesis es menor y se observó mayor necrosamiento de los callos.

Los resultados obtenidos son muy similares a los encontrados por Esan (1981), quien logró regenerar raíces en un 15% de los callos, mientras que en éstos experimentos se obtuvo un 8% de rizogénesis, con el tratamiento testigo, es decir, sin aplicar ningún regulador de crecimiento a los callos.

Se puede concluir que la formación de raíces se origina por los niveles de reguladores del crecimiento aplicados para la formación del callo, o por la sintetización endógena de reguladores de crecimiento por parte del callo. Esto es similar a lo que ocurre en partes de plantas que han sido cortadas y que naturalmente forman raíces.

Basado en los resultados anteriores y sabiendo que los callos tienen cualidades organogénicas y considerando lo anterior se plantea la posibilidad de poder regenerar

plantas o embriones a partir de callos, aumentando los niveles de Citocinina y bajando los niveles de Auxina al momento de sembrar las anteras o aplicándolos a callos, pero en niveles mayores.

6.6. Efecto de la ZEA, GA₃, ABA, ANA y CIN sobre el establecimiento de suspensiones celulares a partir de callos.

Para determinar el efecto de la ZEA, GA₃, ABA, ANA y CIN, sobre el establecimiento de suspensiones celulares procedentes de callos, se establecieron tres experimentos, cuyos resultados se describen a continuación:

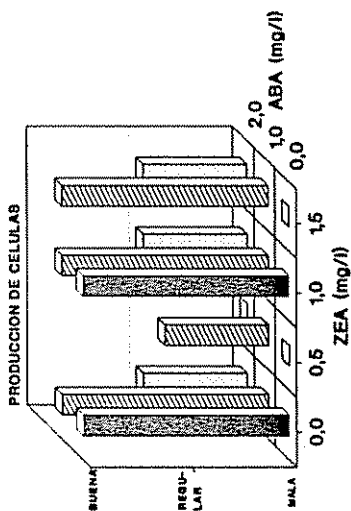
6.6.1. Efecto de la ZEA y GA₃ sobre el establecimiento de suspensiones celulares a partir de callos.

Se logró obtener suspensiones celulares a partir de callos, la literatura no reporta un logro similar en cacao. Unicamente dos tratamientos fueron tan buenos como el testigo en cuanto a la formación de células (Figura 19.A.), los demás tienden a inhibir la formación de suspensiones celulares.

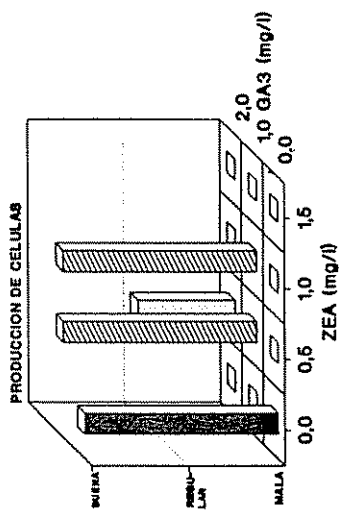
6.6.2. Efecto de la ZEA y ABA sobre el establecimiento de suspensiones celulares a partir de callos.

En éste experimento también se logró la suspensión de células a partir de callos friables, los resultados fueron

B.



A.



C.

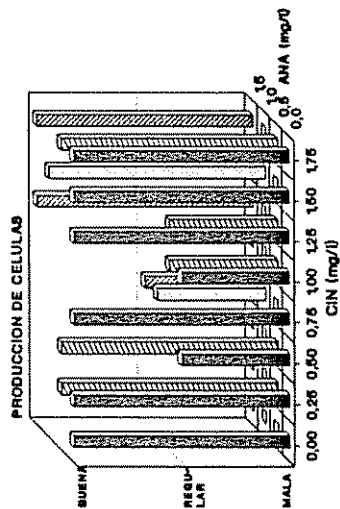


Figura 19. Efecto de la ZEA, GA3, ABA, ANA y CIN sobre el establecimiento de suspensiones celulares a partir de callos. A, ZEA x GA3. B, ZEA x ABA. C, ANA x CIN.

muy similares al experimento anterior, sin embargo, en éste experimento se observó una mayor respuesta.

Cuatro tratamientos fueron igual al testigo y los demás tendieron a inhibir la formación de suspensiones (Figura 19.B.).

Histológicamente no se observó mayores diferencias entre tratamientos, a excepción de dos que formaron estructuras proembriogénicas de cinco y seis células, éstos fueron: $0,5 \text{ mg.l}^{-1}$ de ZEA + $2,0 \text{ mg.l}^{-1}$ de ABA (Figura 20.A.) y $1,0 \text{ mg.l}^{-1}$ de ZEA + $2,0 \text{ mg.l}^{-1}$ de ABA (Figura 20.B.).

6.6.3. Efecto del ANA y CIN sobre el establecimiento de suspensiones celulares a partir de callos.

En éste experimento también se logró la suspensión de células a partir de callos friables, los resultados fueron muy similares a los experimentos anteriores, sin embargo, se observó una mayor respuesta de los tratamientos. Aquí 11 tratamientos fueron igual al testigo y los demás tendieron a inhibir la formación de suspensiones (Figura 19.C.).

Histológicamente no se observó mayores diferencias entre tratamientos, a excepción de dos que formaron estructuras proembriogénicas de hasta ocho células, estos fueron: $1,00 \text{ mg.l}^{-1}$ de CIN (Figura 20.C.) y $1,75 \text{ mg.l}^{-1}$ de CIN (Figura 20.D.).

En todos los tratamientos de los tres experimentos se observaron diversos tipos de células: alargadas, esféricas,

en constante división, con muchas estructuras de reserva de nutrientes y formando callos.

Existe la posibilidad de que al transferir parte de éstas suspensiones celulares a medio sólido con y sin reguladores del crecimiento desarrollen los proembriones y se formen embriones (Marroquín, 1991).

Las suspensiones celulares son muy importantes pues con ellas es posible hacer trabajos futuros, tales como: obtención y fusión de protoplastos, transformaciones genéticas, ingeniería genética, selección *in vitro* de variantes y prueba de clones a resistencia de enfermedades por medio de toxinas. Su tasa de multiplicación es elevada, convirtiéndose así en una potencial fuente inagotable de células y por ende de embriones para una multiplicación masiva de líneas homocigóticas.

