

**Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza
CATIE**

Programa de Educación para el Desarrollo y la Conservación
Escuela de Posgrado

Inducción de la embriogénesis somática en clones superiores de cacao (*Theobroma cacao* L.), con resistencia a enfermedades fungosas

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

Magister Scientiae

Por: Cristina Isabel Chantásig Vaca

Turrialba, Costa Rica

2004

Dedico este trabajo a mis amados padres

AGRADECIMIENTOS

Expreso mi mayor agradecimiento a mis padres, María de Lourdes Vaca Valle y José Vicente Chanatásig Quishpe, quienes me dieron la oportunidad de vivir esta experiencia y aún en la distancia fueron mi mayor apoyo, como siempre lo han sido en cada etapa de mi vida. Gracias por su amor, gracias por todo!

También agradezco de sobremanera a mi consejera, Dra. María Elena Aguilar por compartir sus conocimientos y darme su tiempo y dedicación durante estos dos años de Maestría. Gracias a su ayuda pude llegar a la meta.

Especial reconocimiento y gratitud para los miembros de mi Comité Consejero, M.Sc. Nelly Vásquez y Dr. Wilbert Phillips, porque siempre estuvieron prestos a resolver mis inquietudes y brindarme su apoyo.

Agradezco la invaluable ayuda del Ing. Gustavo López por toda su paciencia para resolver los embrollos estadísticos.

También expreso mi gratitud a todos y cada uno de los compañeros del Laboratorio de Biotecnología de la institución, y trabajadores de la finca “La Montaña” quienes compartieron conmigo sus conocimientos y experiencia, y me brindaron su apoyo de diferentes maneras.

También quiero reiterar mi sentimiento de gratitud al personal de posgrado, de la biblioteca y de todo CATIE por toda su ayuda durante estos dos años.

Dedico un agradecimiento especial a mi novio Benito Dzib Castillo por todo su amor, compañía, apoyo y por todos esos momentos de alegría que hicieron que este tiempo en Costa Rica no sea solo una oportunidad para aprender, sino también para disfrutar.

De igual manera agradezco a Sonia Ospina, mi compañera de cuarto y de aventuras y a todos mis amigos y compañeros de CATIE por todos los momentos compartidos.

Agradezco a mis queridos hermanos, José Patricio, Esteban, Marco, a mi cuñada Sandrita; a mis primas Rosi, Verito, Olga; a mis Tíos José Elías, Rosa y Soledad a mis amigos en Ecuador: Yadi, Mary, Alicia, Alexandra, Nora, Rosario, Mónica, Paty, Dr. Rodrigo Barriga, Dr. Nelson Gallo, Marcelo, Richard, Ramón y todos a quienes me dieron aliento constante para llegar a la consecución de este objetivo.

Agradezco a las familias Cifuentes-Jara, Rojas–Aguilar y Galván–Hernandez por brindarme el calor de sus hogares.

Finalmente quiero agradecer a este pequeño gran país, Costa Rica, por todo lo que me brindó en estos dos años llenos de experiencias.

INDICE

RESUMEN.....	vii
SUMMARY.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE CUADROS	xi
1. INTRODUCCION.....	1
1.1. Caraterización del problema.....	1
1.2. Justificación.....	3
1.3. Objetivos.....	5
1.3.1. General.....	5
1.3.2. Específicos	5
1.4. Hipótesis.....	5
2. REVISION DE LITERATURA.....	6
2.1. Aspectos Generales del Cultivo de Cacao.....	6
2.1.1. Origen y taxonomía.....	6
2.1.2. Botánica.....	7
2.1.3. Biología reproductiva.....	8
2.1.3.1. Morfología de la flor.....	8
2.1.3.2. Polinización.....	9
2.1.3.3. Incompatibilidad.....	9
2.1.4. Diversidad.....	9
2.1.5. Enfermedades.....	10
2.2. Mejoramiento del cultivo de cacao.....	12
2.3. Propagación.....	14
2.3.1. Propagación sexual.....	14
2.3.2. Propagación asexual <i>ex vitro</i>	15
2.3.3. Propagación asexual <i>in vitro</i>	16
2.3.3.1. Embriogénesis somática.....	18
3. MATERIALES Y METODOS.....	23
3.1. Localización del estudio.....	23
3.2. Material vegetal.....	23
3.3. Métodos.....	23
3.3.1. Identificación del material a coleccionar.....	23
3.3.2. Colecta de explantes.....	23
3.3.3. Desinfección de explantes.....	23
3.3.4. Introducción en cultivo.....	24
3.3.4.1. Disección de explantes.....	24
3.3.4.2. Inducción de callo primario.....	24
3.3.4.3. Desarrollo del callo secundario.....	24
3.3.4.4. Expresión del embrión somático.....	25
3.3.4.5. Conversión del embrión somático en planta.....	25
3.3.4.6. Embriogénesis secundaria.....	25
3.3.5. Condiciones de cultivo.....	25
3.3.6. Histología.....	26

3.4.	Análisis estadístico de los datos.....	26
3.4.1.	Fuente de carbono.....	26
3.4.2.	Fuente de citocinina.....	26
3.4.3.	Variabes de respuesta.....	27
4.	RESULTADOS Y DISCUSION.....	29
4.1.	Establecimiento de cultivos asépticos.....	29
4.2.	Inducción del callo primario.....	30
4.3.	Desarrollo del callo secundario.....	35
4.4.	Expresión de la embriogénesis somática.....	41
4.5.	Histología del callo.....	50
4.6.	Desarrollo del callo y respuesta a la embriogénesis somática	51
4.7.	Ontogénia de la embriogénesis somática.....	53
4.8.	Embriogénesis secundaria.....	55
4.9.	Clasificación morfológica de los embriones somáticos.....	57
5.	CONCLUSIONES.....	63
6.	RECOMENDACIONES.....	65
7.	LITERATURA CITADA.....	66
8.	ANEXOS.....	74
8.1.	Anexo 1: Cuadros.....	75
8.2.	Anexo 2: Formulación de medios.....	84
8.3.	Anexo 3: Formulación de soluciones stock.....	86

Chanatásig, Cl. 2004. Inducción de la embriogénesis somática en clones superiores de cacao (*Theobroma cacao L.*), con resistencia a enfermedades fungosas

Palabras clave: Embriogénesis somática, *Theobroma cacao*, PA169, SCA6, UF273, clon, explante, fuente de carbono, citocinina.

RESUMEN

El desarrollo de una metodología eficiente para la obtención a gran escala de plantas de *Theobroma cacao*, que mantengan características de alta productividad y resistencia a las enfermedades fungosas que más afectan a este cultivo, permitiría, reducir el problema de suministro de semilla vegetativa para el establecimiento y renovación de plantaciones con materiales de alta calidad. Por este motivo la presente investigación pretende contribuir a la adaptación y establecimiento de la metodología de embriogénesis somática para la propagación *in vitro* de material élite existente en el CATIE. Los objetivos que guiaron el estudio fueron el establecimiento de cultivos asépticos y con potencial morfogénico de los clones PA169, SCA6 y UF273; la inducción a la formación de callo embriogénico y de embriones somáticos de estos clones, bajo diferentes condiciones de cultivo. La investigación se basó en procedimientos ya establecidos; sin embargo se hicieron modificaciones para probar la influencia del tiempo de permanencia de los explantes en el medio de inducción PCG (Primary Callus Growth), de la fuente carbono y su concentración; así como de la fuente de citocininas, sobre la formación del callo y la inducción a la embriogénesis somática en pétalos y estaminoides de los clones en estudio. Los resultados mostraron la efectividad del procedimiento de desinfección, el cual permitió niveles de asepsia cercanos al 100% para los tres clones. La respuesta a la inducción de callo varió de acuerdo a los clones, tipo de explante y condiciones de cultivo, con estrecha dependencia de la acción conjunta de todos los factores, como lo demostró el análisis factorial. Los clones PA169 y SCA6 mostraron un mayor desarrollo del callo que UF273; sin embargo este desarrollo no estuvo relacionado con su aptitud embriogénica, ya que sólo los clones SCA6 y UF273 produjeron embriones somáticos; no así PA169 a pesar de haber tenido un buen desarrollo de callo, similar a SCA6. De 192 tratamientos, solamente 11 en UF273 y 18 en SCA6 produjeron respuesta a la embriogénesis. Se puede considerar que el mejor tratamiento para UF273 utiliza como explante el estaminoide, como fuente de carbono la sacarosa a 40 g/l y como fuente de citocinina la BAP, con una permanencia de 28 días en el medio PCG. Estas condiciones permitieron una frecuencia embriogénica del 12 % y un número promedio de embriones por explante de 6,67; lo que da la posibilidad de obtener alrededor de 80 embriones de 100 explantes. Mientras que para SCA6 en el mejor tratamiento se utiliza pétalos, glucosa a 30 g/l con un tiempo de permanencia de 14 días en medio PCG, utilizando la BAP, con el que se logró una frecuencia embriogénica de 12 % y promedio de embriones por explante de 5,75; lo cual permitiría obtener 69 embriones de 100 explantes. Con excepción de la fuente de citocinina, ningún otro factor es coincidente entre los mejores tratamientos de los dos clones, lo que destaca el papel que juega el factor genotípico y su interacción con los otros factores estudiados.

Chanatásig, CI. 2004. Induction to somatic embryogenesis in superior clones of cacao (*Theobroma cacao* L.), presenting resistance to fungal diseases

Key words: Somatic embryogenesis, *Theobroma cacao*, PA169, SCA6, UF273, clone, explant, carbon source, cytokinin.

SUMMARY

The development of an efficient method for large-scale clonal propagation of *Theobroma cacao* plants, which maintain high yield and resistance to devastating fungal diseases can solve the supply problem of clonal material, allowing the establishment and renewal of plantations with high quality materials. This research aims to contribute to the adjustment and establishment of the methodology of somatic embryogenesis for *in vitro* propagation of high quality material existing at CATIE. The objectives of this research were the establishment of aseptic cultures of the clones PA169, SCA6 and UF273 with morphogenetic potential and the induction of the formation of embryogenic calli and somatic embryos of these clones under different culture conditions. This investigation was based on already established procedures. However, modifications of the original methodology were tested in order to prove the influence of the duration of explants in Primary Callus Growth (PCG) medium, the carbon source and its concentration, in the same way that the source of cytokinins on callus formation and the induction of somatic embryogenesis in petals and staminodes of the clones under study. The disinfection procedure was highly efficient, reaching aseptic levels of close to 100% in the three clones. The response of callus induction varied according to the clone, type of explants and culture conditions. There was a strong dependency among these factors as shown by factorial analysis. Better callus development was obtained with the clones PA169 and SCA6, compared to UF273; however, callus development was not related with the embryogenic aptitude of the tissues, as only SCA6 and UF273 produced somatic embryos, but not PA169, although this clone had a good callus development, similar to SCA6. Out of 192 treatments, only 11 induced somatic embryogenesis in UF273 and 18 in SCA6, respectively. In UF273, the best response was obtained with the use of staminodes as explants, sucrose (40 g/l) as carbon source, BAP as cytokinin source, and a duration of 28 days in PCG medium. Under the aforementioned conditions, a 12 % embryogenic frequency was achieved with an average of 6.67 embryos per explant. These results allow the attainment of approximately 80 embryos from 100 explants. In SCA6, the best results were obtained with the use of petals as explants, glucose (30 g/l) as carbon source, BAP as cytokinin source and a duration of 14 days in PCG medium. This combination resulted in an embryogenic frequency of 12 % and an average of 5.75 embryos per explant, allowing the attainment of 69 embryos from 100 explants. With the exception of the cytokinin source, no other factor coincided with the best treatments of the two clones. This fact emphasizes the role of the genotype and its interaction with the other factors investigated in this study.

INDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Flor de cacao.....	8
2. Porcentaje de asepsia obtenido en pétalos y estaminoides de los clones de cacao PA169, SCA6 y UF273; al final del cultivo en el medio de inducción de callo (PCG).....	30
3. Estados de desarrollo del callo en explantes florales de cacao en el medio de inducción de callo (PCG). Las imágenes nominadas con la letra a , muestran el desarrollo de callo en pétalos, mientras que las nominadas con la letra b , muestran la formación de callo en los estaminoides.....	32
4. Tipos de callo primario. A. Explante de estaminoide con formaciones redondeadas de callo compacto y formaciones de callo cristalino; B. Estaminoide cubierto de callo cristalino fino; C. Estaminoide con callo cristalino grueso; D. Pétalo con callo cremoso semicompacto.....	35
5. Desarrollo del callo en pétalos y estaminoides. A. Muestra el mayor desarrollo del callo de estaminoides ubicado a la izquierda de la caja petri, frente a los pétalos, ubicados a la derecha. B. Tratamiento en donde el desarrollo del explante del pétalo (derecha), es mayor que el del estaminoide (izquierda).....	39
6. Tipos de callo secundario. A. Callo cristalino fino, B. Callo cristalino con formaciones turgentes, en proceso de necrosamiento, C. Callo cristalino con formaciones alargadas y ramificadas, D. Callo cristalino con formaciones alargadas y rectas.....	40
7. A. Dos callos de estaminoide en diferentes estados. Callo vivo (cv), callo en proceso de necrosamiento (cn). B. Callo de pétalo en proceso de necrosamiento de donde nace un embrión somático (es).....	42
8. Respuesta embriogénica del pétalo y estaminoide del genotipo UF273, cultivado en el medio SCG suplementado con Kinetina (A) y BAP (B). Las cruces sobre las barras señalan el promedio de embriones por explante (+=1-4, +=5-10, +=11 o más).....	45
9. Respuesta embriogénica del pétalo y estaminoide del genotipo SCA6, cultivado en el medio SCG suplementado con Kinetina (A) y BAP (B). Las cruces sobre las barras señalan el promedio de embriones por explante (+=1-4, +=5-10, +=11 o más).....	46
10. A. Corte histológico de callo mostrando posibles proembriones (pe), los cuales contienen gránulos de almidón, (25X). B. Posible célula embriogénica (ce); núcleo con nucleolo (n), un citoplasma denso (ci) y la pared celular rodeando la célula, (100X).....	51

11. Diagramas de la Correlación entre A. el Desarrollo del callo y la frecuencia embriogénica en el clon SCA6, B. Desarrollo del callo y el número de embriones por explante en el clon SCA6. Correlación entre C. Desarrollo del callo con la frecuencia embriogénica en UF273 y D. Desarrollo del callo con el número de embriones por explante en el clon SCA6.	52
12. Estados ontogénicos de la embriogénesis somática del cacao. A. Estados globular (g) y triangular (tr). B. Estados corazón (co) y globular (go). C. Estado de torpedo (to). D. Estado cotiledonar (ct).....	54
13. Estados de desarrollo durante la maduración del embrión. A. el embrión muestra una coloración antociánica. B. Embrión con cotiledones verdes.....	55
14. Callo formado a partir de embrión primario que produjo embriogénesis secundaria.....	56
15. A. Embriogénesis secundaria adventicia sobre el nudo cotiledonar del hipocótilo, B. Embriogénesis secundaria en la unión del hipocótilo con la raíz, C. Embriones secundarios en diferentes partes del hipocótilo.	57
16. Clasificación de embriones somáticos por el número de cotiledones: A. Monocotiledonar, B. Dicotiledonar, C. Multicotiledonar. Clasificación por el tamaño de los cotiledones: D. Poco desarrollados, E. Normales y F. Muy desarrollados.....	58
17. Tipos de embriones somáticos de acuerdo a su desarrollo de eje o hipocótilo. A. Embrión en estado de torpedo con un solo eje; B. Embrión en estado de maduración con un solo eje; C y D. Embriones con ejes fusionados, en estados tempranos; E. Embrión maduro con hipocótilo fusionado; F. Embrión sin eje; G Embrión con eje que comienza a enrollarse; H. Embrión maduro con hipocótilo enrollado. I. Embrión tronco.....	59
18. A. Embrión somático en germinación con mayor desarrollo de la raíz, B. Embrión con mayor desarrollo del hipocótilo.....	60
19. Recipientes conteniendo embriones en medio PEC (Primary Embryo Conversión Médium) para germinación.....	61
20. Plántula en medio RD (Root Development and Maintenance Médium) camino a la aclimatación.....	62

INDICE DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Características importantes de los clones estudiados. R= resistente, S= susceptible, MR= medianamente resistente. MS= moderadamente susceptible.....	23
2. Comparación de las medias del Índice de formación de callo (IC) de los tres genotipos estudiados en cada uno de los tratamientos realizados. Las medias fueron obtenidas al final del cultivo de los explantes en el medio PCG (Primary Callus Grow). Se utilizó la prueba de Tukey con un $\alpha=0.05$	33
3. Comparación de las medias de Índice de formación de callo (IC) de los tres genotipos estudiados en tratamientos donde se prueba la interacción de los factores probados en el primer medio (PCG) con la fuente de citocinina adicionada al segundo medio (SCG); después de que los explantes fueron cultivados 14 días el medio PCG (Primary Callus Grow). Se utilizó la prueba de Tukey con un $\alpha=0.05$	37
4. Comparación de las medias del Índice de formación de callo (IC) de los tres genotipos estudiados en tratamientos donde se prueba la interacción de los factores probados en el primer medio (PCG) con la fuente de citocinina adicionada al segundo medio (SCG); después de que los explantes fueron cultivados 28 días el medio PCG (Primary Callus Grow). Se utilizó la prueba de Tukey con un $\alpha=0.05$	38
5. Mejores resultados de Frecuencia embriogénica y Número promedio de embriones por explante.....	49

INDICE DE CUADROS DEL ANEXO

Cuadro	Página
1. Análisis de varianza para la inducción de callo a los 14 días de cultivo en medio PCG, donde es posible observar el nivel de interacción de los factores en estudio: Genotipo (Gen), explante (Exp), fuente de carbono (Car) y su concentración (Con).....	75
2. Análisis de varianza para la inducción de callo a los 28 días de cultivo en medio PCG, donde es posible observar el nivel de interacción de los factores en estudio: Genotipo (Gen), explante (Exp), fuente de carbono (Car) y su concentración (Con).....	75
3. Análisis de varianza para la inducción de callo en el medio SCG, después del cultivo durante 14 días en medio PCG. En el cuadro es posible observar el nivel de interacción de los factores en estudio: Genotipo (Gen), explante (Exp), fuente de carbono (Car) y su concentración (Con), más la fuente de citocinina (Cit).....	76
4. Análisis de varianza para inducción de callo en el medio SCG, después del cultivo durante 28 días en medio PCG. En el cuadro es posible observar el nivel de interacción de los factores en estudio: Genotipo (Gen), explante (Exp), fuente de carbono (Car) y su concentración (Con), más la fuente de citocinina (Cit).....	77
5. Análisis de varianza de la respuesta embriogénica ante los diferentes tratamientos dados por la combinación de los factores genotipo (Gen), explante (Exp), fuente de carbono (Car) y su concentración (Con), más la fuente de citocinina (Cit).....	78
6. Frecuencia de explantes embriogénicos para los clones UF273 y SCA6, con cada uno de los factores del tratamiento en que se produjo la embriogénesis. Se utilizó la prueba de Duncan con un $\alpha=0,05$. Letras similares indican igual significancia.....	80
7. Resumen de la respuesta embriogénica de los mejores resultados de los genotipos UF273 y SCA6.El cuadro muestra la frecuencia embriogénica ordenada de mayor a menor (Frecuencia %), número embriones por explante (Nº emb/exp), donde x=1-4, xx=5-10, xxx=11 o más; el tipo de explante, sea pétalo (Pet) o estaminoide (Est); La fuente de carbono, sacarosa (Sac) o glucosa (Gluc), y su concentración en gramos por litro (g/l); el tiempo de permanencia en el medio inicial (Tiempo (días))Kin, Kinetina.....	81

1. INTRODUCCION

1.1. Caracterización del problema

Desde el tiempo de los Mayas y posteriormente de los Aztecas, el cacao representó un bien de alto valor económico ya sea por su uso como alimento, moneda o como bebida ceremonial. Pero fue Hernán Cortez quien dio a conocer al mundo los atributos de este producto, convirtiendo a España en el primer país europeo que utilizó el cacao y monopolizó su uso por muchos años (Hardy, 1960).

En la actualidad, este cultivo originario del trópico húmedo, continúa manteniendo enorme importancia económica a nivel mundial. Un promedio de 3 millones de toneladas de cacao son producidas cada año, de las cuales aproximadamente un 90% son utilizadas como materia prima para la elaboración del chocolate. En la segunda mitad de la década de 1990's los países productores de cacao generaron un ingreso anual de más de 3000 millones de dólares por exportación de cacao en grano y de sus productos derivados (ITC, 2001). Adicionalmente de este cultivo depende la subsistencia de muchos pequeños agricultores para los que genera trabajo; permitiendo así mejorar sus niveles de vida (Mejía y Palencia, 2000).

Desafortunadamente, el cultivo del cacao no ha podido desarrollarse en toda su magnitud por lo que existe un déficit de producción, debido al bajo potencial productivo de los materiales sembrados y a la falta de híbridos adaptados a las zonas cacaoteras; asociado a la edad avanzada de las plantaciones, bajas densidades de siembra, la alta incidencia de enfermedades fungosas, las condiciones adversas de cultivo y los bajos precios del producto en el mercado (López *et al.*, 1997; ITC, 2001; Mejía y Palencia, 2000).

La Monilia (*Moniliophthora roreri*), la Escoba de bruja (*Crinipellis perniciososa*) y la Mazorca negra (*Phytophthora palmivora*), son enfermedades comunes en muchos países productores de cacao en América tropical (Pereira, 2000). Estas enfermedades continúan causando graves pérdidas en todas las regiones productoras, poniendo en peligro la sustentabilidad del producto. Por ejemplo la Mazorca negra causa pérdidas superiores al 70% en Africa Central y la Escoba de bruja ha reducido al 70% la producción en el estado de Bahia en Brasil (Eskes, 2001). Por tanto no es sorprendente que las pérdidas del

cultivo registradas mundialmente sean del 30% (Pereira, 2000). Según informes de la ICCO (Organización Internacional del Cacao) el déficit de suministro mundial de cacao en grano para el año 2001-2002 fue de 160.000 toneladas (Afrol news, 2002). En consecuencia alcanzar productividades aceptables y /o buena calidad a pesar de la presión ejercida por las enfermedades, son factores predominantes para el cultivo rentable del cacao en muchos países (Pereira, 2000).

Para reducir las pérdidas por estas enfermedades se han ensayado métodos químicos y profilácticos; pero estos han tenido poco éxito y son costosos. En vista de esta situación, en varios centros de investigación, se han hecho esfuerzos para seleccionar material resistente a estas enfermedades, con el fin de utilizarlos en programas de mejoramiento genético (Enríquez y Soria, 1984). Siguiendo con esta tendencia, en CATIE, con el apoyo de la *World Cocoa Foundation* (WCF) y *The United States Department of Agriculture* (USDA) se está desarrollando desde 1996 un programa de selección de genotipos superiores de alta producción y resistencia a las principales enfermedades con énfasis en Moniliasis (Phillips, 2003).

Los materiales mejorados deben ser propagados, sin embargo, de realizarse de manera sexual las plantas obtenidas serían altamente heterocigotas y variables ya que las semillas de cacao son producidas usualmente por polinización cruzada (Li *et al.*, 1998). Por lo tanto para la propagación de genotipos seleccionados es necesario aplicar técnicas que permitan mantener sus características deseables como son la resistencia a enfermedades y alta productividad entre las más importantes.

La reproducción vegetativa tradicional de los genotipos superiores de cacao ha sido por largo tiempo reconocida como un recurso potencial para incrementar la producción de cacao (Wood y Lass, 1987). Sin embargo, existen muchas desventajas asociadas a la propagación de plantas de cacao vía acodo, injerto o estaca, entre las que destacan la intensiva labor y sus elevados costos asociados, acompañados de una baja tasa de multiplicación (Li *et al.*, 1998). En la actualidad una de las alternativas de propagación vegetativa con enorme potencial es la embriogénesis somática, ya que además de mantener las características de la planta madre, permite una multiplicación masiva de plántulas (Guiltinan, 2000).

La embriogénesis somática en cacao tuvo su inicio en los años 70's, cuando se usaron explantes de embriones cigóticos inmaduros (Essan, 1977; Pence *et al.*, 1979; Pence, 1980). No obstante, estos primeros embriones tuvieron problemas para germinar y convertirse en plantas viables (Wang y Janick, 1984). Posteriores intentos para la obtención de plántulas a partir de embriogénesis somática fueron realizados por Novak *et al.* (1986), Adu- Ampomah *et al.* (1988); Duham *et al.* (1989); Dos Santos y Machado (1989); Chatelet y Dufour (1990); Litz (1984); Elhag *et al.* (1988); Aguilar *et al.* (1992). Sin embargo, en todos estos trabajos la maduración y conversión de los embriones somáticos a plantas, siempre fue un problema, aún cuando algunos de estos autores lograron la conversión, aclimatación y crecimiento *ex vitro* de algunos embriones somáticos. Otros intentos para lograr embriogénesis somática en cacao fueron realizados por Sondhal *et al.* (1989, 1993), López Báez *et al.* (1993), Figueira y Janick (1993), Alemanno *et al.* (1996), quienes trabajaron con tejidos somáticos florales y nucellares para disminuir el problema de la heterogenidad genética asociada al uso de tejidos cigóticos. Posteriores trabajos realizados por Li *et al.* (1998) y Lopez-Baez (2001) fueron más exitosos. No obstante los recientes progresos en esta área, la eficiencia lograda en la regeneración de plantas aún es baja; más aún la utilización práctica de esta tecnología de propagación es obstaculizada por la dificultad de inducir la embriogénesis somática para la mayoría de genotipos de cacao.

1.2. Justificación

La disponibilidad de buenas variedades es un aspecto básico de la producción sustentable de cualquier cultivo (Eskes, 2001); es por ello que por varios años el CATIE ha trabajado en la búsqueda de materiales promisorios de alta productividad y resistencia a diferentes enfermedades, especialmente fungosas. Estos esfuerzos han dado algunos resultados halagadores; sin embargo como es conocido en el ámbito agronómico, el cacao es una especie difícil de propagar vegetativamente y su clonación es una limitante a nivel mundial (López-Baez *et al.*, 2001), hecho que dificulta la propagación del material élite.

De esta manera se ha creado una necesidad por el desarrollo y aplicación práctica de sistemas rápidos y altamente eficientes de propagación vegetativa de nuevas variedades seleccionadas en los programas de mejoramiento genético y en el germoplasma silvestre (Traore *et al.*, 2003). Desde el punto de vista del mejoramiento genético, la clonación del

cacao se considera una etapa necesaria para optimizar la explotación de los beneficios directos de un genotipo seleccionado que responda a los requerimientos de resistencia a los parásitos, altos rendimientos y alta calidad chocolatera (López-Baez, 1996). . En este sentido los trabajos que se desarrollan actualmente en varias instituciones, se orientan al perfeccionamiento de diferentes técnicas de propagación, entre las que se encuentra la embriogénesis somática (López-Baez *et al.*, 2001).

Siguiendo con esta tendencia, la investigación planteada se propone dar nuevos aportes para la obtención de un protocolo eficiente de propagación vegetativa a gran escala de genotipos con resistencia a moniliasis y escoba de bruja, seleccionados mediante el programa de mejoramiento genético llevado a cabo en CATIE, mediante la embriogénesis somática. Esta metodología por sus características constituye un método de propagación eficaz, que evita varios de los problemas presentes en otros métodos, como la alta heterocigosis obtenida durante la reproducción sexual o el bajo porcentaje de viabilidad y elevados costos asociados con la labor intensiva y la alta demanda de mano de obra de otras formas de propagación vegetativa como el cultivo por estacas o injerto (Li *et al.*, 1998; Figueira y Janick, 1993).

El desarrollo de una metodología eficiente de propagación vegetativa como la embriogénesis somática se convertiría en una poderosa herramienta de apoyo al mejoramiento genético en términos de multiplicación, la conservación de germoplasma y el intercambio de material genético; acciones que en conjunto permitirían reducir el problema de suministro de semilla vegetativa para el establecimiento y renovación de plantaciones con materiales de alta calidad. Contribuyendo de esta manera a disminuir el déficit existente en la producción de cacao.

1.3. Objetivos

1.3.1. General

- Inducir la embriogénesis somática en explantes florales de material élite de cacao (*Theobroma cacao*) con resistencia a enfermedades fungosas.

1.3.2. Específicos

1. Establecer cultivos asépticos y con potencial morfogenético para los clones PA169, SCA6 y UF273.
2. Inducir la formación de callo embriogénico en estos clones.
3. Determinar la capacidad de respuesta a la embriogénesis somática en cada uno de los clones.
4. Evaluar diferentes condiciones de cultivo con el fin de mejorar la respuesta embriogénica de los clones.

1.4. Hipótesis

1. Es posible obtener explantes asépticos con capacidad morfogenética.
2. La respuesta de los explantes a la formación de callo es diferente en cada clon.
3. Cada uno de los clones estudiados tiene diferente capacidad de respuesta a la embriogénesis somática.
4. Es posible obtener mejores respuestas de los clones a la embriogénesis somática al variar las condiciones de cultivo.

2. REVISION DE LITERATURA

2.1. Aspectos generales del cultivo de cacao

Las primeras referencias de la planta de cacao y sus productos son encontradas en los relatos de los exploradores y conquistadores que siguieron a Colón. Estas primeras descripciones del singular árbol, de sus frutos y semillas, y de sus usos y métodos de cultivo son remarcablemente precisos (Baker, 1891).

Se presume que la palabra cacao tuvo su origen en las palabras mayas “Kaj” que significa amargo, y “Kab” cuyo significado es jugo. La fusión de estas palabras dio como resultado la palabra “Kajkab” a la que después de agregarse el sufijo “atl” que significa líquido, dio como resultado la palabra “Kajkabal” que posteriormente resultó en Kakauatl. Esta última expresión cambió para “cacahuatl”, para finalmente transformarse en “cacao” por facilidad de expresión (Barahona, 1987).

La palabra “chocolate” parece también tener su origen en la lengua hablada por los Mayas. Inicialmente fue “chacau”, que significa “alguna cosa caliente”. Posteriormente “chacau” dio origen a “chacauahaa” que significa “bebida caliente”. Por confusión con la palabra “cacahuate” resultó “cacahuate” y posteriormente “chocolatl”. Finalmente “chocolatl” derivó en “chocolate” término adoptado oficialmente por la lengua castellana (Barahona, 1987).

2.1.1. Origen y taxonomía

El cacao es una planta que se originó en América del sur, en el área del Alto Amazonas de acuerdo a los estudios de Pound, Chessman y otros. Debido al sistema de vida nómada que siempre llevaron los primeros habitantes de este continente, es difícil decir a ciencia cierta cual fue el lugar exacto de origen (Enríquez, 1983).

Theobroma cacao L. pertenece a la familia Malvaceae, del orden Malvales. El género *Theobroma* comprende 22 especies, todas originarias de los bosques húmedos tropicales de la América Ecuatorial (Mossu, 1990).