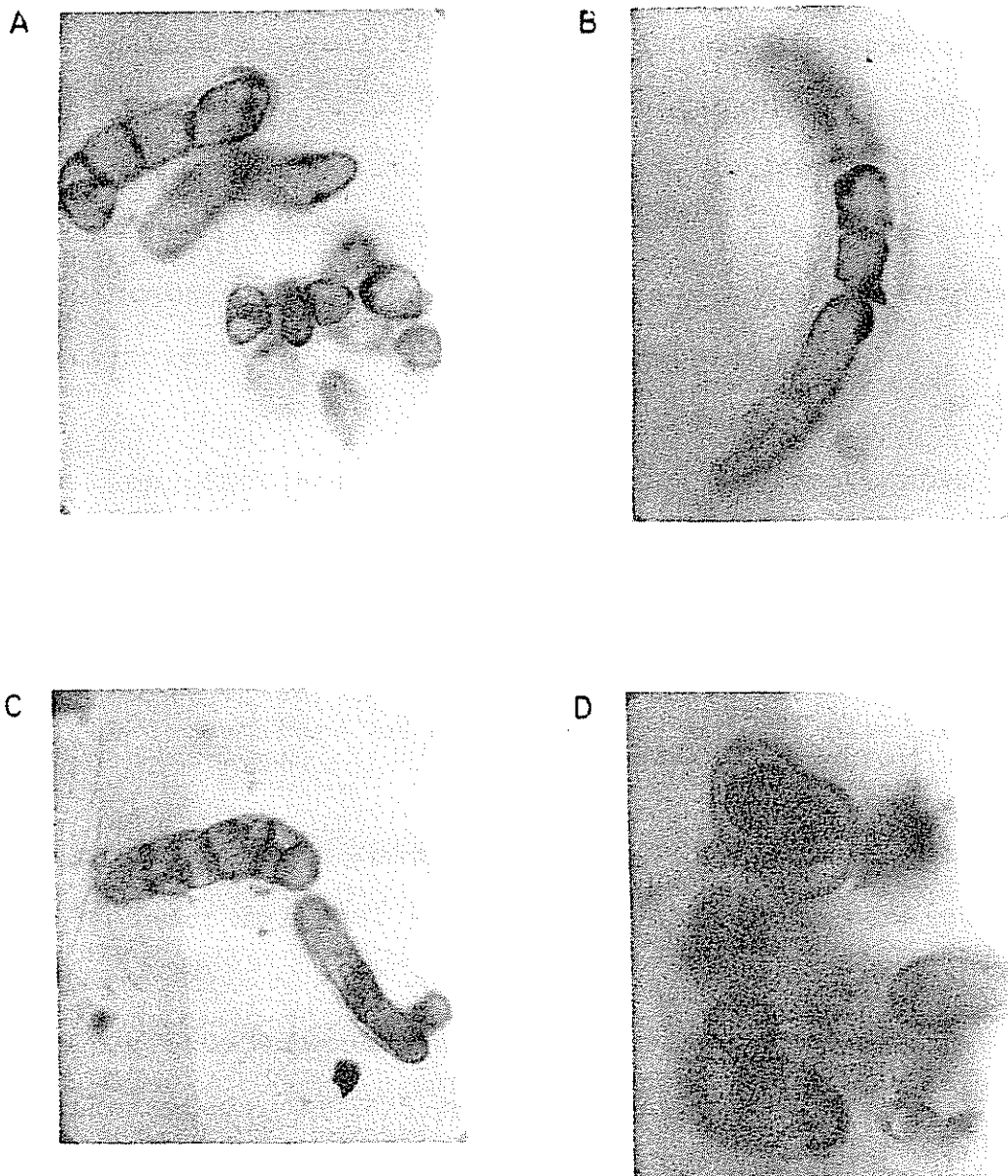


Figura 20. Proembriones obtenidos en suspensiones celulares con: A, $0,5 \text{ mg.l}^{-1}$ de ZEA + $2,0 \text{ mg.l}^{-1}$ de ABA. B, $1,0 \text{ mg.l}^{-1}$ de ZEA + $2,0 \text{ mg.l}^{-1}$ de ABA. C, $1,0 \text{ mg.l}^{-1}$ de CIN. D, $1,75 \text{ mg.l}^{-1}$ de CIN.

7. CONCLUSIONES.

El trabajo se realizó en la Unidad de Biotecnología del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE), Turrialba, Costa Rica, entre Noviembre de 1990 y Octubre de 1991. Bajo las condiciones en que se realizó el presente trabajo y con base en los resultados obtenidos, se pueden formular las siguientes conclusiones:

- 7.1. De los factores estudiados los más importantes en la formación de callos al cultivar anteras son: genotipo, estado de desarrollo de la microspora, condiciones de luz al incubar las anteras, pH del medio de cultivo, nivel de sacarosa en el medio de cultivo, niveles de ANA y CIN.
- 7.2. Las respuestas más altas en la formación de callos (alrededor del 82%) al cultivar anteras se consiguen con el genotipo SPA-9, con microsporas en estado meiótico uninucleado, incubadas en obscuridad, con un medio MS suplementado con $2,5 \text{ mg.l}^{-1}$ de ANA, $0,2 \text{ mg.l}^{-1}$ de CIN, $46,7 \text{ g.l}^{-1}$ de sacarosa y pH ajustado a 5,9.
- 7.3. El genotipo Catongo alcanza su mayor respuesta de formación de callos (alrededor del 54%) con microsporas en estado meiótico de tetrada, incubadas en obscuridad, con un medio de cultivo MS suplementado con $0,5 \text{ mg.l}^{-1}$ de ANA, $0,2 \text{ mg.l}^{-1}$ de CIN, $45,2 \text{ g.l}^{-1}$ de sacarosa y pH

ajustado a 6,6. Existen posibilidades de éxito al extrapolar los resultados hacia otros genotipos.

- 7.4. El almacenamiento de los medios de cultivo a $21^{\circ}\text{C} \pm 2$ y con luz, no disminuyó la capacidad de formación de callos, aunque se hayan almacenado hasta por 22 días previo a ser sembrados.
- 7.5. El origen de la formación de los callos parece ser la pared de la antera. No fue posible establecer la haploidía de los callos, ni de las raíces formadas a partir de éstos. Hace falta más investigación en éstos aspectos.
- 7.6. La regeneración de raíces a partir de callos se logra hasta en un 6% sin necesidad de adicionar reguladores de crecimiento.
- 7.7. Se logró establecer suspensiones celulares a partir de callos y en ellas formar proembriones mediante la aplicación de $0,5 \text{ mg.l}^{-1}$ de ZEA + $2,0 \text{ mg.l}^{-1}$ de ABA, $1,0 \text{ mg.l}^{-1}$ de ZEA + $2,0 \text{ mg.l}^{-1}$ de ABA, $1,00 \text{ mg.l}^{-1}$ de CIN ó $1,75 \text{ mg.l}^{-1}$ de CIN.

8. RECOMENDACIONES.

Según las respuestas observadas en el comportamiento de anteras de cacao en el cultivo *in vitro*, se hacen las siguientes recomendaciones:

- 8.1. Probar niveles entre 0,1 y 0,5 mg.l⁻¹ de ANA, combinados con niveles entre 0,1 y 10,0 mg.l⁻¹ de CIN, y observar los callos por lo menos tres meses, transfiriéndolos a un medio fresco cada mes. Esto para tratar de inducir embriogénesis directa o indirecta.
- 8.2. Hacer suspensiones celulares de callos con los tratamientos que produjeron proembriones y observarlos por 2-3 meses, haciendo transferencias a medio sólido con niveles entre 0,3 y 10,0 mg.l⁻¹ de CIN, con el objetivo de desarrollar embriones.
- 8.3. Hacer un estudio más profundo y detallado sobre el origen de los callos, incluyendo varios genotipos, varios estados de desarrollo de las microsporas y varios tratamientos que producen callos, para determinar su uso futuro más adecuado.
- 8.4. Tratar de cultivar polen aislado de cacao, con el objetivo de evitar dudas sobre el origen de los callos, embriones o plántulas que se produzcan.

9. BIBLIOGRAFIA.

- ADU-AMPOMAH, Y.; NOVAK, F.; VAN DURREN, M. 1987. Embroid and Plant Production from Cultured Cocoa Explants. In International Cocoa Research Conference (1987, Santo Domingo, R.D.). Proceedings, pp. 129-136.
- AGUILAR VEGA, M.E. 1990. Obtención de plantas de Cacao (*Theobroma cacao* L.) a partir del microinjerto de embriones somáticos. Tesis Mag.Sc., CATIE, Turrialba, Costa Rica. 131 p.
- AMMIRATO, P.V. et al. 1984. Handbook of Plant Cell Culture. v.3. Eds. P.V. Ammirato, D.A. Evans, W.R. Sharp y Y. Yamada. 620 p.
- ANAGNOSTAKIS, S.L. 1974. Haploids plants from anther of Tobacco enhancement with charcoal. *Planta* 115:281-283.
- ANONYMOUS. 1989. CIRAD. Laboratoire de Cytogenetique et D'histologie Vegetale. Manuel Pratique D'histologie Vegetale. Montpellier, Francia. 61 p.
- ASCANIO, C.E. 1987. Inducción de plantas haploides a partir del cultivo *in vitro* de anteras de cafeto (*Coffea arabica* L. "Garnica". Tesis Ph.D., Facultad de Agronomía, Universidad Central de Venezuela. 89 p.
- . 1988. Formación de plantas haploides a partir del cultivo *in vitro* de anteras. In Cultivo de tejidos vegetales aplicado a la formación agrícola. Leopoldo Villegas Ed., Edit. Signo Contemporáneo, Caracas, Venezuela. pp. 117-142.
- BAJAJ, Y.P.S. 1974. Induction of repeated cell division in isolated pollen mother cells of *Atropa belladonna*. *Plant. Sc. Lett.* 3:309-312.
- . 1975. Protoplast culture and production of haploids. In From structure and function in plants. Santa Prakashan Press. Meerot, India. pp.107-113.
- . 1977. *In vitro* induction of haploids in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Crop. Improv.* 4:56-64.
- . 1978. Regeneration of haploid tobacco plants from isolated pollen grown in drop culture. *Indian J. Esp. Biol.* 16:407-409.
- . BAJAJ, Y.P.S. 1984. *In vitro* production of haploids. In Handbook of plant cell culture. pp. 228-287.

- BOURGIN, J.P.; NITSCH, J.P. 1967. Obtention de *Nicotiana* haploides a partir d'etamines cultivees *in vitro*. *Ann. Physiol.* 9:377-382.
- BUTLER, E.E.; BOLKAN, H. 1973. A medium for heterokaryon formation in *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology* 63:542-543.
- CHU, C.C. 1982. Haploids in Plant Improvement. In *Plant Improvement and Somatic Cell Genetics*. eds. I.K. Vasil, W.R. Scovcroft, K.J. Frey, Academic Press. pp. 129-158.
- CLAPHAN, D. 1971. *In vitro* development of callus from the pollen of *Lolium* and *Hordeum*. *Z. Pflanzenzuehp* 65:285-292.
- CONOVER, W.J.; IMAN, R.L. 1981. Rank Transformations as a Bridge Between Parametric and Nonparametric Statistics. *American Statistician* 3(3):124-133.
- DE BERGH, P.; NITSCH, C. 1973. Premiers resultans sur la culture *in vitro* de grains de pollen isoles chez la tomate. *C.R. Acad. Sci. Ser. D.* 276:1281-1284.
- DE MOL, W.E. 1923. Duplication of generative nuclei by means of physiological stimuli and its significance. *Genetic* 5:225-227.
- DE VAULX, D.R.; CHAMBONNET, D.; SIBI, M. 1981. Stimulation of *in vitro* androgenesis in Pepper (*Capsicum annuum*) by elevated temperature treatment. In *Plants regenerated from tissue culture*. pp. 92.
- DUBLIN, P. 1974. The Haploids of *Theobroma cacao* L.: Their Possible Utilization for Improving and Studying the Genetics of the Cacao Tree. In *Haploids in Higher Plants: Advances and Potential*. Ed. Ken J. Kasha, University of Guelph. pp. 275-276.
- . 1978. Diploidized haploids and production of fertile homozygous genotypes in cultivated cocoa trees (*Theobroma cacao* L.). *Café Cacao Thé* 22:275-289.
- . 1984. Extractable Products: Cacao. In *Handbook of Plant Cell Culture*. V.3. P.V. Ammirato, D.A. Evans, W.R. Sharp y Y. Yamada, eds., Macmillan. EE.UU. pp. 541-563.
- DUNWELL, J.M. 1978. In *Frontiers of plant tissue culture*. T.A. Thorpe, Ed. pp. 103-112.
- ENRIQUEZ, G.A. 1985. Curso sobre el cultivo del cacao. CATIE, Turrialba, Costa Rica. 240 p.

- ESAN, E.B. 1981. *In Vitro* Studies on Morphogenesis and Plant Regeneration in tissue Cultures of Cacao and *Herrania* species: A Progres Report. *In* International Cocoa Research Conference, (1981, Cartagena, Colombia). Proceedings. pp. 245-252.
- FALCONER, D.S. 1984. *Introducción a la Genética Cuantitativa*. Fidel Márquez trad., CECSA, México. 430 p.
- FEBRES RODRIGUEZ, V.J. 1990. Caracterización de clones de cacao (*Theobroma cacao* L.) resistentes y susceptibles a la moniliasis (*Moniliophthora roreri* (Cif & Par) Evans et al) mediante marcadores RFLP. Tesis Mag.Sc., CATIE, Turrialba, Costa Rica. 88 p.
- FRIDBORG, G.; ERICKSSON, T. 1975. Effect of active charcoal on growth an morphogenesis in cell cultures. *Physiol. Plant.* 34:306-308.
- GAMBORG, O.L.; MURASHIGUE, T.; THORPE, T.A.; VASIL, I.K. 1976. Plant tissue culture media. *In Vitro* 12(7):473-478.
- GEITLER, L. 1961. Embryo sacke aus pollenkornern bei *ornithocalum*. *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* 59:419-423.
- GLICENSTEIN, L.J.; FRITZ, P.J. 1989. Meiosis in *Theobroma cacao* L. *Turrialba* 39 (4):497-500.
- .; FRITZ, P.J. 1989. Ploidy Level in *Theobroma cacao* L. *Heredity* 80:464-467.
- GRESSHOFF, P.M.; DOY, C.H. 1972. Development and differentiation of haploid *Lycopersicon esculentum* (Tomato). *Planta* 107:161-170.
- GUHA, S.; MAHESWARI, S.C. 1966. Cell division and differentiation of embryoids in the pollen grains of *Datura in vitro*. *Nature* 212:97-98.
- HAALAND, P.D. 1989. *Experimental Design in Biotechnology*. D.B. Owen ed., Marcel Dekker Inc., EE.UU, v.105. 259 p.
- HEPLER, P.K.; PALEVITZ, B.A. 1974. Microtubules and microfilament. *Ann. Rev. Plant. Physiol.* 25:309-362'
- IZHAR, S. 1973. Cell budding and fusion in microspores of *Petunia*. *Nature* 244:35-37.
- JOHANSSON, L.; ERIKSSON, T. 1977. Induced embryo formation in anther culture of several *Anemone* species. *Physiol. Plant.* 40:172-174.
- KELLER, W.A.; ARMSTRONG, K.A.; DE LA ROCHE, I.A. 1981. The production and utilization of microspore-derived haploids

in cruciferous crop species. Proceedings International Symposium Plant Cell Culture in Crop Improvement. Calcuta, India.