2.1.2. Botánica

Theobroma cacao fue el nombre dado por Linnaeus al árbol de cacao en la primera edición de *Species Plantarum*. La primera palabra del nombre de esta especie significa “alimento de los dioses” (Toxopeus, 1985; Baker, 1891). El género *Theobroma* se divide en 6 secciones que contienen 22 especies, de estas *T. cacao* es la única que es cultivada ampliamente (Toxopeus, 1985).

El hábitat natural del género *Theobroma* está en el más bajo estrato del bosque lluvioso siempre verde. Todas las especies silvestres del género se encuentran en los bosques lluviosos del hemisferio occidental, desde los 18 °N a los 15 °S, es decir desde México, hasta el sur de la Amazonía en Brasil y Bolivia (Toxopeus, 1985).

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

El árbol de cacao crece hasta alcanzar 10 metros de altura cuando está a la sombra de altos árboles forestales. En forma silvestre bajo la fuerte sombra del bosque primario ellos pueden crecer hasta 20 m. En una planta proveniente de semilla el tallo crece verticalmente y después de alcanzar de 1 a 1,5 m de altura, detiene el crecimiento apical y emite de 3 a 5 ramas laterales formando una horqueta; las ramas laterales se ramifican profusamente, debajo de la primera horqueta se forma un chupón que crece hasta formar un nuevo piso para continuar con el crecimiento vertical u ortotrópico de la planta. El árbol reproducido vegetativamente, no muestra un tallo único, predominando el crecimiento de las ramas laterales (ITC, 2001; Barahona, 1987).

El fruto es una mazorca de 15 a 25 cm de largo, dentro de la cual se encuentran las semillas embebidas en una pulpa mucilaginoso; el número de semillas puede variar de 30 a 40, las que se convierten en el grano del cacao después de ser fermentadas y secadas. Las mazorcas brotan del tronco principal y de las ramas de la copa. El cacaotal comienza a producir a partir del cuarto ó quinto año de haber sido plantado y puede producir por decenios (ITC, 2001; Wood y Lass, 1985).

2.1.3. Biología reproductiva

2.1.3.1. Morfología de la flor

La flor individual del cacao (Figura 1) tiene un pedicelo largo y fino de 1 a 1,5 cm de longitud, se compone de cinco sépalos agudos y rosados, de seis a ocho mm de largo, pubescentes, que en la flor abierta se expanden formando ángulo recto con el peciolo. La corola consiste de cinco pétalos blancos de seis a ocho mm de largo. El centro de la flor lo ocupa el tubo estaminal, compuesto por cinco estambres fértiles, cortos y doblados hacia fuera, cada uno encerrado en la concha de un pétalo; y de cinco estaminoideos internos, agudos y largos de posición erecta que rodean al gineceo. El ovario es súpero con cinco celdas y placentación central, con 30 a 50 rudimentos seminales. El estilo se abre arriba en cinco ramas estigmáticas algunas de las cuales permanecen con frecuencia soldadas (León, 2000).

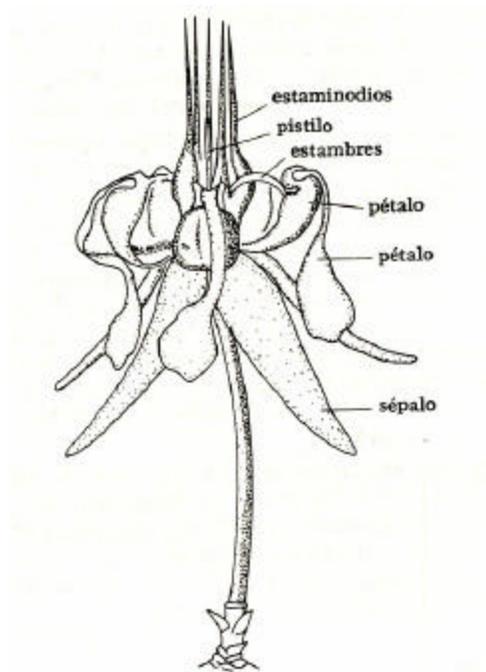


Figura 1. Flor de cacao

2.1.3.2. Polinización

El mecanismo de polinización del cacao presenta caracteres de mucho interés. La estructura de la flor no facilita la polinización por ninguno de los medios comunes, más bien la dificulta. El polen es demasiado pegajoso para que pueda intervenir el viento, tampoco la posición de las anteras se adapta a la condición de una planta anemófila, por lo que ciertos insectos son los que se encargan de la fecundación (León, 2000).

Las flores fecundadas pierden los pétalos, sépalos y estambres y el ovario inicia su crecimiento; muchos de los ovarios fecundados caen por diversas causas y sólo muy pocos llegan a la maduración (León, 2000; Urquhart, 1963).

2.1.3.3. Incompatibilidad

Debido a la frecuente autoincompatibilidad de un gran número de las flores del cacao, la cual puede ser parcial o total, menos del 5% de las mismas son fecundadas y llegan a dar fruto (León, 2000).

El fenómeno de incompatibilidad en cacao fue reportado por primera vez por Pound en 1932. En muchas plantas la incompatibilidad ocurre en el estilo o estigma, previniendo el desarrollo de los tubos polínicos, pero en cacao el mecanismo es diferente. Los tubos polínicos se desarrollan normalmente en todos los casos, pero cuando el material es incompatible, el gameto masculino no se fusiona con el femenino, lo que probablemente se deba a un mecanismo genético (Toxopeus, 1985).

Adicionalmente, la estructura de la flor parece impedir la autopolinización, hecho que también impide la fecundación de una flor con su mismo polen pues las anteras recurvadas hacia afuera están rodeadas por las conchas de los pétalos y separadas del estigma por los estaminodios; por lo tanto es necesaria la presencia de polen de otra flor para la fecundación (León, 2000).

2.1.4. Diversidad

Los árboles de cacao tienden a ser agrupados por tradición en tres grupos principales llamados Criollo, Forastero y Trinitario; de los cuales muchos híbridos han sido y continuarán siendo desarrollados (ITC, 2001).

La diversidad es más evidente en caracteres del fruto como la forma, relieve de la superficie y color; así como la forma de la semilla y el color de los cotiledones y en menor grado en caracteres del porte, follaje y flores. Menos visibles pero de gran importancia económica son las diferencias en susceptibilidad a enfermedades fungosas (León, 2000).

Los cacaos Criollos se caracterizan por tener frutos alargados, mazorcas de color rojo o amarillo en la madurez, los cotiledones frescos son de color blanco o violeta pálido. Requieren de un período corto para fermentar (2-3 días), es muy aromático y se los designa comercialmente como “cacao fino” (Vera, 1987a). Este grupo se cultivó primeramente en Mesoamérica donde ya son muy raros, luego en Suramérica, se cruzaron con poblaciones forasteras, dando origen al grupo Trinitario (León, 2000). Se ha reportado que los Criollos son extremadamente susceptibles a las enfermedades, especialmente a *Phytophthora spp* y *Ceratocystis* y no sobreviven a ataques persistentes de plagas (Toxopeus, 1985).

Los Trinitarios no son encontrados en estado silvestre, supuestamente son descendientes de cruces entre los Criollos y poblaciones locales de Forasteros; la mayor parte de América del Sur está ocupada por esta variedad. Las poblaciones de Trinitario tienen características de mazorca y semilla usualmente variables, debido a los caracteres altamente contrastantes de sus ancestros (León, 2000; Toxopeus, 1985).

Los Forasteros son un gran grupo que comprende tipos cultivados, semi-cultivados y silvestres, se cree que tienen su origen en la Amazonía. Las variedades de Forastero son por mucho las que producen el mayor tonelaje de semilla cosechada, de las cuales las poblaciones de Amelonado son las más cultivadas (León, 2000; Toxopeus, 1985). Actualmente la mayoría de árboles plantados de Forastero son híbridos, ya sea entre variedades de Forastero o una mezcla entre Criollo y Forastero. Estos híbridos son preferidos debido a la mayor resistencia a las enfermedades conocidas y a que tienen una mayor producción (ITC, 2001).

2.1.5. Enfermedades

Entre las enfermedades más dañinas están la escoba de bruja (*Crinipellis perniciosa*), la Mazorca negra (*Phytophthora palmivora*, *P. capsici*), la Monilia (*Moniliophthora roreri*), el

virus CSSV y la Muerte lenta vascular. Con excepción de CSSV, estas enfermedades son causadas por hongos (ITC, 2001).

Phytophthora palmivora y otros hongos del mismo género pueden causar la mancha negra de las mazorcas, enfermedad conocida como “Mazorca Negra”. Estos hongos se encuentran en mayor o menor grado en todos los países donde se cultiva el cacao. La incidencia de la enfermedad varía con la cantidad de lluvia y con su distribución, con la humedad atmosférica y con la temperatura, siendo en general mayor en los países de precipitación más alta (Hurquhart, 1963). *Phytophthora* es un patógeno del cacao de enorme importancia económica, de tal manera que el nivel de la incidencia de esta enfermedad puede bien determinar si es rentable o no plantar cacao en ciertas áreas (Lass, 1985).

La “Mazorca negra” es una enfermedad que ataca principalmente el fruto del cacao, este hongo puede reducir la producción hasta en un 100% durante los períodos más altos de infección. El hongo también ataca y destruye otras partes de la planta como hojas, chupones, yemas, raíces, flores y a veces inclusive el tallo (Hess, 1990).

La “Monilia o Moniliasis” (*Moniliophthora roreri*) afecta a las mazorcas tiernas, la infección se produce en los primeros estados de desarrollo del fruto, el cual es más susceptible cuando menor es su estado de crecimiento. Los frutos próximos a la madurez se vuelven negros debido a la necrosis. El hongo cubre la mazorca, dando la apariencia de congelamiento, por su color blanco, que después cambia a crema, y finalmente a gris o café. En mazorcas infectadas mayores a dos meses se presentan síntomas de madurez prematura y deformación, sin necrosis externa visible, pero luego se desarrolla la necrosis y esporulación externa (polvo blanco); muchos frutos se presentan aparentemente sanos, pero interiormente pueden estar completamente dañados (Hurquhart, 1963; Lass, 1985).

La “Escoba de Bruja” (*Crinipellis pernicioso*) fue reportada por primera vez en Surinam en 1895, y fue responsable en alto grado por la muerte de los cultivos en Surinam y Guyana (Lass, 1985). Esta enfermedad afecta a los brotes vegetativos, cojinetes florales y frutos jóvenes, en los que ataca tejidos meristemáticos en activo crecimiento, dando origen a la formación de brotes hipertrofiados o mal formados y a la proliferación de ramas laterales. En los cojinetes florales produce la formación de brotes vegetativos y/o flores y mazorcas

anormales en forma de ‘zanahorias’ y ‘chirimoyas’, en frutos jóvenes ocasionan hipertrofia; y, en adultos, manchas necróticas (negras) en la corteza y maceración acompañada por el endurecimiento de las almendras (Hurquhart, 1963; Hess, 1990).

El primer brote de “Mal de Machete” (*Ceratocystis fimbriata*) probablemente ocurrió en Ecuador en 1918. Esta enfermedad es ampliamente distribuida en el mundo y por lo tanto constituye una amenaza potencial siempre presente en los cultivos de cacao. Sin embargo sólo se manifiesta cuando los árboles atraviesan por condiciones de estrés (Lass, 1985). La enfermedad puede afectar principalmente a las ramas y troncos de los árboles de cacao; se presenta inicialmente con marchitamiento de la parte afectada. Las hojas se tornan amarillentas, luego de color café rojizo hasta secarse. Los árboles afectados pueden llegar a morir al poco tiempo de presentar sus primeros síntomas iniciales, es característico que las hojas secas permanezcan adheridas a las ramas por cierto tiempo sin desprenderse (Hurquhart, 1963). En los árboles afectados es típico encontrar un polvillo o aserrín de madera que sale de pequeños agujeros efectuados por insectos taladradores del género *Xyleborus*, los que actúa como transmisores de esta enfermedad a los árboles sanos (Lass, 1985).

2.2. Mejoramiento genético del cultivo de cacao

Existen dos criterios para el mejoramiento del cultivo del cacao: el mejoramiento para la producción y el mejoramiento para la resistencia a enfermedades. Cheesman y Pound en 1934 establecieron las bases para el mejoramiento genético orientado a la producción. Así se estableció el Índice de mazorca como el número de mazorcas necesarias para hacer un kilogramo de cacao seco; también se estableció el Índice de semilla, como el peso seco de la almendra fermentada y seca (Enríquez, 1983).

La Mazorca negra, la Escoba de bruja, la hinchazón de los brotes, la muerte vascular, y la monilia, son las cinco enfermedades consideradas como las más importantes del cultivo de cacao, ya que pueden destruir más del 40 % del total de los cultivos (Van der Vossen, 1999). En los esfuerzos para reducir las pérdidas por estas enfermedades se han ensayado métodos químicos y profilácticos, pero poco se ha logrado y estas enfermedades continúan limitando la producción (Enríquez y Soria, 1984).

En vista del poco éxito obtenido con el uso de productos químicos y el alto costo de los mismos para el combate, los centros de investigación han hecho esfuerzos para seleccionar material resistente a estas enfermedades con el fin de utilizarlo en programas de mejoramiento genético (Enríquez y Soria, 1984). De esta manera, la búsqueda de resistencia a estas enfermedades ha dominado muchos programas nacionales de mejoramiento en varios países (Van der Vossen, 1999).

En Costa Rica, el CATIE a través del programa de selección de genotipos superiores de alta producción y resistencia, se ha determinado la reacción de casi 600 clones de su Colección Internacional de Germoplasma, de los cuales una pequeña proporción (1%) ha mostrado un alto nivel de resistencia a enfermedades fungosas, principalmente a *Monilia*. Adicionalmente se ha iniciado la selección de genotipos superiores por su resistencia, producción, precocidad y/o vigor y se han identificado materiales cuya producción bajo condiciones de alta presión de inóculo, supera en más de un 300% la de algunos genotipos internacionales (Phillips, 2003).

El mejoramiento genético del material plantado involucra varios pasos: el manejo de germoplasma, la caracterización y evaluación, el desarrollo de herramientas de mejoramiento genético, estudios genéticos, creación y selección de nuevas variedades y la multiplicación y distribución del nuevo material (Eskes, 2001).

El mejoramiento genético convencional ha hecho posible logros significativos en el desempeño agronómico de varios cultivos. Sin embargo el advenimiento de nuevas tecnologías, amplía enormemente la habilidad de los mejoradores para efectuar mayores progresos en la calidad del cultivo, la resistencia a enfermedades y la producción (Wilkinson, 2001).

Las nuevas tecnologías usadas en mejoramiento genético, actualmente están sufriendo un dramático desarrollo. Estas tecnologías pueden proveer nuevo conocimiento en la estructura genética del germoplasma y la herencia para la selección de cualidades. De esta manera se ofrece al mejorador una guía para tomar decisiones al escoger los progenitores que serán usados para el mejoramiento, así como los mejores métodos; incrementando la eficiencia de la selección (Eskes, 2001).

Dentro de las nuevas tecnologías, la embriogénesis somática puede constituirse en una herramienta poderosa para la multiplicación, la conservación del germoplasma, el intercambio de germoplasma, así como la modificación genética en el cultivo de cacao (INGENIC, 2001).

2.3. Propagación

La propagación del cacao se realiza por la vía sexual o por semillas y por métodos de reproducción asexual o vegetativa, la cual utiliza los métodos de estacas, injertos y acodos (Soto y Herrera, 1985; Moreno *et al.*, 1983).