- .; RAJPATHY, T.; LACADRE, J. 1975. *In vitro* production of plants from pollen in *Brassica campestris*. Can. J. Genet. Cytol. 17:665-666.
- KOHLLENBACH, A.W.; WERNICKE, W.; LONG, H. 1978. *In* Production of natural compound by cell culture methods. A.W. Alfermann y E. Reinhard Eds. pp. 284-294.
- LAKSHMANA, P.V.; DEEPESH, N. 1987. Haploid plants from *in vitro* anther culture of the leguminous tree *Peltophorum pterocarpum* (DC) K. Hayne (Copper pod). Plant Cell, Tissue and Organ Culture 11:167-177.
- LANAUD, C. 1988. Origin of haploids and semigamy in *Theobroma cacao* L. Euphytica 38:221-228.
- LEON, J. 1987. Botánica de los Cultivos Tropicales. IICA, San José, Costa Rica. pp. 337-342.
- LEVAN, A. 1945. A haploids sugar beet after colchicine treatment. Hereditas 31:399-410.
- LOPEZ, O. 1985. Mejoramiento Genético del Cacao. *In* Manual sobre el cultivo de CACAO (*Theobroma cacao* L.), SARH, Tapachula, Chiapas, México. pp. 79-91.
- LOWER, R.L.; MILLER, C.H. 1969. Ethrel (2-Chloroethanephostonicacid) a tool for plant hybridizers. Nature 2:1072-1107.
- MARROQUIN TORNOE, C.G. 1991. Suspensiones celulares y embriogénesis somática en *Musa acuminata* ssp. *malaccensis*. Tesis Mag.Sc., CATIE, Turrialba, Costa Rica. 114 p.
- MCDONALD, I.M.; GRANT, W.F. 1974. Anther culture of pollen containing ethrel induced micronuclei. Z. Pflanzenzuech 77:292-297.
- MORERA, J.A.; MORA, A. 1990. Banco de Germoplasma de Cacao del CATIE. CATIE, Turrialba, Costa Rica. 15 p.
- MUENTZING, A. 1937. Note on a haploid rye plant. Hereditas 23:401.
- MURASHIGUE, T.; SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15:473-497.

- NAITHANI, S.P. 1937. Chromosome studies in *Hyacinthus orientalis* L. III. Reversal of sexual state in the anther of *H. orientalis* L. Var. Yellow Hammer. *Ann. Bot.* 1:369-377.
- NITSCH, C. 1974. La culture de pollen insolé sur miliey synthétique. *CR. Acad. Sc. Paris* 278. Serie D-1031.
- . 1974. Pollen culture: A new technique for mass production of haploids and homocygous line. *In* Haploids in higher plants, advances and potentials. University of Guelph. Guelph, Canada. pp. 123-135.
- . 1981. Production of Isogenic Lines: Basic Technical Aspects of Androgenesis. *In* Plant Tissue Culture: Methods and Applications in Agriculture. Ed. Trevor A. Thorpe, Academic Press. pp. 241-252.
- .; NORREL, B. 1972. Factors favoring the formation of androgenetic embryos in anther culture. *In* Genes, enzymes and populations. Vol. 2. Asrb. Ed. pp. 129-144.
- .; NORREL, B. 1973. Effect d'un choc termique sur le pouvoir embryogéne du pollen de *Datura innoxia* cultivate dans l'anthere. *CR. Acad. Sc. Paris* 276. Serie D-303-306.
- .; NITSCH, C. 1969. Haploids plants from pollen grains. *Science* 63:85-87.
- NOERDENSKIOLD, H. 1939. Studies of a haploid rye plant. *Hereditas* 28:204-210.
- PALMA, T.; VILLALOBOS, V.M. 1989. Rescate *in vitro* de Embriones Provenientes de Semillas Aplanadas de Cacao (*Theobroma cacao*). *Turrialba* 39:525-529.
- PARMENTIER, G. 1970. L'incorporation de carbon actif aux milieux de culture de *Phytophthora infestans*. *Parasitica* 23:31-40.
- POVOLOCHKO, P.A. 1937. Experimental production of haploid plants in the genus *Nicotiana*. *Bull. Appl. Bot. Genet. Plant. Breed. Ser.* 7:175-190.
- POWELL, W.; UHRIG, H. 1987. Anther culture of *Solanum* genotypes. *Plant Cell, Tissue and Organ culture* 11:13-24.
- PROSKAVER, J.; BERMAN, R. 1970. Agar culture modified to approximate soil conditions. *Nature* 227:1161.
- RAM, M. 1959. Ocurrence of embryo sac-live structures in the microsporangia of *Leptometria billardierni* R. *Bi. Nature* 184:914.

- REINERT, J.; BAJAJ, Y.P.S. 1977. Anther culture: Haploid production and its significance. In Applied and Fundamental Aspects of Plant, Tissue, and Organ Culture. Eds. J. Reinert y Y.P.S. Bajaj. Springer-Verlag, Berlín.
- SANGWAN, B. 1977. Androgenic stimulating factors in the anther isolated pollen grain culture of *Datura innoxia* Mill. J. Exp. Bot. 28:
- SAS. 1985. SAS User's Guide: Statistics. Versión 5. SAS Institute Inc., Cary, North Caroline, EE.UU. 956 p.
- SAX, K. 1935. The effect of temperature on nuclear differentiation in microspores development. J. Arbor. 19:301-310.
- SMITH, H.H. 1943. Studies on induced heteroploids of *Nicotiana*. Am. J. Bot. 30:121-130.
- SOPORY, S.K.; JACOBSEN, E.; WENZEL, G. 1978. Production of monoploid embryoids and plantlets in culture anther of *Solanum tuberosum*. Plant. Sc. Lett. 12:47-54.
- STEEL, R.G.D.; TORRIE, J.H. 1985. Bioestadística: Principios y Procedimientos. 2a.ed. (1a. en español). McGraw Hill. pp.329-363.
- STOW, I. 1930. Experimental studies on the formation of embryo sac like giant pollen grain in the anther of *Hyacinthus orientalis*. Cytology 1:417-439.
- SUNDERLAND, N. 1974. Anther Culture as a Means of Haploid Induction. In Haploids in Higher Plants: Advances and Potential. Ed. Ken J. Kasha, University of Guelph. pp. 91-122.
- . 1979. Anther and pollen culture. In The plant genome. D.R. Davis and D.A.Hopwood Eds., England. pp. 171-183.
- .; DUNWELL, J.M. 1977. Anther and pollen culture. In Plant tissue and cell culture, H.E. Street. Second edition, California, pp. 223-265.
- TULEKE, N. 1953. A tissue derived from the pollen of *Ginkgo biloba*. Science 1977:599-600.
- VALVERDE CERDAS, M.L. 1989. Efecto del pH, la luz, la condición del medio y la concentración de sacarosa en la embriogénesis somática de cacao (*Theobroma cacao* L.) in vitro. Tesis Ing.Agr., Turrialba, Costa Rica, Universidad de Costa Rica. 102 p.

- VASIL, K.I. 1973. In Methods and applications of tissue culture. P.F. Kruse, Jr. y M.K. Patterson Eds., Academic Press, New York. pp. 157-161.
- . 1980. Androgenetic Haploids. In International Review of Cytology. Supplement 11a. Academic Press. pp. 195-223.
- WANG, C.C.; SUN, C.S.; CHU, C.C. 1974. On the condition for the induction of rice pollen plantlets and certain factors affecting the frequency of induction. Acta Bot. Sinica 16:43-53.
- WEATHERHEAD, M.A.; BURDON, J.; GENSHAW, G.C. 1978. Some effects of activated charcoal as an additive to plant tissue culture media. S. Pflanzenphysiol. 89:141-147.
- WENZEL, G. 1979. Recent progress in microspore culture of crop plant. In The plant genome. D.R. Davis y D.A. Hopwood Eds., England. pp. 185-198.
- WHITE, P.R. 1963. The cultivation of animal and plant cells. Ronald Pres. New York.
- YASUDA, S. 1940. A preliminary note on the artificial parthenogenesis induced by application of promoting substances. Bot. Mag. 54:506-510.

10. APENDICE.

Cuadro 1A. Análisis de varianza de la superficie de respuesta para la variable formación de callo, y sus respectivas constantes (β), através de dos genotipos, dos estados meióticos y dos condiciones de luz. Experimento genotipo x meiosis x luz x ANA x CIN.

REGRESION	GL	SC	R ²
Líneal	2	133465**	0,2464
Cuadrática	2	38586**	0,0741
Productos Cruzados	1	16695**	0,0321
TOTAL	5	188746**	0,3626

RESIDUAL	GL	CM
Falta de Ajuste	90	525,9**
Error Puro	776	366,6
Error TOTAL	866	383,2

PARAMETRO	GL	$\beta \pm \sigma_{\beta}$
INTERCEPTO	1	-7,196** \pm 1,945
ANA	1	31,934** \pm 4,401
CIN	1	249,058** \pm 31,215
ANA X ANA	1	-19,262** \pm 2,652
CIN X ANA	1	96,935** \pm 14,685
CIN X CIN	1	-987,075** \pm 140,363

$$\bar{X} = 15,69$$

$$R^2 = 0,3626$$

$$CV = 124,78 \%$$

** (P<.01)

Cuadro 2A. Análisis de varianza de la superficie de respuesta para la variable formación de callo, y sus respectivas constantes (β), del genotipo Catongo, en estado de tetrada, incubado en luz. Experimento genotipo x meiosis x luz x ANA x CIN.

REGRESION	GL	SC	R ²
Lineal	2	16441**	0,2305
Cuadrática	2	9115**	0,1278
Productos Cruzados	1	1000	0,0140
TOTAL	5	26556**	0,3723

RESIDUAL	GL	CM
Falta de Ajuste	6	1015*
Error Puro	97	399
Error TOTAL	103	435

PARAMETRO	GL	$\beta \pm \sigma_{\beta}$
INTERCEPTO	1	-10,878* \pm 5,816
ANA	1	47,498** \pm 13,261
CIN	1	320,571** \pm 93,743
ANA X ANA	1	-28,712** \pm 8,019
CIN X ANA	1	69,209 \pm 45,625
CIN X CIN	1	-1220,280** \pm 422,376

$$\bar{X} = 16,33$$

$$R^2 = 0,3723$$

$$CV = 127,68 \%$$

*(P<.05)

** (P<.01)

Cuadro 3A. Análisis de varianza de la superficie de respuesta para la variable formación de callo, y sus respectivas constantes (β), del genotipo Catongo, en estado de tetrada, incubado en obscuridad. Experimento genotipo x meiosis x luz x ANA x CIN.

REGRESION	GL	SC	R ²
Lineal	2	23181**	0,3392
Cuadrática	2	4414**	0,0646
Productos Cruzados	1	4184	0,0612
TOTAL	5	31780**	0,4650

RESIDUAL	GL	CM
Falta de Ajuste	6	396
Error Puro	93	368
Error TOTAL	99	369

PARAMETRO	GL	B \pm σ_B	
INTERCEPTO	1	-6,171	\pm 5,432
ANA	1	33,254**	\pm 12,577
CIN	1	183,354*	\pm 88,991
ANA X ANA	1	-21,611**	\pm 7,517
CIN X ANA	1	138,029	\pm 41,007
CIN X CIN	1	-672,510**	\pm 404,250

$$\bar{X} = 17,14$$

$$R^2 = 0,4650$$

$$CV = 112,10 \%$$

*(P<.05)

** (P<.01)

Cuadro 4A. Análisis de varianza de la superficie de respuesta para la variable formación de callo, y sus respectivas constantes (β), del genotipo Catongo, en estado uninucleado, incubado en luz. Experimento genotipo x meiosis x luz x ANA x CIN.

REGRESION	GL	SC	R ²
Lineal	2	12249**	0,2927
Cuadrática	2	1542	0,0369
Productos Cruzados	1	2287**	0,0547
TOTAL	5	16079**	0,3842

RESIDUAL	GL	CM
Falta de Ajuste	6	117
Error Puro	87	288
Error TOTAL	93	277

PARAMETRO	GL	B \pm σ_B	
INTERCEPTO	1	-4,342	\pm 4,914
ANA	1	17,947	\pm 11,083
CIN	1	163,452*	\pm 78,499
ANA X ANA	1	-10,455	\pm 6,720
CIN X ANA	1	108,639**	\pm 37,814
CIN X CIN	1	-748,337**	\pm 353,946

$$\bar{X} = 12,93$$

$$R^2 = 0,3842$$

$$CV = 128,75 \%$$

*(P<.05)

** (P<.01)

Cuadro 5A. Análisis de varianza de la superficie de respuesta para la variable formación de callo, y sus respectivas constantes (β), del genotipo Catongo, en estado uninucleado, incubado en oscuridad. Experimento genotipo x meiosis x luz x ANA x CIN.

REGRESION	GL	SC	R ²
Líneal	2	15992**	0,3116
Cuadrática	2	4150**	0,0809
Productos Cruzados	1	1433*	0,0279
TOTAL	5	21575**	0,4203

RESIDUAL	GL	CM
Falta de Ajuste	6	664*
Error Puro	101	255
Error TOTAL	107	278

PARAMETRO	GL	$\beta \pm \sigma_{\beta}$
INTERCEPTO	1	-6,525 \pm 4,614
ANA	1	26,244* \pm 10,382
CIN	1	274,360** \pm 73,239
ANA X ANA	1	-15,316* \pm 6,288
CIN X ANA	1	79,730* \pm 35,121
CIN X CIN	1	-1043,719** \pm 330,100

\bar{X} = 15,93
 R^2 = 0,4203
 CV = 104,68 %
 *(P<.05)
 **(P<.01)

Cuadro 6A. Análisis de varianza de la superficie de respuesta para la variable formación de callo, y sus respectivas constantes (β), del genotipo SPA-9, en estado de tetrada, incubado en luz. Experimento genotipo x meiosis x luz x ANA x CIN.

REGRESION	GL	SC	R ²
Lineal	2	11030**	0,2329
Cuadrática	2	1189	0,0251
Productos Cruzados	1	1583*	0,0334
TOTAL	5	13802**	0,2914

RESIDUAL	GL	CM
Falta de Ajuste	6	379
Error Puro	97	323
Error TOTAL	103	326

PARAMETRO	GL	$B \pm \sigma_B$	
INTERCEPTO	1	-4,148	$\pm 5,096$
ANA	1	17,481	$\pm 11,490$
CIN	1	126,189	$\pm 81,669$
ANA X ANA	1	-10,178	$\pm 6,919$
CIN X ANA	1	83,884*	$\pm 38,061$
CIN X CIN	1	-451,856	$\pm 365,258$

$$\bar{X} = 11,74$$

$$R^2 = 0,2914$$

$$CV = 153,73 \%$$

*(P<.05)

** (P<.01)

Cuadro 7A. Análisis de varianza de la superficie de respuesta para la variable formación de callo, y sus respectivas constantes (β), del genotipo SPA-9, en estado de tetrada, incubado en obscuridad. Experimento genotipo x meiosis x luz x ANA x CIN.

REGRESION	GL	SC	R ²
Lineal	2	10251**	0,1511
Cuadrática	2	8016**	0,1182
Productos Cruzados	1	1661	0,0245
TOTAL	5	19929**	0,2938

RESIDUAL	GL	CM
Falta de Ajuste	6	671
Error Puro	99	443
Error TOTAL	105	456

PARAMETRO	GL	$\beta \pm \sigma_{\beta}$
INTERCEPTO	1	-6,645 \pm 5,969
ANA	1	29,846* \pm 13,491
CIN	1	318,793** \pm 95,921
ANA X ANA	1	-17,919** \pm 8,123
CIN X ANA	1	85,179 \pm 44,640
CIN X CIN	1	-1442,681** \pm 427,889

\bar{X} = 13,87
 R^2 = 0,2938
 CV = 153,96 %
 *(P<.05)
 **(P<.01)

Cuadro 8A. Análisis de varianza de la superficie de respuesta para la variable formación de callo, y sus respectivas constantes (β), del genotipo SPA-9, en estado uninucleado, incubado en luz. Experimento genotipo x meiosis x luz x ANA x CIN.