2.3.1. Propagación sexual

Es la forma más generalizada y fácil para reproducir el cacao (Moreno *et al.*, 1983). Existen dos formas principales de producir cacao por semillas; la primera es plantando las semillas directamente en el campo y la segunda es sembrando las semillas en un semillero temporal (Hardy, 1960).

Plantar directamente la semilla en el campo disminuye el costo del transplante, aunque es más difícil controlar enfermedades, pestes y plagas en el campo que en el semillero. Durante períodos secos es más económico irrigar un pequeño semillero, que irrigar un campo completo. En un invernadero es más fácil eliminar plantas pobres o débiles; aunque varios agricultores tienden a sembrar dos semillas en un mismo espacio para seleccionar la mejor planta, solucionando así este problema (Hardy, 1960).

La principal desventaja de la siembra por semilla es la variabilidad en la producción (Moreno *et al.*, 1983). En una población de plantas propagadas por semillas es de esperarse encontrar una gran variabilidad genética por tratarse de una planta alógama, por la estructura compleja de la flor y por la presencia de sistemas de incompatibilidad que caracteriza a ciertos tipos de cacao (Vera, 1987). Las variaciones pueden darse aún entre la descendencia de un mismo fruto (Soto y Herrera, 1985).

A pesar del problema que acarrea la variabilidad, es posible dar mayor seguridad a la propagación, mediante el uso de semillas mejoradas, obtenidas por cruzamientos entre clones seleccionados, que permiten tener una mayor producción por hectárea, así como cierto grado de resistencia a algunas plagas y enfermedades (Moreno *et al.*, 1983).

2.3.2. Propagación asexual *ex vitro*

En ningún individuo superior es posible fijar indefinidamente sus caracteres cuantitativos por medio de la reproducción sexual, por cuanto resulta difícil repetir la combinación de gametos que originaron el genotipo del individuo. De allí que la propagación vegetativa que da lugar a la propagación de clones, es el único procedimiento que permite perennizar genotipos superiores (Vera, 1987). Los métodos más utilizados para la propagación del cacao en forma asexual o vegetativa, son el injerto, la estaca y el acodo.

La injertación consiste en unir una rama o injerto a un patrón reproducido por semilla o enraizado, con el fin de que el cambium del injerto y del patrón queden en íntimo contacto, para que los nuevos tejidos provenientes de la división celular de ambos, queden justamente unidos y puedan transportar agua y alimentos a través de la unión (Vera, 1987).

La propagación por estacas consiste en cortar una rama de un árbol seleccionado y someterla a un tratamiento especial para que enraíce. Para el enraizamiento es necesario el uso de propagadores, que pueden ser hechos de diversos materiales. La estaca requiere además reunir condiciones especiales de vigor y un manejo adecuado (Moreno *et al*, 1983). Por ello la estaca debe provenir de plantas de alto rendimiento, buena calidad y tolerancia al ataque de plagas y enfermedades (Soto y Herrera, 1985).

El acodo constituye otro procedimiento de reproducción vegetativa, en el que puede emplearse ramas de mayor edad que las ramillas. En este caso se debe cortar un anillo de corteza de un cm de ancho y depositar sobre ella cualquier hormona que estimule la emisión de raíces. La herida debe cubrirse con material enraizante, humedecido y sujeto por un plástico perforado. Luego de enraizada la rama, se la puede separar de la planta y sembrarla en fundas de polietileno llenas de tierra. Este procedimiento es menos usual para cacao (Vera, 1987).

Las técnicas descritas de propagación vegetativa presentan eficiencia variable, requieren de jardines clonales para producir suficiente material para la propagación y un alto costo por planta obtenida, por lo que su utilización es muy limitada. Como resultado de programas de mejoramiento genético del cacao desarrollados en diversos centros del mundo, existe una cantidad considerable de genotipos mejorados: sin embargo una de las

mayores limitantes para aprovechar este germoplasma mejorado es la falta de métodos de clonación masiva de plantas seleccionadas, eficientes tanto desde el punto de vista económico como agronómico (López – Baez *et al.*, 2001)

2.3.3. Propagación asexual *in vitro*

El deseo de obtener grandes cantidades de propágulos de cultivares de alto rendimiento ha estimulado los estudios en cultivos de tejidos (Elhag *et al.*, 1988). Existen varias vías para realizar la propagación asexual *in vitro*; entre ellas están la multiplicación de brotes a partir de yemas terminales, axilares o laterales, la organogénesis directa, la organogénesis indirecta, la embriogénesis somática, el microinjerto y el rescate de embriones (Krikorian, 1991).

Archibald (1954) consiguió por primera vez inducir callo del tejido cambial del cacao, usando el medio de White con agua de coco; sin embargo no pudo obtener la organogénesis. A partir de esta experiencia se han hecho varios intentos para lograr la propagación *in vitro* de este cultivo, utilizando diferentes vías como el cultivo de ápices, cultivo de microestacas, el cultivo de embriones cigóticos y la embriogénesis somática (Essan, 1977). Algunos de los trabajos más importantes son descritos a continuación.

Hall y Collin (1975) cultivando fragmentos de tallos de cacao joven en diferentes medios, a los que adicionaron sustancias reguladoras del crecimiento simples y complejas como la Kinetina, el agua de coco y extractos de frutos de cacao; en presencia de diferentes combinaciones de temperatura y de luz; obtuvieron callo, pero estas células no regeneraron.

Orchad y colaboradores (1979) cultivaron ápices en medio de Linsmaier y Skoog, al que adicionaron diversos reguladores de crecimiento (kinetina, zeatina, AIB, AIA, GA3). Los explantes fueron extraídos de plantas jóvenes y se cultivaron en medio sólido y líquido en agitación. Estos ápices se volvieron turgentes y en algunos casos se produjo la formación de hojas.

Passey y Jones (1983) cultivaron ápices y nudos de 0,5 a 1 cm de largo, obtenidas de retoños jóvenes en pleno crecimiento, en un medio de Murashige y Skoog (1962), adicionado con diversas combinaciones de citocininas (BAP, 2iP, IPA) y de auxinas (AIB, ANA). Se obtuvieron algunos brotes con hojas de escaso desarrollo. A pesar de las

transferencias frecuentes sobre el medio fresco, ninguno de estos brotes sobrevivió más allá del 12^o mes. En el mismo trabajo adicionando giberilinas sobre el medio base, se obtuvo el alargamiento de entrenudos y hojas, no obstante, las plantas murieron en las primeras semanas de establecido el cultivo.

También Janick y Whipkey (1985), estudiaron la proliferación de yemas axilares y su desarrollo a partir de explantes obtenidos de nudos cotiledonares de cacao, utilizando medio MS modificado con diferentes fuentes de carbono, sales, 2iP o BA, solas o en combinación.

Por su parte Miller cultivó explantes nodales con el objetivo de obtener tallos *in vitro* y a partir de ellos plantas enraizadas, probando diferentes combinaciones de medios y de reguladores de crecimiento (Murashige y Skoog, adicionados con AIB, AIA, BAP, 2iP). Pero, solamente se obtuvieron algunos explantes de yemas sin formación de tallo.

Maxwell y Blake (1984) también utilizaron explantes nodales de árboles jóvenes de cacaotales de edades de 4 y 5 años, lo que cultivaron sobre un medio de base simple, adicionando reguladores del crecimiento. Estos explantes produjeron una primera generación de brotes.

Legrand y Missiso (1986), determinaron la influencia de las dimensiones de los explantes y de los reguladores de crecimiento Zeatina, AIA, AIB, con respecto al desarrollo de los tejidos de *T. cacao in vitro*.

Legrand *et al.*, (1984) utilizó varios explantes tomados en distintos niveles de plántulas de cacao; encontrando que la callogénesis y la rizogénesis se ven favorecidas por el ANA o la Leche de coco (LDC), según el origen del explante, además que el ANA parece inducir la proliferación de yemas de nudos cotiledonares.

También se han realizado varios estudios respecto a la propagación de microestacas de cacao; así por ejemplo Legrand, *et al.*, (1984), obtuvieron tallos *in vitro*, a partir de explantes extraídos de plántulas muy jóvenes. Dufour y Dublin (1985), estudiaron la influencia de los factores físicos y de los factores químicos respecto a la obtención de tallos *in vitro*; logrando obtener microestacas con raíz, aptas para plantación en campo, a

partir de fragmentos de tallos ortotrópicos de cacao. Por su parte, Bertrand (1987), estudió las concentraciones de citocininas, auxinas, compuestos fenólicos y la etapa fisiológica de la rama en el momento del corte, con el objetivo de mejorar la fase de brote de la yema axilar de las estacas ortotrópicas. Aguilar (1996) estudió los factores que influyen en la falta de reactividad de las microestacas de cacao cultivadas y observó que se presentaban diferentes respuestas de acuerdo a las características ontogénicas de la planta y la posición de las yemas en las ramas; mientras Lardet *et al.*, (1998) inició el cultivo de microestacas con explantes nodales, observando que la respuesta estaba influenciada considerablemente por el estado fisiológico de las ramas de donde fueron tomados los explantes, así como en la posición en que se encontraban los nudos en la rama, con respecto al ápice.

Aguilar *et al.*, (1992) trabajando con la técnica de microinjerto de embriones somáticos probaron el uso de IBA para inducir el desarrollo de raíces adventicias y su efecto sobre el desarrollo del injerto; así como la respuesta de la presencia o ausencia de cotiledones del embrión somático sobre el prendimiento del injerto.

2.3.3.1. Embriogénesis somática

Hace más de 100 años Haberlandt declaró que era posible hacer crecer exitosamente en forma artificial embriones originados de células vegetativas (Krikorian *et al*, 1969). Basado en la teoría celular de Schwann y Schleiden él consideró a cada célula como un organismo elemental y estaba convencido de la totipotencia de las células diferenciadas. Sus experimentos de cultivos con células aisladas de hoja sientan los fundamentos del cultivo *in vitro* en general. Sin embargo, no fue hasta 1958 que los embriones somáticos fueron detectados y reconocidos como tales en cultivos *in vitro* gracias a los trabajos independientes de Reinerth, Steward y colaboradores en cultivos derivados de explantes multicelulares de *Daucus carota* (Kohlenbach, 1985).

De acuerdo a Fehér *et al.*, (2003), uno de los ejemplos más extremos de flexibilidad en el desarrollo de las plantas, es la capacidad de algunas células, a más de los cigotos, de iniciar el desarrollo embrionario. La embriogénesis somática es definida como un proceso en el cual una estructura bipolar, con un eje radical y uno apical, semejante a un embrión cigótico, se desarrolla de una célula somática sin conexión vascular con el tejido

original. Estas estructuras son capaces de crecer y formar plantas normales (Litz, *et al.*, 1991; Arnold *et al.*, 2002).

Un embrión puede ser definido como el más temprano estado multicelular reconocible de un individuo que ocurre antes de que se hayan desarrollado las estructuras u órganos característicos de una especie dada. Los embriones somáticos, asexuales o adventicios son los iniciados a partir de células que no son el producto de la fusión de gametos (Gray, 2000).

Mientras que la zanahoria fue la primera especie en que la embriogénesis somática *in vitro*, fue reportada; en los años siguientes muchas especies angiospermas y gimnospermas han sido adicionadas a la lista de éxitos (Gray, 2000). En cacao los primeros trabajos en embriogénesis somática, aunque sin la obtención de plantas fueron reportados por Esan (1977) y Pence (1979 – 1980) con explantes de embriones cigóticos inmaduros (Pence, 1995).

A partir de los intentos mencionados, se evaluó la capacidad embriogénica de diferentes explantes de la planta de cacao. Kononowicz *et al.* (1984a) y Elhag *et al.*, (1988), trabajaron con embriones cigóticos extraídos de la semilla de cacao. Otros investigadores ensayaron nuevamente con embriones inmaduros (Novak *et al.*, 1986; Adu-Ampoah *et al.* 1988; Duham *et al.*, 1989; Dos Santos y Machado, 1989; Chatelet y Dufour, 1990). Aguilar y colaboradores (1992) y Omokolo *et al.*, (1997) probaron cotiledones maduros. Estos métodos descritos fueron exitosos en producir embriones somáticos; sin embargo necesitaron explantes que no mantienen las características de sus progenitores y por lo tanto no son útiles para propagación clonal.

Con el objetivo de mantener las características de las plantas progenitoras, se probaron tejidos somáticos; de esta manera Litz en 1986 utiliza el tejido de hojas de cacao (Pence, 1995). También se probaron nucelas en diferentes estados de desarrollo (Sondahl *et al.*, 1989; Chatelet *et al.* 1992; Figueira y Janick, 1993). Sondahl *et al.*, (1993), Lopez-Baez *et al.*, (1993) ; Pence, 1995; Lopez-Baez *et al.*, (1996); Li *et al.*, (1998) y Maximova *et al.*, (2002) obtuvieron resultados promisorios en la obtención de embriones somáticos utilizando explantes florales.

De igual manera fue observada la respuesta de estos explantes en medios con diferente composición, teniendo en la mayoría de los casos el medio de Murashige y Skoog (1962) como principal fuente de nutrientes inorgánicos (Figueira y Janick, 1993; López-Baez *et al.*, 1993). Pence *et al.*, (1979) suplementó el medio basal con agua de coco y 1,5 mg/l de ANA, logrando la proliferación de embriones somáticos a partir de embriones sexuales. Posteriormente, probó que tanto el ácido abscísico (ABA) como la sacarosa tienen efectos sobre la iniciación de los eventos asociados con la maduración del embrión *in vitro* (Pence, 1995). La eficacia del agua de coco también fue probada por Kononowicz *et al.*, (1984a) y Elhag *et al.*, (1988), obteniendo en ambos casos resultados positivos.

De acuerdo a Elhag *et al.* (1988) el 2,4-D no es esencial para la inducción de la embriogénesis somática en cacao, pero puede incrementarla en bajas concentraciones en algunos clones como el BC36. Chatelet *et al.* (1992) obtuvieron células embriogénicas y proembriones en desarrollo temprano, cultivando nucelas y tegumento interno en medio MS suplementado con 4,5 uM de 2,4-D y 0,44 uM de BAP (Chatelet *et al.*, 1992). También Kononowicks *et al.*, (1984a) trabajó con 2,4-D y observó que en altas concentraciones induce la formación de callo y suprime la producción de embriones. Sin embargo, Omokolo *et al.*, (1997) indujo la formación del callo en un medio MS suplementado con 2,4-D como principal elemento regulador, aunque adicionó una citocinina (2-iP o BAP) para el desarrollo del callo.

Sondahl *et al.*, (1993) utilizó un medio MS con sales reducidas enriquecido con auxina, citocinina, polivinilpirrolidona (PVP) y varios compuestos orgánicos como caseína hidrolizada, cisteína, extracto de malta y agua de coco para regeneración. Como resultado el 4,3% de explantes produjeron embriones somáticos.

Así mismo citocinas, auxinas, ácido giberélico (GA3) y ácido abscísico (ABA) se han utilizado para el desarrollo y maduración de los embriones somáticos; así como sacarosa y carbón activado (Pence, 1995). Omokolo *et al.*, (1997) utilizó IBA en cacao y logró promover la inducción de embriones somáticos y también rizogénesis.

Li *et al.* (1998) lograron inducir un crecimiento rápido del callo utilizando el medio DKW (Woody Plant Medium) para crecimiento primario y medio PCG (Primary Callus Growth) suplementado con Thidiazuron (TDZ).

El efecto de la consistencia de los medios de cultivo fue estudiado por Adu-Ampomah *et al.*, (1988), resultando el medio líquido más adecuado para promover el desarrollo de embriones, mientras que el medio sólido permitió abundante formación de callo.