REGRESION	GL	SC	R ²
Lineal	2	17762**	0,2478
Cuadrática	2	7745**	0,1081
Productos Cruzados	1	1046	0,0146
TOTAL	5	26553**	0,3705

RESIDUAL	GL	CM
Falta de Ajuste	6	1087*
Error Puro	103	375
Error TOTAL	109	414

PARAMETRO	GL	$\beta \pm \sigma_{\beta}$
INTERCEPTO	1	-10,728 \pm 5,621
ANA	1	39,234** \pm 12,618
CIN	1	335,784** \pm 89,342
ANA X ANA	1	-21,480** \pm 7,592
CIN X ANA	1	67,126 \pm 42,221
CIN X CIN	1	-1326,104** \pm 400,933

$$\bar{x} = 16,87$$

$$R^2 = 0,3705$$

$$CV = 120,60 \%$$

*(P<.05)

** (P<.01)

Cuadro 9A. Análisis de varianza de la superficie de respuesta para la variable formación de callo, y sus respectivas constantes (β), del genotipo SPA-9, en estado uninucleado, incubado en oscuridad. Experimento genotipo x meiosis x luz x ANA x CIN.

REGRESION	GL	SC	R ²
Lineal	2	32622**	0,3427
Cuadrática	2	7222**	0,0759
Productos Cruzados	1	4485**	0,0471
TOTAL	5	44329**	0,4657

RESIDUAL	GL	CM
Falta de Ajuste	6	639
Error Puro	99	475
Error TOTAL	105	484

PARAMETRO	GL	B \pm σ_B	
INTERCEPTO	1	-8,719	\pm 6,145
ANA	1	43,691**	\pm 13,859
CIN	1	260,199**	\pm 99,193
ANA X ANA	1	-27,556**	\pm 8,362
CIN X ANA	1	137,721**	\pm 45,259
CIN X CIN	1	-934,502*	\pm 446,737

$$\bar{X} = 20,36$$

$$R^2 = 0,4657$$

$$CV = 108,09 \%$$

*(P<.05)

** (P<.01)

Cuadro 10A. Análisis de varianza de la superficie de respuesta para la variable formación de callo, y sus respectivas constantes (β), del genotipo Catongo, en estado de tetrada, incubado en obscuridad. Experimento genotipo x ANA x CIN.

REGRESION	GL	SC	R ²
Lineal	2	5893*	0,0658
Cuadrática	2	619	0,0069
Productos Cruzados	1	157	0,0018
TOTAL	5	6669*	0,0745

RESIDUAL	GL	CM
Falta de Ajuste	19	925
Error Puro	100	653
Error TOTAL	119	696

PARAMETRO	GL	$\beta \pm \sigma_{\beta}$
INTERCEPTO	1	72,160** \pm 19,064
ANA	1	-8,400 \pm 18,647
CIN	1	-63,429 \pm 46,618
ANA X ANA	1	-0,800 \pm 5,642
CIN X ANA	1	5,600 \pm 11,800
CIN X CIN	1	32,857 \pm 35,260

\bar{X} = 38,80
R² = 0,0745
CV = 68,01 %

*(P<.05)

** (P<.01)

Cuadro 11A. Análisis de varianza de la superficie de respuesta para la variable formación de callo, y sus respectivas constantes (β), del genotipo SPA-9, en estado uninucleado incubado en obscuridad. Experimento genotipo x ANA x CIN.

REGRESION	GL	SC	R ²
Lineal	2	1960	0,0375
Cuadrática	2	385	0,0074
Productos Cruzados	1	115	0,0022
TOTAL	5	2460	0,0471

RESIDUAL	GL	CM
Falta de Ajuste	19	445
Error Puro	100	413
Error TOTAL	119	418

PARAMETRO	GL	$B \pm \sigma_B$
INTERCEPTO	1	73,120** \pm 14,772
ANA	1	12,411 \pm 14,449
CIN	1	-31,429 \pm 36,122
ANA X ANA	1	-2,057 \pm 4,371
CIN X ANA	1	-4,800 \pm 9,144
CIN X CIN	1	22,857 \pm 27,322

\bar{x} = 72,96
 R^2 = 0,0471
 CV = 28,02 %
 ** (P < .01)

Cuadro 12A. Análisis de varianza de la superficie de respuesta para la variable formación de callo, y sus respectivas constantes (β), del genotipo Catongo, a través de dos estados meióticos, incubado en obscuridad. Experimento genotipo x meiosis x ANA x BA.

REGRESION	GL	SC	R ²
Lineal	2	9297**	0,2035
Cuadrática	2	6680**	0,1462
Productos Cruzados	1	3	0,0001
TOTAL	5	15980**	0,3497

RESIDUAL	GL	CM
Falta de Ajuste	18	296
Error Puro	112	218
Error TOTAL	130	229

PARAMETRO	GL	$\beta \pm \sigma_{\beta}$
INTERCEPTO	1	3,071 \pm 3,790
BA	1	-1,564 \pm 2,867
ANA	1	39,808** \pm 6,085
BA X BA	1	0,169 \pm 0,577
ANA X BA	1	-0,112 \pm 0,951
ANA X ANA	1	-14,775** \pm 2,741

\bar{x} = 15,88
 R^2 = 0,3497
 CV = 95,19 %
 ** (P < .01)

Cuadro 13A. Análisis de varianza de la superficie de respuesta para la variable formación de callo, y sus respectivas constantes (β), del genotipo SPA-9, a través de dos estados meióticos, incubado en obscuridad. Experimento genotipo x meiosis x ANA x BA.

REGRESION	GL	SC	R ²
Lineal	2	14824**	0,2071
Cuadrática	2	13884**	0,1939
Productos Cruzados	1	7	0,0001
TOTAL	5	28716**	0,4011

RESIDUAL	GL	CM
Falta de Ajuste	18	434
Error Puro	117	300
Error TOTAL	135	318

PARAMETRO	GL	B \pm σ_B	
INTERCEPTO	1	-2,504	\pm 4,332
BA	1	6,589*	\pm 3,302
ANA	1	52,564**	\pm 7,047
BA X BA	1	-1,406*	\pm 0,667
ANA X BA	1	-0,167	\pm 1,097
ANA X ANA	1	-19,885**	\pm 3,185

\bar{x} = 20,14
 R^2 = 0,4011
 CV = 88,48 %
 *(P<.05)
 **(P<.01)

Cuadro 14A. Valores máximos predichos por la superficie de respuesta según genotipo, estado meiótico de la microspora y condición de luz. Experimento genotipo x meiosis x luz x ANA x CIN.

GENOTIPO	MEIOSIS	luz	ANA	CIN	VALOR MAXIMO (%)
Promedio	promedio	promedio	1,31	0,19	37,40
Catongo	tetrada	luz	1,02	0,16	39,04
Catongo	tetrada	obscuridad	1,79	0,32	52,98
Catongo	uninucleado	luz	2,29	0,28	38,70
Catongo	uninucleado	obscuridad	1,33	0,18	35,95
SPA-9	tetrada	luz	2,32	0,36	38,56
SPA-9	tetrada	obscuridad	1,18	0,15	34,09
SPA-9	uninucleado	luz	1,16	0,16	38,14
SPA-9	uninucleado	obscuridad	1,40	0,24	53,34

Cuadro 15A. Valores máximos predichos por la superficie de respuesta según genotipo, estado meiótico de la microspora y condiciones de luz. Experimento genotipo x ANA x CIN.

GENOTIPO	MEIOSIS	luz	ANA	CIN	VALOR MAXIMO (%)
Catongo	tetrada	obscuridad	0,50	0,20	54,00
SPA-9	uninucleado	obscuridad	2,50	0,20	82,00

Cuadro 16A. Valores máximos predichos por la superficie de respuesta según genotipo y condiciones de luz. Experimento genotipo x meiosis x ANA x BA.

GENOTIPO	MEIOSIS	luz	ANA	BA	VALOR MAXIMO (%)
Catongo	Promedio	obscuridad	1,37	0,00	26,70
SPA-9	Promedio	obscuridad	1,27	2,31	39,45

Cuadro 17A. Procedimiento para infiltración de anteras con parafina.

- Primero se fijan en FAA (8:1:1 partes de etanol al 70% : formaldehído al 37% : ácido acético glacial) durante dos días.
- Se deshidratan en etanol en concentraciones ascendentes así:
 - al 50% durante una hora.
 - al 70% durante una hora.
 - al 80% durante una hora.
 - al 90% durante una hora.
 - al 95% durante una hora.
 - al 100% durante una hora.
 - al 100% durante una hora más.
- Luego se colocan en una solución 1:1 de tolueno:alcohol absoluto, durante media hora.
- Luego en tolueno puro durante una hora.
- Se cambia el tolueno y se pone nuevamente en tolueno puro durante una hora más.
- Luego se ponene en una solución 1:1 de tolueno:parafina durante media hora en una estufa a 60°C.
- Posteriormente se le dan dos baños de parafina, durante una hora cada uno, en estufa a 60°C.
- Se vierten en platos petri, previamente untados con glicerol, y se eliminan las burbujas de aire.
- Se deja enfriar la parafina y se hacen bloques rectangulares de parafina conteniendo las muestras.
- Se montan los bloques de parafina sobre bloques de madera.
- Se hacen cortes de nueve micras de grosor con un micrótomo.
- Las tiras cortadas se colocan sobre vidrios portaobjetos, previamente untadas con HAUPT (1 g agar: 2 g fenol: 15 ccù glicerina: 82 cc H₂O) y calentadas a 45°C ± 5. Se les agrega formalina al 3% para su preservación.
- Luego, se procede a una tinción cuádruple de las láminas, pasándolas por una batería de la siguiente manera:

10 minutos en xileno.
10 minutos en xileno:etanol (1:1).
5 minutos en xileno:etanol (1:1).
3 minutos en etanol al 100%
3 minutos en etanol al 95%
3 minutos en etanol al 70%.
30 minutos en safranina.
3 enjuagues en H₂O destilada.
90 segundos en violeta cristal.
2 minutos en etanol al 100%.
2 minutos en etanol al 100%.
2 minutos en orange G + verde rápido.
2 minutos en aceite de clavo + orange G.
2 minutos en aceite de clavo + orange G.
2 minutos en aceite de clavo + orange G.
3 minutos en xileno:etanol (1:1).
10 minutos en xileno.
10 minutos en xileno.

FUENTE: Anonymous, 1989.

Cuadro 18A. Formulación del medio de cultivo de Murashigue y Skoog (1962).

MACRONUTRIENTES	mM	mg.l ⁻¹
NH ₄ NO ₃	20,6	1650
KNO ₃	18,8	1900
CaCl ₂ .2H ₂ O	3,0	440
MgSO ₄ .7H ₂ O	1,5	370
KH ₂ PO ₄	1,25	170
MICRONUTRIENTES	mM	mg.l ⁻¹
KI	5	0,83
H ₃ BO ₃	100	6,3
MnSO ₄ .4H ₂ O	100	22,3
ZnSO ₄ .7H ₂ O	30	8,6
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	1,0	0,25
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,1	0,025
CoSO ₄ .6H ₂ O	0,1	0,025
Na ₂ EDTA	100	37,3
FeSO ₄ .7H ₂ O	100	27,8
VITAMINAS Y OTROS	mM	mg.l ⁻¹
Inositol	0,555	100
Acido Nicotínico	0,004	0,5
Piridoxina HCl (Vitamina B6)	0,002	0,5
Tiamina HCl (Vitamina B1)	0,0003	0,1
Glicina	1,330	2,0
Sacarosa	87,642	30000,0

FUENTE: Murashigue y Skoog (1962), Gamborg et al (1976), Amirato et al (1984).

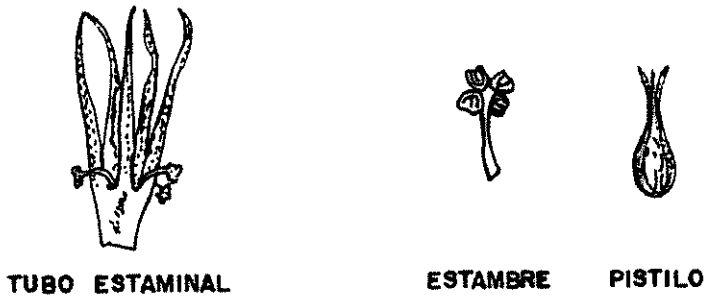
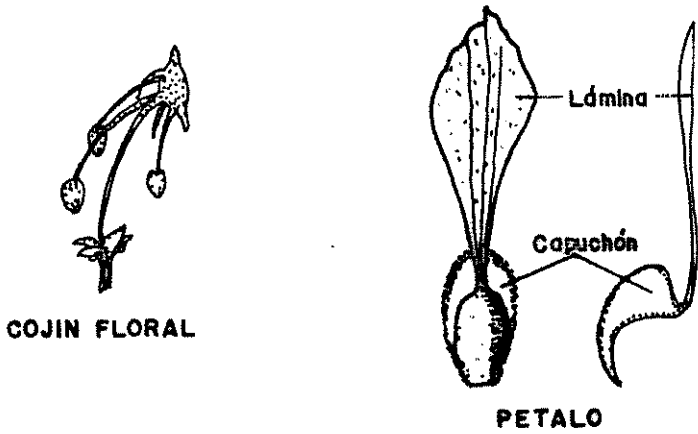
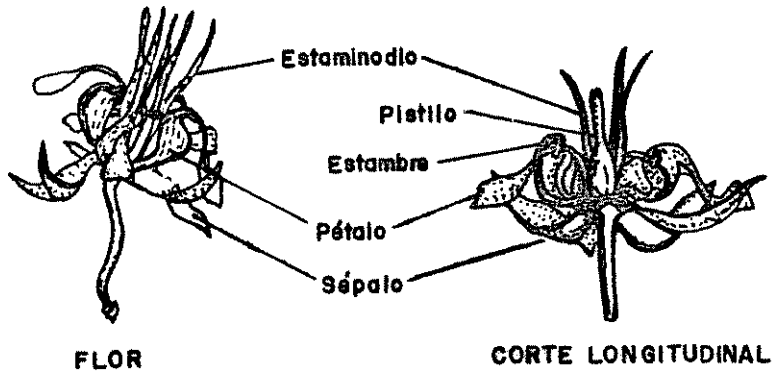


Figura 1A. Disección de una flor de cacao (León,1987).