Figueira y Janick (1993) también usaron medio líquido y sólido. Estos autores lograron la formación de embriones nucleares en medio de iniciación líquido. Los embriones fueron transferidos posteriormente a medio semisólido donde se desarrollaron los estados globular y torpedo del embrión; no obstante la maduración final fue realizada también en medio líquido.

Pence *et al.*, (1979) cultivó explantes en la luz y en oscuridad sin obtener diferencias entre estos tratamientos. La mayor parte de los trabajos en embriogénesis somática en cacao, han sido realizados en la oscuridad (Adu-Ampomah *et al.*, 1988; Sondhal *et al.*, 1989; Aguilar *et al.*, 1992).

Aunque el régimen de cultivo puede influenciar en el potencial embriogénico, en cacao las diferencias genotípicas tienen también gran influencia en la capacidad a la embriogénesis somática (Adu-Ampomah *et al.*, 1988).

Pence *et al.*, (1979) observaron una mejor respuesta de los genotipos UF221 y 41R a la embriogénesis somática frente a SIAL 93 y UF 11. Asimismo se mencionan diferentes respuestas de los clones de BC5, BC6 y BC36 ante los efectos del 2,4-D, del agua de coco, BA, prolina, sulfato de amonio y sulfato de adenina, así como a la aplicación de ácido giberélico (Kononowickz, 1984a; Kononowickz, 1984b; Elhag *et al.*, 1988).

Se observó diferencia en la capacidad de iniciación de callo y de la embriogénesis somática en los explantes de S19, T79/501 y T63/967 al ser cultivados en un medio conteniendo 10 uM de NAA. El genotipo S19 produjo más callo pero menos número de embriones por explante, los cuales fueron también más pequeños que aquellos regenerados de T79/501 y T63/967. Sin embargo cuando los explantes fueron subcultivados en un medio diferente, S19 produjo más embriones somáticos que los otros dos genotipos estudiados (Adu-Ampomah *et al.*, 1988).

Alemanno *et al.* (1996) indican que cuando se utilizó el protocolo modificado de Lopez – Baez *et al.*, (1993), solo 5 de 25 genotipos de cacao estudiados produjeron embriones somáticos, mientras que el resto no respondieron.

Por otra parte, Li *et al.* (1998) lograron estimular la embriogenesis somática de 19 genotipos de cacao, representantes de los 3 grupos más grandes (Forastero, Trinitario y Criollo), observando diferente respuesta en cada uno de los clones estudiados.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1. Localización del estudio

La investigación fue realizada en los Laboratorios de Biotecnología del CATIE en Turrialba, Costa Rica, desde marzo hasta septiembre del 2004.

3.2. Material vegetal

Para este estudio se utilizaron botones florales de cacao de los genotipos SCA6, PA169, UF273, colectados de árboles seleccionados de la colección de germoplasma de cacao del CATIE, ubicada en la Estación Experimental Cabiria. Algunas características importantes de estos clones son presentadas en el cuadro 1.

Cuadro 1. Características importantes de los clones estudiados. R= resistente, S= susceptible, MR= medianamente resistente, MS= moderadamente susceptible.

Clon	Origen	Tipo genético	Compatibilidad	Color del fruto	Producción	Resistencia a enfermedades		
						Phytophthora	Esc. de bruja	Monilia
PA169	Perú	Forastero	Autoincompatible	Verde	Media	S	x	MR
SCA6	Ecuador	Forastero	Autoincompatible	Verde	Muy baja	MS	R	S
UF273	Costa Rica	Trinitario	Autocompatible	Rojo	Media	S	x	R

3.3. Métodos

3.3.1. Identificación del material a colectar

En la colección de germoplasma de cacao del CATIE se identificó cada uno de los clones pertenecientes a los diferentes genotipos seleccionados para este estudio, a partir de los cuales se hizo la colecta de botones florales.

3.3.2. Colecta de explantes

La colecta de flores inmaduras en estado de botón floral, se realizó entre las 8 y las 9 de la mañana, con el fin de evitar la apertura de los botones, después de aislados del árbol. Seguidamente los botones fueron colocados en un recipiente con agua fría y llevados al laboratorio.

3.3.3. Desinfección de los explantes

En la cámara de flujo laminar, los botones colectados fueron desinfectados de acuerdo al tratamiento establecido por Rivera (2003), el cual consiste en el lavado de los botones

en agua corriente, seguido de la inmersión en hipoclorito de sodio (NaOCl) al 25% (v/v) durante 10 minutos y de tres enjuagues con agua destilada estéril.

3.3.4. Introducción en el cultivo

En esta investigación se utilizó la metodología desarrollada por López-Baez (1993) y mejorada por Alemanno (1995) y Young *et al.* (2003). Como parte del estudio se evaluaron diferentes variables de cultivo en términos de fuentes de carbono y reguladores del crecimiento, tiempo de cultivo y tipo de explante.

3.3.4.1. Disección de los explantes

Como explante para el cultivo *in vitro* se utilizaron bases de pétalos y estaminoides, que fueron aislados de los botones florales después de la desinfección. Los botones florales fueron seccionados con la ayuda de un bisturí estéril y los sépalos fueron separados para poder extraer las bases de los pétalos y estaminoides con mayor facilidad.

3.3.4.2. Inducción del callo primario

Los explantes fueron colocados en cajas petri de 60 x 15 mm, conteniendo de 7 a 8 ml de medio de cultivo semisólido PCG (Primary Callus Growth Medium) (Anexo 2A). En cada caja petri se colocó 5 bases de estaminoides y 5 bases de pétalos, pertenecientes a un mismo botón, distribuidos uniformemente en toda la superficie del medio, asegurando un buen contacto de los explantes con el medio de cultivo.

Para conocer la influencia de diferentes factores sobre el desarrollo del callo en primera instancia, así como la influencia de los tratamientos resultantes de las combinaciones de estos factores sobre la expresión de la embriogénesis somática, en esta etapa se evaluaron como fuentes de carbono la sacarosa y la glucosa en concentraciones de 20, 30, 40 y 50 g/l, cada una de ellas y su interacción con los factores clon y tipo de explante, en dos tiempos de cultivo diferentes (14 y 28 días).

3.3.4.3. Desarrollo del callo secundario

Posteriormente los explantes florales fueron transferidos al medio de multiplicación de callo conocido como SCG (Secondary Callus Growth Medium) (Anexo 2B), donde permanecieron 14 días. En esta etapa se probó el efecto de las citocininas Kinetina (0.3

mg/l) y BAP (0.05 mg/l), de manera independiente, interactuando con los factores mencionados anteriormente.

3.3.4.4. Expresión del embrión somático

Del medio SCG se transfirieron los explantes a medio de cultivo semisólido ED (Embry Development Médium) (Anexo 2C), donde se los mantuvo por otros 14 días en la oscuridad. A partir de este paso los explantes fueron cambiados a medio fresco ED cada 14 días y mantenidos en la oscuridad. Los callos permanecieron en este medio hasta la aparición de los embriones.

3.3.4.5. Conversión del embrión somático en planta

Para esta etapa se seleccionaron embriones somáticos con cotiledones y eje bien definidos, para ser cultivados en el medio PEC (Primary Embryo Conversion Médium) (Anexo 2D) a la luz, con un fotoperíodo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Se realizaron subcultivos cada 30 días transfiriendo los embriones a medio fresco PEC, hasta que se dio la aparición de una o dos hojas. Posteriormente los embriones fueron transferidos a medio RD (Root Development and Maintenance Médium) (Anexo 2E), donde permanecieron de 30 a 90 días. Los embriones fueron transferidos a medio fresco RD cada dos meses para continuar su desarrollo en etapas posteriores.

3.3.4.6. Embriogénesis secundaria

Es posible obtener embriones secundarios a partir de embriones primarios recientemente madurados. Para esto, los embriones primarios fueron cultivados a la oscuridad por 14 días en cajas petri de 60 x 15 mm, conteniendo de 7 a 8 ml de medio SCG. Posteriormente los explantes de embrión fueron transferidos a cajas petri con medio ED donde fueron mantenidos hasta la maduración de los embriones en períodos de subcultivo de 14 días. Una vez maduros, los embriones son transferidos al medio para conversión (PEC) para continuar con el mismo proceso que sigue un embrión primario.

3.3.5. Condiciones de cultivo

Todos los medios de cultivo utilizados en el estudio fueron semisólidos, ajustados a un pH de 5,8, con excepción de los medios SCG y ED que se ajustaron a un pH de 5,7 antes de ser autoclavados. Los cultivos fueron mantenidos en la oscuridad a 25°C desde su

implantación hasta la expresión del embrión somático, en los pasos posteriores fueron sometidos a fotoperíodos de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad.

3.3.6. Histología

Con el objetivo de tener una mejor referencia del callo con potencial embriogénico, se realizó un estudio histológico de callos en donde previamente se observaron embriones somáticos.

Las muestras de callos colectadas fueron fijadas en FAA durante 48 horas a temperatura ambiente. Luego fueron deshidratadas en una serie ascendente de alcohol (50, 60, 80, 90, 95, 100 y 100%), con permanencia de una hora en cada uno de ellos. A continuación las muestras fueron infiltradas en historesina Reichter Jung a 4°C por un día. Posteriormente se prepararon bloques que fueron cortados a 4 micras de grosor con la ayuda de un micrótopo de rotación. Los cortes fueron sometidos a una batería de tinción con PAS (Periodic Acid Schiff) y NBB (Naphthol Blue Black) previo a su observación.

3.4. Análisis estadístico de los datos

Para la ejecución de la investigación se establecieron diferentes ensayos, en los que se probó la respuesta de los 3 clones seleccionados ante diferentes factores. La unidad experimental (repetición) está representada por la caja petri donde se realizan los cultivos, conteniendo los 5 pétalos o estaminoides obtenidos de una misma flor. Cada uno de estos 5 explantes constituye la unidad de observación.

3.4.1. Fuente de carbono

El primer ensayo fue establecido bajo un Diseño Completamente Aleatorizado con estructura factorial de 96 tratamientos y 10 repeticiones, en donde los tratamientos están dados por el producto de los factores en estudio: 2 explantes (base de pétalos y base de estaminoides), 2 fuentes de carbono (sacarosa y glucosa), 4 concentraciones de cada una de las fuentes de carbono (20, 30, 40 y 50 g/l), 2 tiempos de subcultivo (14 y 28 días) y 3 clones (SCA6, PA169 y UF273).

3.4.2. Fuente de citocinina

El segundo ensayo fue establecido a partir del primero, como una continuación de este. En donde se tomó los mismos explantes cultivados en PCG para transferirlos a SCG,

medio en el que se probó dos fuentes diferentes de citocininas (Kinetina y BAP). Este ensayo se estableció como un Diseño Completamente Aleatorizado con estructura factorial de 192 tratamientos, resultantes del producto de los 96 tratamientos iniciales por las dos fuentes de citocinina (Kinetina a una concentración de 0.3 mg/l y el BAP a una concentración de 0,05 mg/l). El número de repeticiones disminuye, debido a que las 10 iniciales son divididas para ser introducidas 5 en un medio con BAP y las 5 restantes en un medio con KIN.

3.4.3. Variables de respuesta

Para evaluar la respuesta de los explantes de los tres clones ante los diferentes tratamientos para la inducción a la formación y desarrollo del callo, se utilizó el Índice de desarrollo de callo (IC), dado por la fórmula:

$$\text{IC} = \sum (\text{Estado} \times \text{número de explantes en ese estado})$$

En donde los estados son el resultado de las observaciones visuales durante la investigación; las que determinaron 8 estados de desarrollo de callo, que van de 0 -7. El IC tiene valores entre 0 y 35, en donde el 0 indica un crecimiento nulo, mientras que el 35 indica el máximo desarrollo para esta etapa. 35 es el máximo valor que el IC puede alcanzar, en caso que los 5 explantes de una repetición lleguen al valor máximo de 7.

Lo más relevante de este trabajo fue la evaluación de la aptitud de los clones a la embriogénesis somática, en donde las variables de respuesta fueron la frecuencia de aparición del embrión somático, así como el promedio de embriones somáticos por explante.

La fórmula para obtener la frecuencia es:

$$\text{Frecuencia} = \frac{\text{\# de explantes con formación de embrión} \times 100}{\text{\# de explantes totales}}$$

Los datos fueron procesados y analizados mediante análisis multifactorial con la ayuda del programa SAS.

Adicionalmente, con la ayuda del programa Infostat se realizó un Análisis de correlación para conocer el nivel de relación entre el desarrollo de callo y las variables que indican la respuesta de la embriogénesis somática (Frecuencia embriogénica y número promedio de embriones por explante).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Establecimiento de cultivos asépticos

Evitar la contaminación con microorganismos es un aspecto básico que se debe tener en cuenta para el éxito, no solamente en el establecimiento de los cultivos, sino en su ulterior incubación y manipulación (Mroginski y Roca, 1991). Si la esterilización inicial de la superficie del explante es ineficiente, hongos, levaduras y bacterias pueden ser introducidas en el cultivo *in vitro* con el material vegetal (Leifert *et al.*, 1991). Es por este motivo, que en el inicio del trabajo, previo a la introducción de los explantes en el medio de inducción de callo (PCG), se probó la metodología de desinfección utilizada por Rivera (2003), para el establecimiento de cultivos en forma aséptica.

Es importante señalar que el procedimiento para la desinfección superficial de los explantes debe permitir eliminar los microorganismos procurando el menor daño posible para los explantes (Mroginski y Roca, 1991). Por lo tanto para considerar el procedimiento de desinfección como exitoso, fue necesario evaluar tanto el nivel de asepsia como el de sobrevivencia de los explantes.

Los niveles de asepsia logrados, fueron cercanos al 100 %, tanto para pétalos como para estaminoides en los tres clones evaluados (Figura 2). Estos valores son superiores a los obtenidos por Rivera (2003), en un trabajo similar con explantes florales de cacao, quien obtuvo hasta un 90% de asepsia en condiciones similares y prueban la eficacia del tratamiento de desinfección utilizado. No obstante Mroginski y Roca (1991), señalan que es difícil lograr cultivos completamente estériles para cualquier especie. Asimismo Leifert y colaboradores (1991), afirman que en diferentes estudios los explantes que han sido tomados de plantas cultivadas en el campo en climas tropicales son más difíciles y a veces imposibles de esterilizar.

Por otro lado, las observaciones realizadas después de varios días de la introducción de los explantes en el primer medio de cultivo, muestran una alta sobrevivencia, también cercana al 100%.

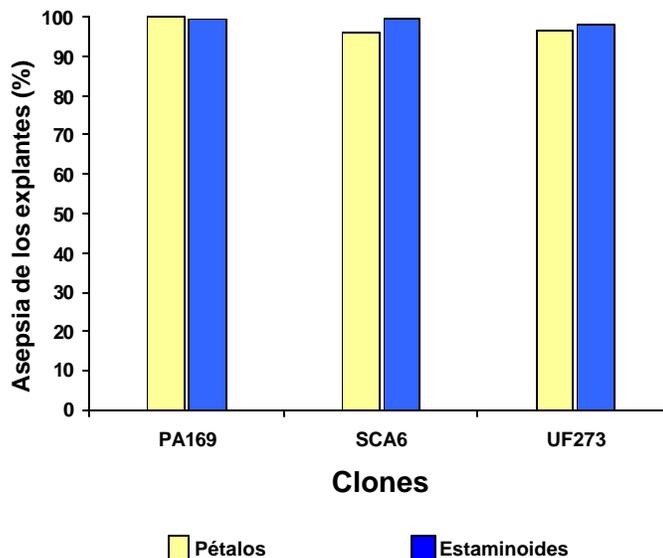


Figura 2. Porcentaje de asepsia obtenido en pétalos y estaminoides de los clones de cacao PA169, SCA6 y UF273; al final del cultivo en el medio de inducción de callo (PCG).