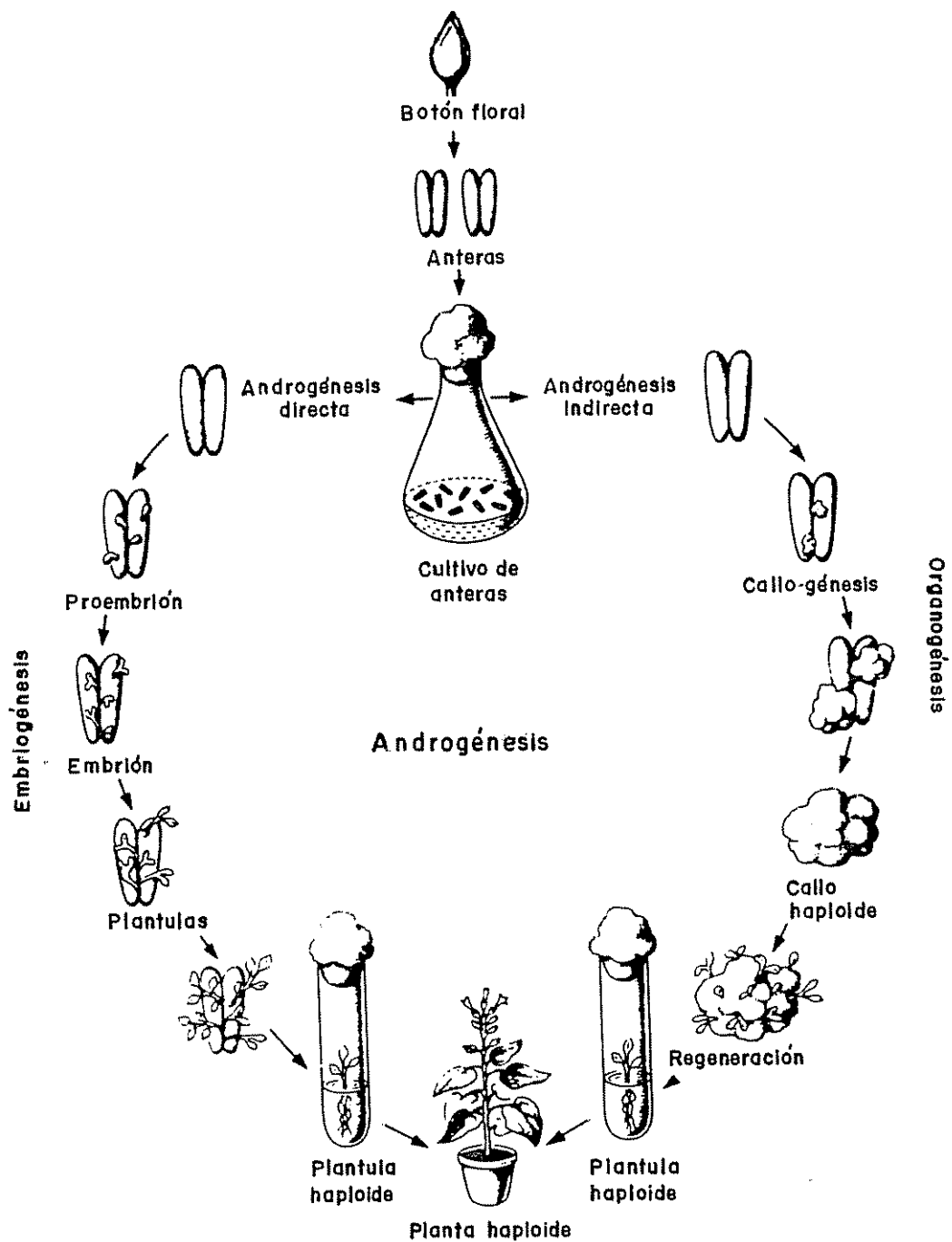


Figura 2A. Diagrama esquemática de las vías en la producción de plantas haploides.
Tomado de Reinert y Baja] (1977).

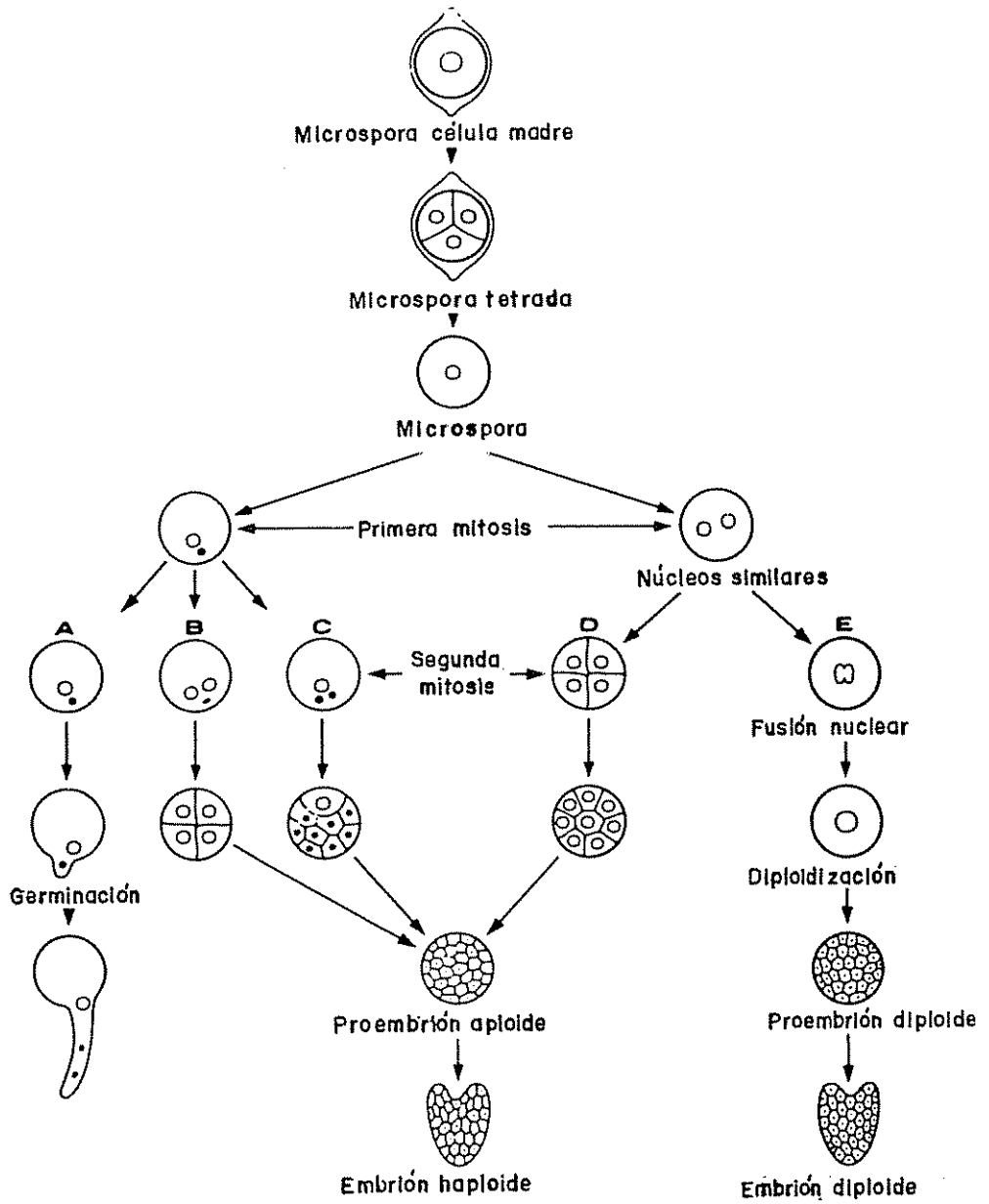


Figura 3A. Varias posibles eventos nucleares durante la androgénesis.
Tomado de Relnert y Bajaj (1977).