De esta manera se logró cumplir con los dos requerimientos para considerar que el procedimiento de desinfección para el establecimiento de cultivos asépticos fue eficiente. Es posible que estos resultados se deban a que los explantes fueron tomados del interior del botón floral, el que fue colectado completamente cerrado; por lo tanto es de esperar que los explantes estuvieran protegidos por el cáliz de la contaminación exterior, así como del daño que el desinfectante hubiera podido causar.

4.2. Inducción de callo primario

En la inducción de la embriogénesis somática de cacao, varios autores han estudiado la respuesta de explantes florales a la callogénesis, obteniendo diferentes resultados de acuerdo con la metodología aplicada (Li *et al.*, 1998; López – Báez *et al.*, 2001; Pence, 1995; Sondahl *et al.*, 1993). De igual manera, en el presente trabajo a pesar de que todos los tratamientos indujeron callogénesis, tanto en pétalos como en estaminoides, la respuesta varió, dependiendo de los clones, tipo de explante y condiciones de cultivo. Respuestas similares han sido reportadas en café (*Coffea ssp*), quince (*Cydonia oblonga*) y *Robinia pseudoacacia* L. entre otros cultivos (Sreenath *et al.*, 1995; Etienne *et al.*, 1999; Han y Park, 1999; Fisichella *et al.*, 2000).

Durante las dos primeras semanas de cultivo en el medio de inducción de callo (PCG), los explantes (pétalos y estaminoides) de los clones PA169 y SCA6, mostraron un aumento en tamaño y volumen y se volvieron turgentes, para luego dar lugar a la formación del callo en diferente intensidad. Contrastantemente, los explantes del clon UF273, presentaron un menor desarrollo y la aparición del callo, no siempre se dio tras el aumento de volumen del explante. En varios casos los explantes se necrosaron con cierta frecuencia, y fue a partir de este tejido que se desarrolló un callo en pequeña cantidad. El menor desarrollo de callo en UF273 pudiera ser el resultado de una respuesta genotípica relacionada con el uso del TDZ, componente del primer medio de cultivo (PCG), cuyo uso según algunos autores provoca diferentes respuestas de desarrollo que varían con el genotipo utilizado (Li *et al*, 1998).

Las observaciones realizadas en el curso del cultivo, permitieron determinar diferentes estados (E) de desarrollo del callo en los explantes (Figura 3). Los primeros cuatro estados están determinados por la cantidad de callo que cubre el explante, y van de 0 a 3. E0 indica ausencia, E1 indica el inicio de pequeñas formaciones de callo, en E2 el callo cubre aproximadamente la mitad del explante; en E3 el callo ha cubierto casi en su totalidad el explante, sin embargo todavía es posible observarlo; finalmente, en E4 el callo cubre por completo el explante. Los siguientes estados son descritos posteriormente en la sección correspondiente a desarrollo de callo secundario.

La determinación de los diferentes estados de desarrollo del callo, permitió evaluar de forma cuantitativa la respuesta a la inducción de callo para cada uno de los clones en estudio, mediante el establecimiento del Índice de formación de callo (IC). El IC tiene valores que van de 0 a 35, en donde el 0 indica un desarrollo nulo del callo, mientras que 35 indica el mayor desarrollo.

Este índice se estableció con el fin de determinar si existe una relación entre el desarrollo del callo y la respuesta a la embriogénesis somática en los explantes de pétalo y estaminoide. Los resultados obtenidos serán comparados posteriormente con la respuesta embriogénica de los explantes.

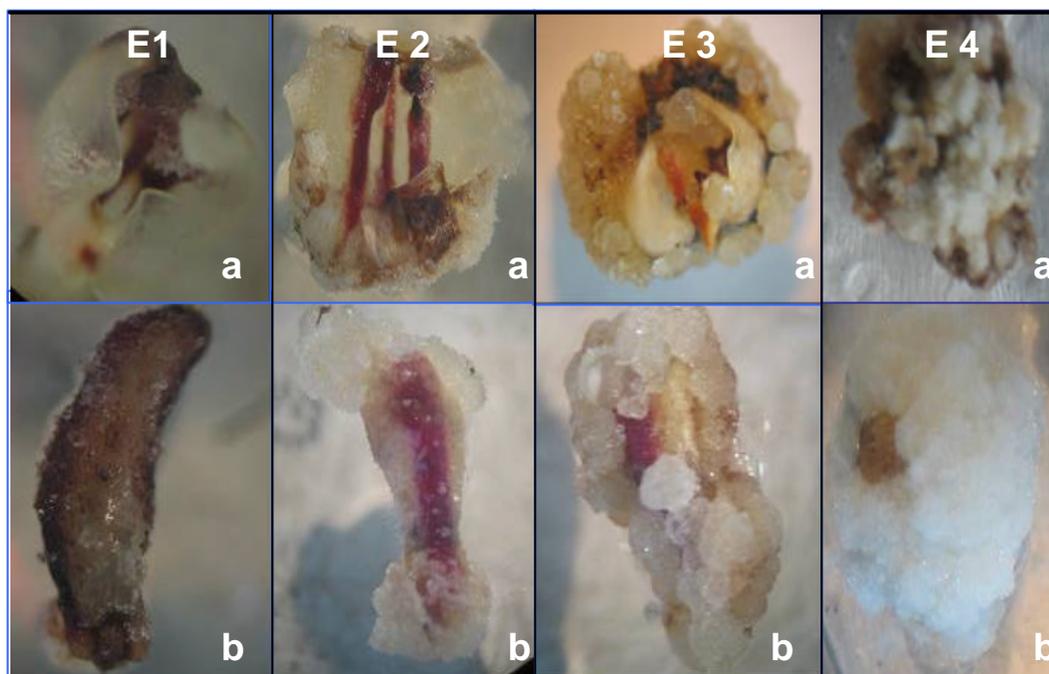


Figura 3. Estados de desarrollo del callo en explantes florales de cacao en el medio de inducción de callo (PCG). Las imágenes nominadas con la letra **a**, muestran el desarrollo de callo en pétalos, mientras que las nominadas con la letra **b**, muestran la formación de callo en los estaminoides.

Los datos obtenidos para el IC (Cuadro 2), indican diferentes respuestas por parte de los clones estudiados ante los tratamientos probados. De esta manera en la evaluación realizada a los 14 días de cultivo en el medio de inducción, el clon SCA6 tiene un desarrollo de callo mayor, estadísticamente significativo, con respecto a los otros dos clones, en los tratamientos en que se utiliza glucosa como fuente de carbono. Además los datos muestran diferencias estadísticamente significativas entre SCA6 y el clon UF273 en la mayoría de los tratamientos, pero no así entre el clon SCA6 y el PA169.

A los 28 días los tratamientos con glucosa a una concentración de 20 g/l continúan siendo favorables a SCA6, logrando el mejor IC (28,5), muy por encima de los restantes 47 tratamientos (Cuadro 2). Los otros dos clones tienen desarrollos estadísticamente similares durante este período de cultivo.

En los tratamientos con sacarosa, a los 14 días de cultivo, el desarrollo de callo en SCA6 es mayor; no obstante las diferencias no son significativas respecto a los otros dos clones. A los 28 días, PA169 tiene el mayor desarrollo, pero en la mayoría de los casos es significativamente similar a SCA6, y difiere de UF273, que es el genotipo en donde se observa el menor desarrollo de callo bajo estos factores.

Cuadro 2 Comparación de las medias del Índice de formación de callo (IC) de los tres genotipos estudiados en cada uno de los tratamientos realizados. Las medias fueron obtenidas al final del cultivo de los explantes en el medio PCG (Primary Callus Grow). Se utilizó la prueba de Tukey con un $\alpha=0.05$.

Tiempo en PCG	Fuente de carbono (g/l)	Explante	Pr>F	PA169 (IC)	SCA6 (IC)	UF273 (IC)		
14 días	Glucosa	20	Estaminoide	0,001	14,3 a	15 a	12,40 b	
			Pétalo	<0,0001	8,0 a	9,0 a	0,5 b	
		30	Estaminoide	0,0012	8,1 b	12,5 a	7,1 b	
			Pétalo	0,0982	7,2 ab	8,8 a	6,2 a	
		40	Estaminoide	<,0001	4,2 b	8,9 a	5,7 b	
			Pétalo	<,0001	10,7 a	11,5 a	6,6 b	
		50	Estaminoide	0,0003	6,4 c	9,6 a	7,9 b	
			Pétalo	0,002	10,2 a	9,1 a	6,2 b	
		Sacarosa	20	Estaminoide	<,0001	5,1 b	8,4 a	2,6 c
				Pétalo	0	0a	0a	0a
			30	Estaminoide	0,0553	8,9 b	9,6 a b	11,5 a
				Pétalo	0,2507	3,2 a	5,1 a	5,0 a
			40	Estaminoide	0,4292	11,4 a	12,9 a	10,7 a
				Pétalo	0,1954	5,7 a	6,7 a	4,9 a
	50	Estaminoide	0,0088	14,7 a	11,5 b	11,9 b		
		Pétalo	0,0234	9,5 a	7,5 ab	5,3 b		
28 días	Glucosa	20	Estaminoide	<,0001	11 b	28,5 a	13,8 b	
			Pétalo	0,0015	8,9 b	14,9 a	8,1 b	
		30	Estaminoide	0,0005	11,3 b	16,6 a	7 c	
			Pétalo	0,0049	7,2 b	11,5 a	7,5 b	
		40	Estaminoide	0,0022	5,8 b	14,5 a	6,9 b	
			Pétalo	<,0001	12,9 a	14,2 a	8 b	
		50	Estaminoide	0,0625	13,5 ab	17,1 a	12,1 b	
			Pétalo	0,0085	13,1 a	12,3 a	8,9 b	
		Sacarosa	20	Estaminoide	<,0001	23,7 a	15,6 a	5,0 b
				Pétalo	<,0001	8,6 a	9,4 a	4,9 b
			30	Estaminoide	<,0001	20,7 a	16,6 b	12,0 c
				Pétalo	0,002	9,9 a	7,1 ab	5,0 b
			40	Estaminoide	<,0001	18,9 a	15,2 b	10,7 c
				Pétalo	<,0001	12,6 a	8,2 b	4,9 c
	50	Estaminoide	0,0001	18,5 a	17,7 a	12,3 b		
		Pétalo	0,0001	12,2 a	10,6 a	5,3 b		

López – Baez y colaboradores (2001) probaron la eficiencia de diferentes fuentes de carbono en la inducción de callo, donde la sacarosa y la glucosa en concentraciones altas (entre 60 y 80 g/l), favorecieron el desarrollo del callo; no así la maltosa, que no produjo callogénesis. Comparativamente, los resultados de este trabajo también conducen a pensar que tanto la sacarosa como la glucosa, favorecen el proceso de inducción de callo. Sin embargo, las dos fuentes de carbono mencionadas, no actúan solas y su nivel de efectividad depende de la interacción con los otros factores, tal como lo indica el análisis factorial para la inducción de callo primario. La prueba de medias señala que las interacciones a cuarto nivel de los factores mencionados, son significativas ($<.0001$ para 14 días y 0.0063 para 28 días); existiendo una alta interacción entre el genotipo, el tipo de explante, la fuente de carbono y su concentración, dentro de cada uno de los períodos de tiempo en los que se trabajó (Cuadros 1 y 2, Anexo 1). Adu-Ampomah y colaboradores (1988), al cultivar explantes cotiledonares de cacao en medio MS, también encontraron que existen diferencias en la producción de callo, dadas por el efecto del medio, del genotipo y del explante.

Durante este período de cultivo se observaron diferentes tipos de callo, que se formaron tanto en pétalos como en estaminoides, los que varían en textura y en color. En la Figura 4 se observan ejemplos de los callos más representativos, y que fueron observados con mayor frecuencia.

Un tipo de callo no es exclusivo de un determinado explante o tratamiento, puede presentarse más de un tipo en un mismo explante como se observa en la Figura 4A. Similar observación fue realizada por Aguilar (1990) quien identificó dos tipos de callo en un mismo explante: el uno fue friable y cristalino distribuido en la superficie del explante, y el otro compacto, localizado en las partes donde se realizó el corte del explante.

La observación de los diferentes tipos de callo tuvo como propósito, diferenciar un tipo específico de callo que mostrara alguna relación o aproximación con el callo embriogénico. Sin embargo, esta etapa es muy temprana para detectar este tipo de callo.

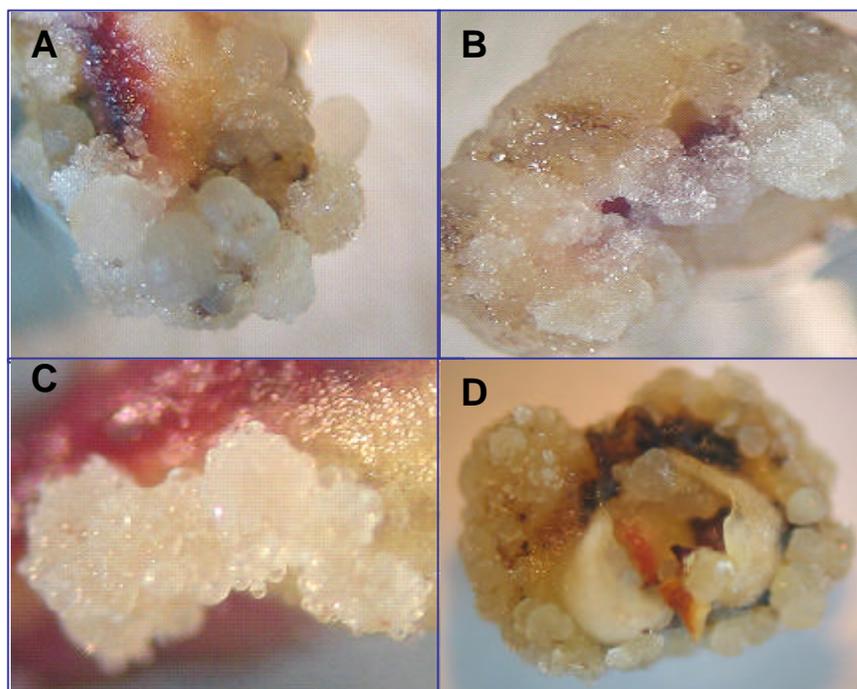


Figura 4. Tipos de callo primario. A. Explante de estaminoide con formaciones redondeadas de callo compacto y formaciones de callo cristalino; B. Estaminoide cubierto de callo cristalino fino; C. Estaminoide con callo cristalino grueso; D. Pétalo con callo cremoso semicompacto.

4.3. Desarrollo del callo secundario

A partir del cultivo de los explantes en el medio para crecimiento de callo secundario (SCG), y una vez que el explante fue cubierto completamente de callo, el desarrollo de dicho callo fue evaluado en función del tamaño. De esta manera, los explantes considerados dentro del estado E4a son menores a 2mm, en E4b se encuentran los callos con un tamaño entre 2-4mm; en E4c los que tienen de 4 a 6 mm, y en E4d los callos mayores a 6 mm.

Con base en los parámetros de desarrollo descritos con anterioridad, después de 14 días de cultivo en medio SCG (Secondary Callus Growth), se volvió a evaluar la evolución del callo para determinar la influencia de las citocininas BAP y Kinetina sobre esta variable; así como la interacción de los factores evaluados en el primer ensayo con las mencionadas citocininas.

El análisis de varianza (Cuadro 3, Anexo 1) indica que en los cultivos que estuvieron por 14 días en el medio PCG, y que posteriormente fueron transferidos al medio

SCG, existen interacciones de cuarto nivel entre el clon, el explante, la fuente de carbono, su concentración y las citocininas. La acción de las citocininas fue probada por López- Baez (1993), quien señala que el uso de una citocinina como la kinetina, mejora la respuesta del explante a la callogénesis al trabajar en conjunto con la auxina 2,4-D. Por su parte Aguilar (1990) obtuvo callogénesis y embriogénesis somática a partir de cotiledones de cacao utilizando BAP en conjunto con ANA. En *Cicer arietinum*, Sagare y colaboradores (1993) probaron el uso de BAP en combinación con 2,4-D, coincidiendo que su acción respecto a la callogénesis está ligada a otros factores como el tipo de explante, las condiciones del medio y también el genotipo.

Cuando los cultivos estuvieron por 28 días en el medio PCG, previos a su transferencia al medio SCG, las interacciones entre los factores del primer ensayo y las citocininas, dejan de ser significativas; no obstante se mantienen relaciones de tercer nivel entre el clon, el explante, la fuente de carbono y su concentración (Cuadro 4, Anexo 1). Lo anterior parece indicar que aparentemente la acción de la citocinina respecto a la formación de callo, se da en un determinado tiempo o momento, pasado éste, las citocininas dejan de influir sobre la callogénesis.

Respecto al desarrollo del callo en el segundo medio (SCG) (Cuadro 3 y 4), en general, tanto en presencia de sacarosa como de glucosa a diferentes concentraciones, en los dos períodos de cultivo, los genotipos SCA6 y PA169 alcanzaron un desarrollo significativamente similar entre ellos y mayor en comparación con UF273; con excepción del tratamiento en el cual los explantes permanecieron por 14 días en el medio PCG y la concentración de glucosa fue de 20 g/l, en donde UF273 tuvo un desarrollo similar a PA169 y mayor que SCA6. Cuando los explantes estuvieron por 28 días en el medio inicial los tratamientos con glucosa parecen favorecer un poco más a SCA6; mientras que los tratamientos con sacarosa favorecen ligeramente más a PA169, aunque las diferencias entre ellos no sean significativas. Los tratamientos con los más altos IC a 14 (23,4) y a 28 días (30,8) son de SCA6.

Cuadro 3. Comparación de las medias del Índice de formación de callo (IC) de los tres genotipos estudiados en tratamientos donde se prueba la interacción de los factores probados en el primer medio (PCG) con la fuente de citocinina adicionada al segundo medio (SCG); después de que los explantes fueron cultivados 14 días el medio PCG (Primary Callus Grow). Se utilizó la prueba de Tukey con un $\alpha=0.05$.

A 14 DIAS DE CULTIVO EN MEDIO PCG							
Fuente de carbono (g/l)	Explante	Fuente de citocinina	Pr>F	PA169 (IC)	SCA6 (IC)	UF273 (IC)	
Glucosa	20	Estaminoide	BAP	0,587	14,6 a	10,0 b	15,6 a
		Estaminoide	Kin	0,0006	15,0 a	10,0 b	18,0 a
		Pétalo	BAP	0,0177	8,2b	7,4 b	10,4 a
		Pétalo	Kin	0,3103	7,4 a	5,4 a	8,8 a
	30	Estaminoide	BAP	0,0077	13,6 b	21,6 a	11,0 b
		Estaminoide	Kin	0,0029	10,2 b	20,4 a	9,0 b
		Pétalo	BAP	0,1835	11,6 a	13,0 a	7,2 a
		Pétalo	Kin	0,0974	13,8 a	11,6 ab	7,2 b
	40	Estaminoide	BAP	0,008	8,2 b	17,2 a	8,8 b
		Estaminoide	Kin	<.0001	4,6 c	23,4 a	7,2 b
		Pétalo	BAP	0,037	14,2 a	19,4 a	9,2 b
		Pétalo	Kin	0,0012	14,6 a	17,6 a	7,6 b
	50	Estaminoide	BAP	0,0112	12,2 b	17,4 a	11,4 b
		Estaminoide	Kin	0,023	18,0 a	21,4 a	8,6 b
		Pétalo	BAP	0,01	13,0 a	11,6 a	8,8 b
		Pétalo	Kin	<.0001	14,8 a	12,8 a	7,2 b
Sacarosa	20	Estaminoide	BAP	0,002	12,7 a	15,4 a	7,4 b
		Estaminoide	Kin	0,0009	13,75 a	14,0 a	6,6 b
		Pétalo	BAP	0,021	8,6 a	8,4 a	5 b
		Pétalo	Kin	<.0001	11,0 a	10,4 a	1 b
	30	Estaminoide	BAP	0,1982	20,2 a	17,4 a	16,2 a
		Estaminoide	Kin	0,0002	19,0 a	21,0 a	10,2 b
		Pétalo	BAP	0,0189	11,0 a	5,0 b	5,0 b
		Pétalo	Kin	0,0023	11,4 a	10,6 a	6,0 b
	40	Estaminoide	BAP	0,0047	16,0 a	15,0 a	11,0 b
		Estaminoide	Kin	0,0016	16,8 a	19,2 a	8,8 b
		Pétalo	BAP	0,0003	11,4 a	8,6 b	4,6 c
		Pétalo	Kin	<.0001	12,4 a	8,4 b	4,2 c
	50	Estaminoide	BAP	0,005	19,6 a	20,0 a	11,0 b
		Estaminoide	Kin	0,0014	18,0 a	18,6 a	10,8 b
		Pétalo	BAP	0,0001	13,4 a	7,4 a	5,6 b
		Pétalo	Kin	<.0001	13,4 a	12,6 a	5,8 b

Cuadro 4 Comparación de las medias de Índice de formación de callo (IC) de los tres genotipos estudiados en tratamientos donde se prueba la interacción de los factores probados en el primer medio (PCG) con la fuente de citocinina adicionada al segundo medio (SCG); después de que los explantes fueron cultivados 28 días el medio PCG (Primary Callus Grow). Se utilizó la prueba de Tukey con un $\alpha=0.05$.

A 28 DIAS DE CULTIVO EN MEDIO PCG							
Fuente de carbono (g/l)	Explante	Fuente de citocinina	Pr>F	PA169 (IC)	SCA6 (IC)	UF273 (IC)	
Glucosa	20	Estaminoide	BAP	<.0001	29,4 a	30,8 a	15,2 b
		Estaminoide	Kin	0,7172	23,6 a	13,6 a	16,8 a
		Pétalo	BAP	0,0036	14,6 a	15,2 a	7,2 b
		Pétalo	Kin	0,015	11,0 ab	15,8 a	6,2 b
	30	Estaminoide	BAP	0,0108	14,0 ab	24,4 a	7,8 b
		Estaminoide	Kin	0,0025	16,6 b	26,2 a	9,4 b
		Pétalo	BAP	0,0141	16,8 a	11,8 ab	9,0 b
		Pétalo	Kin	0,0278	15,0 a	15,4 a	7,0 b
	40	Estaminoide	BAP	<.0001	7,2 c	21,8 a	10,4 b
		Estaminoide	Kin	0,0875	5,2 b	21,2 a	10,2 ab
		Pétalo	BAP	<.0001	17,4 b	27,8 a	10,0 c
		Pétalo	Kin	0,003	17,0 b	27,2 a	9,4 c
50	Estaminoide	BAP	0,1464	14,6 a	24,0 a	14,2 a	
	Estaminoide	Kin	0,5116	19,0 a	21,2 a	16,4 a	
	Pétalo	BAP	0,0064	19,4 a	20,6 a	8,0 b	
	Pétalo	Kin	0,1593	17,2 a	15,8 a	11,2 a	
Sacarosa	20	Estaminoide	BAP	0,0034	22,0 a	15,4 b	10,6 b
		Estaminoide	Kin	0,1942	20,6 a	17,6 a	8,6 a
		Pétalo	BAP	0,0035	10,0 a	7,6 a	4,2 b
		Pétalo	Kin	0,001	9,6 a	9,8 a	3,6 b
	30	Estaminoide	BAP	<.0001	29,4 a	21,4 b	12,6 c
		Estaminoide	Kin	<.0001	29,0 a	26,6 a	10,2 b
		Pétalo	BAP	0,0008	12,6 a	8,2 a	4,0 b
		Pétalo	Kin	0,0176	11,0 a	12,2 a	4,4 b
	40	Estaminoide	BAP	0,2986	16,4 a	23,4 a	14,6 a
		Estaminoide	Kin	0,0008	25,4 a	22,8 a	10,8 b
		Pétalo	BAP	0,6527	9,6 a	10,4 a	7,0 a
		Pétalo	Kin	0,0078	15,2 a	12,2 a	7,0 b
50	Estaminoide	BAP	0,0004	27,6 a	18,2 b	14,4 b	
	Estaminoide	Kin	0,0002	25,8 a	22,6 a	13,2 b	
	Pétalo	BAP	0,0003	13,0 a	11,2 a	7,4 b	
	Pétalo	Kin	0,613	12,2 a	10,4 a	6,4 a	

Tanto en el medio PCG como en el medio SCG, la fuente de carbono influye sobre el desarrollo del callo, y de la misma manera, este factor no trabaja solo, sino que tiene una acción conjunta con los otros factores del medio. Los resultados también permiten observar diferencias entre pétalos y estaminoides en el desarrollo de callo; teniendo en la mayoría de los casos los estaminoides un mejor desarrollo frente a los pétalos (Fig.5A). Estos resultados coinciden con los trabajos realizados por Alemanno (1995) y Li *et al.* (1998), en donde los estaminoides tuvieron mayor éxito en la formación de callo respecto a pétalos. No obstante, en algunas ocasiones, especialmente cuando se utilizó concentraciones más altas de azúcar, en el clon UF273, el desarrollo del callo de estaminoides fue menor respecto al desarrollo en los pétalos, es decir opuesto a la tendencia general de un mejor desarrollo en estaminoides. Lo que refleja nuevamente una respuesta genotípica.

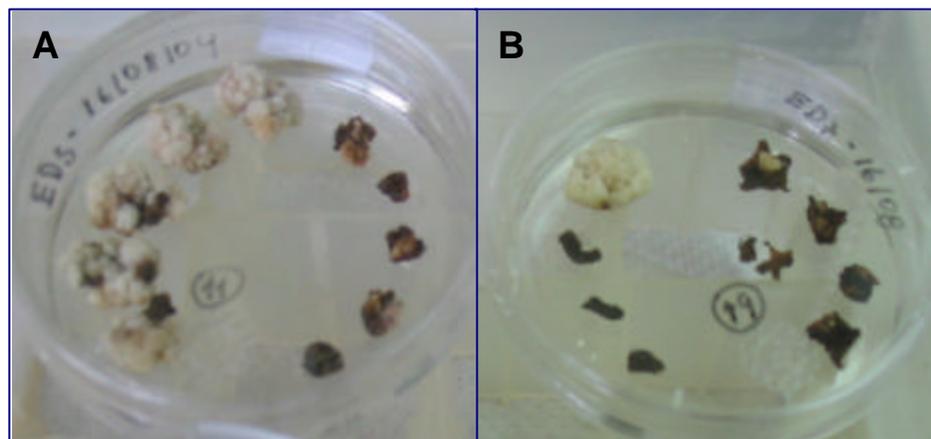


Figura 5. Desarrollo del callo en pétalos y estaminoides. A. Muestra el mayor desarrollo del callo de estaminoides ubicado a la izquierda de la caja petri, frente a los pétalos, ubicados a la derecha. B. Tratamiento en donde el desarrollo del explante de pétalo (derecha), es mayor que el del estaminoide (izquierda).

Esta respuesta puede deberse una vez más a la acción combinada y específica de los factores ya que ocurrió en todas las repeticiones de los tratamientos donde se dio este efecto. Estos estaminoides terminaron necrosándose alrededor del cuarto mes de cultivo (Fig. 5B).

También en esta etapa se observó diferentes tipos de callo, como: callo cristalino fino, disgregable (Fig 6A), callo cristalino grueso (Fig. 6B), callo cristalino con formaciones alargadas y ramificadas (Fig. 6C), callo con formaciones alargadas rectas (Fig. 6D). La coloración varía dependiendo de las etapas, ya que algunos callos adquieren en un determinado momento coloraciones más oscuras por la presencia de fenoles; en algunos casos esta coloración se mantiene, pero en otros se recupera la coloración más clara cuando una nueva capa de callo cubre el explante.

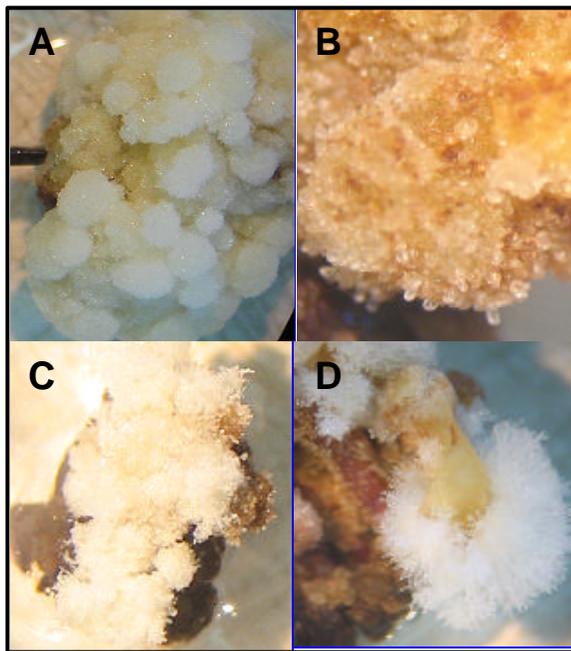


Figura 6. Tipos de callo secundario. A. Callo cristalino fino, B. Callo cristalino con formaciones globulares turgentes, en proceso de necrosamiento, C. Callo cristalino con formaciones alargadas y ramificadas, D. Callo cristalino con formaciones alargadas y rectas.

La presencia de formaciones con aspecto semejante al estado globular de la embriogénesis somática en el callo cristalino grueso (Figura 6B), llevó a suponer que este callo tenía aptitud embriogénica. No obstante, las observaciones posteriores permitieron determinar que el callo cristalino con formaciones alargadas y ramificadas mostrado en la Figura 6C, está más relacionado a la embriogénesis somática, pues fue observado en la mayoría de los callos donde ocurría la embriogénesis. Varios

autores han descrito los callos con aptitud embriogénica, sin embargo ninguno es coincidente en su descripción con los resultados mostrados en este trabajo o con otras descripciones (Kononowics *et al.*, 1984b; Adu-Ampomah *et al.*, 1988; Elhag *et al.*, 1988; Alemanno, 1995). Estas diferencias posiblemente se deban a que en cada trabajo se utilizaron metodologías diferentes para la producción de callo y también a que no existe un sistema de descripción uniforme para los diferentes tipos de callo.

4.4. Expresión de la embriogénesis somática

Cuando los cultivos fueron transferidos al medio ED (Embryo Development Médium), en algunos casos, después del primer mes, los callos experimentaron un necrosamiento no sincronizado (Fig. 7A), el cual se mantiene mientras los explantes permanecen en medio ED. Algunos explantes principalmente los estaminoides de los clones PA169 y SCA6, no llegaron a experimentar este proceso de necrosamiento y por el contrario continuaron un crecimiento prolífico, sin llegar a formar embriones somáticos.

El fenómeno de crecimiento excesivo de callo en embriones somáticos de cacao también fue observado por Alemanno *et al.* (1996), Pence *et al.* (1979) y Esan (1977) y parece ser el mayor cuello de botella para la formación de plantas en cacao, vía embriogénesis somática (Ampomah, 1988).

Por el contrario en los explantes donde hubo embriogénesis somática, los callos cesaron su crecimiento y tenían el aspecto de encontrarse en un proceso de necrosamiento o necrosados (Fig. 7B), presentando una coloración café oscura, resultado de la acumulación de compuestos polifenólicos (Alemano *et al.*, 1996). En otra especie como el café se ha observado el mismo proceso de detenimiento del crecimiento y oscurecimiento del callo, alrededor del cuarto o quinto mes de cultivo, como eventos que preceden la formación de embriones somáticos (Sreenath *et al.*, 1995; ²).

² Vásquez, N. 2004. Oscurecimiento del callo en embriogénesis somática en café. Turrialba, CR. CATIE. Comunicación personal.

Respecto a este evento, Quiroz-Figueroa *et al*, (2001), mencionan que estos compuestos fenólicos, pueden actuar como inductores o inhibidores de la embriogénesis somática. Por su parte Omokolo *et al.* (1997), respaldan esta afirmación al indicar que los fenoles como antioxidantes podrían representar un mejor sustrato para las enzimas oxidativas, cuya acción permite la liberación de las auxinas para promover la diferenciación embriogénica. Estas observaciones conducen a pensar que en cacao los compuestos fenólicos actúan como inductores indirectos de la embriogénesis somática; no obstante falta mayor investigación al respecto.

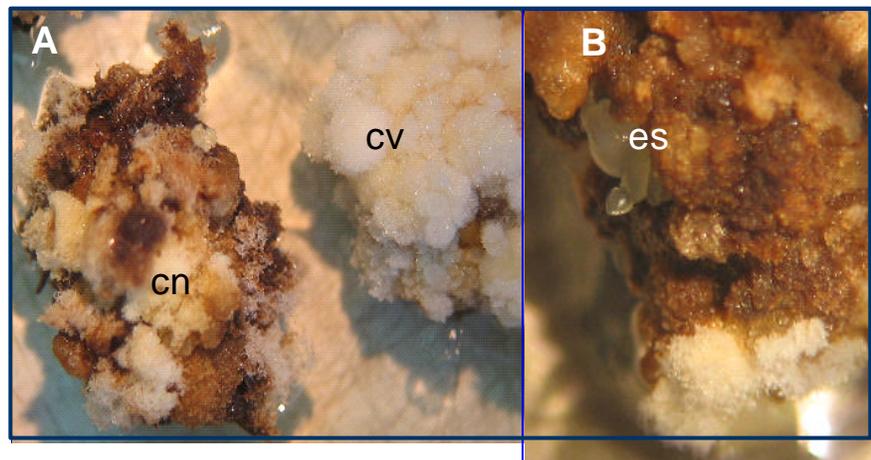


Figura 7. A. Dos callos de estaminoide en diferentes estados. Callo vivo (cv), callo en proceso de necrosamiento (cn). B. Callo de pétalo en proceso de necrosamiento de donde nace un embrión somático (es).

Se ha comprobado que virtualmente todos los explantes tienen la capacidad para formar callos *in vitro*; sin embargo, relativamente pocos explantes tienen la habilidad para producir callos embriogénicos (Litz y Jarret, 1991). Es así que aunque los explantes de los tres clones respondieron a la inducción de callo; sólo los explantes de pétalo de SCA6 conjuntamente con pétalos y estaminoides de UF273 fueron capaces de producir embriones somáticos. Es decir que a pesar de mantener mejor IC en la etapa de formación de callo, los estaminoides parecen ser menos aptos para la embriogénesis somática.

En este estudio la aparición de los primeros embriones somáticos en estado globular ocurrió en el medio ED, alrededor del segundo mes de iniciada la introducción del explante al inicio del cultivo de los clones. Este tiempo coincide con el citado por Li y colaboradores (1998), quienes trabajaron en cacao en condiciones similares pero utilizando como explantes solamente estaminoides.

El hecho de que los explantes de PA169 no hayan respondido a ninguno de los tratamientos, indica que la respuesta embriogénica está muy relacionada con el genotipo y su interacción con otros factores del cultivo, puesto que algunos cultivares pueden regenerarse fácilmente en un medio específico, mientras que otros cultivares no responden en el mismo medio (Litz, 1984).

Los trabajos de Adu-Ampomah *et al.* (1988), Elhag *et al.* (1988), Alemanno (1995), Li *et al.* (1998) señalan las diferencias genotípicas a la respuesta embriogénica. En otras especies como *Vitis vinifera*, *Sorghum bicolor*, *Cydonia oblonga*, *Foeniculum vulgare* y *Coffea arabica*, también se determinó que la respuesta embriogénica está basada en la relación del genotipo con diferentes factores del medio de cultivo (Emershad y Ramming, 1994; Gendy *et al.*, 1996; Fisichela *et al.*, 2000; Anzidei *et al.*, 2000).

La respuesta embriogénica de los cultivos iniciados en el medio PCG, fue evaluada después de cuatro meses, durante su permanencia en el medio ED. En esta etapa, también el análisis factorial corrobora la influencia de todos los factores en estudio. Además revela que estos no trabajan en forma separada, al determinar que existe una fuerte interacción de quinto nivel entre tiempo de cultivo en PCG, las citocininas, la fuente de carbono y su concentración, el tipo de explante y el genotipo (Cuadro 5, Anexo 1). Es decir que la inducción a la embriogénesis somática no depende de uno solo de estos factores, sino que es la resultante del trabajo en conjunto de todos ellos.

Es importante señalar que la prueba de medias no mostró diferencias significativas entre ninguno de los tratamientos en lo referente a frecuencia embriogénica (Cuadro 6, Anexo 1). Sin embargo, esto puede deberse en primera instancia a que relativamente pocos tratamientos produjeron embriogénesis (29 de 192), a que la

frecuencia embriogénica en cacao es baja y también debido a que se utilizaron pocas repeticiones por tratamiento (5).

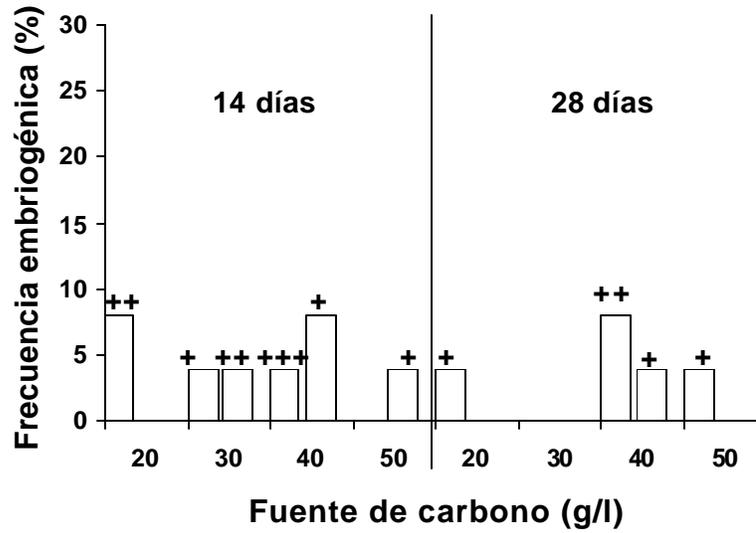
Las Figuras 8 y 9, permiten determinar el comportamiento de los genotipos SCA6 y UF273 en los tratamientos en que se dio una respuesta a la embriogénesis somática. A continuación se discuten los resultados más relevantes obtenidos a partir de estos datos.

Los tratamientos con Kinetina y BAP estimularon la embriogénesis somática en los explantes de pétalos tanto en UF273 como en SCA6; pero solo la BAP indujo la embriogénesis en estaminoides en el genotipo UF273. López-Baez *et al* (2001), resaltan la importancia de los reguladores del crecimiento en la inducción de la embriogénesis somática, donde el tipo de regulador de crecimiento, la concentración en el medio de cultivo y la duración de la fase de inducción juegan un papel importante.

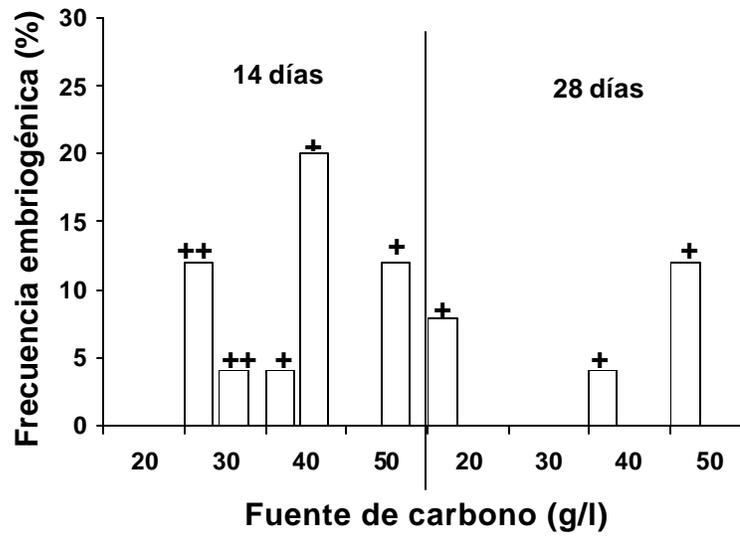
Los resultados del uso de la Kinetina y el BAP difieren en varios trabajos, así por ejemplo Figueira y Janick (1993) y Chatelet *et al.* (1992) obtuvieron embriogénesis somática directa de explantes de pétalos y nucelas al usar estas dos citocininas en medio Murashige y Skoog, mientras que Omokolo *et al.* (1997), obtuvieron embriones somáticos a partir de cotiledones en un medio libre de estas sustancias.

Sin embargo, no solamente las citocininas influyen sobre el nivel de expresión de la embriogénesis en cacao, ya que los resultados varían dependiendo también de otros factores, como el genotipo y las condiciones del medio, como lo indican Adu-Ampoma *et al* (1988), Elhag *et al* (1988), Sondahl *et al* (1993), Alemanno (1995), Li *et al* (1998), López-Baez *et al* (2001). De esta manera una vez más se observa que la respuesta embriogénica depende de la acción de más de un factor.

A. Kinetina



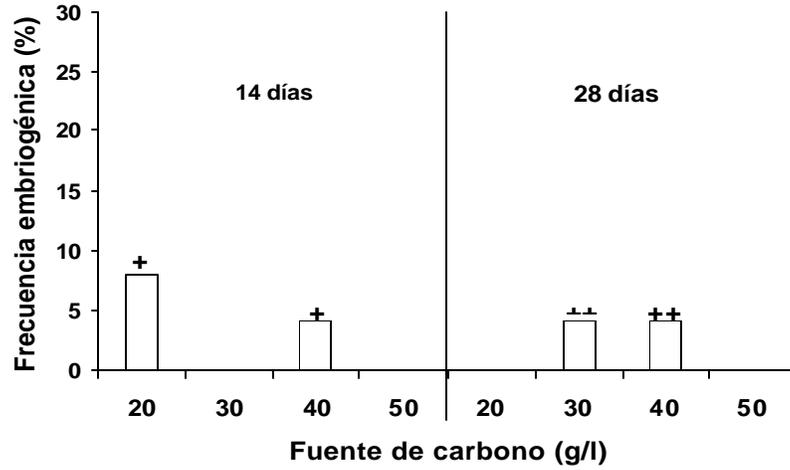
B. BAP



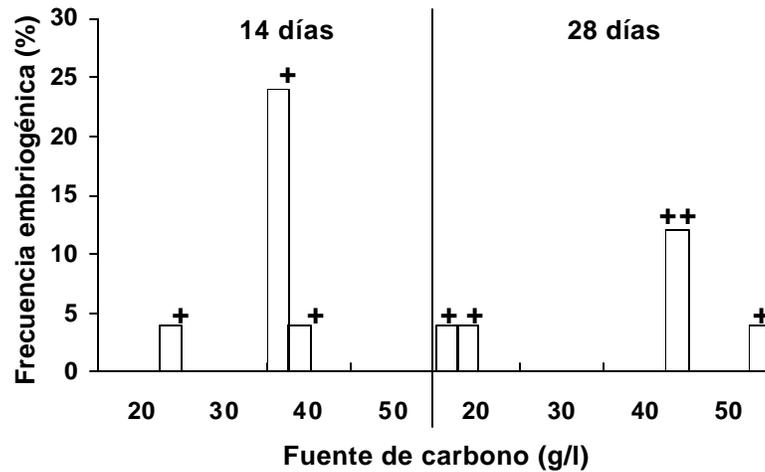
Pétalo - glucosa
 Pétalo - sacarosa

Figura 8. Respuesta embriogénica del pétalo y estaminoide del genotipo SCA6, cultivado en el medio SCG suplementado con Kinetina (A) y BAP (B). Las cruces sobre las barras señalan el promedio de embriones por explante (+=1-4, ++=5-10, +++=11 o más).

A. Kinetina



B. BAP



- Pétalo - glucosa
- Estaminoide - glucosa
- Estaminoide - sacarosa

Figura 9. Respuesta embriogénica del pétalo y estaminoide del genotipo UF273, cultivado en el medio SCG suplementado con Kinetina (A) y BAP (B). Las cruces sobre las barras señalan el promedio de embriones por explante (+ = 1-4, ++ = 5-10, +++ = 11 o más).

En los tratamientos donde se usó la BAP tanto en UF273, como en SCA6, se obtuvo las mejores frecuencias embriogénicas; no obstante, en algunos de los tratamientos en donde se utilizó la Kinetina, se produjo los mejores promedios de número de embriones por explante (5 en UF273 y 11 en SCA6). El uso de BAP en la fase de inducción de la embriogénesis, tanto en cacao como en otras especies, es más restringido respecto a la Kinetina, de la cual varios autores reportan buenos resultados como inductor de la embriogénesis en acción conjunta con una auxina, generalmente el 2,4-D (Alemanno, 1995; Litz *et al.*, 1995; Gendy *et al.*, 1996; Anzidei *et al.*, 2000 Lopez – Baez, *et al.*, 2001). Sin embargo, Maximova *et al.* (2002), recomiendan el uso de BAP como inductor de la embriogénesis somática en cacao.

Lu *et al.*, (1982), Wetherell (1984) y Fehér *et al.* (2003), señalan que las concentraciones altas de una fuente de carbono como la sacarosa pueden incrementar el potencial embriogénico de un callo. Es posible que la glucosa tenga este mismo efecto en cacao, ya que de acuerdo a los datos mostrados en la presente investigación, las mejores respuestas, tanto a nivel de frecuencia embriogénica (24% en UF273), como en el promedio del número de embriones por explante (superior a 11 en SCA6) fueron dadas por la glucosa a 40 g/l. No obstante, varios tratamientos con sacarosa a la misma concentración, dieron también buenos resultados, como por ejemplo una frecuencia embriogénica de 20% en SCA6 y un promedio del número de embriones por explante de 6,67 (Cuadro 6, Anexo 1). Es así como la mejor concentración de la fuente de carbono es de 40 g/l, no solamente porque está en más tratamientos exitosos que las otras concentraciones, sino también porque fue usada en los tratamientos con mejor porcentaje de embriogénesis, así como de mayor número de embriones por explante.

Por su parte Li *et al.*, (1998) con un protocolo similar al seguido en la presente investigación, utilizando como fuente de carbono del medio PCG la glucosa a 20 g/l y trabajando con estaminoides, obtuvieron en SCA6, una frecuencia embriogénica del 100% con un promedio de 45,7 embriones por explante (Cuadro 6, Anexo 1). Estos resultados difieren altamente de los obtenidos en este trabajo, ya que no se obtuvo respuesta alguna a la embriogénesis por parte de los estaminoides del mencionado

clon, y en pétalo la máxima frecuencia embriogénica obtenida a la misma concentración de glucosa, fue de 8%, con menos de 10 embriones por explante.

En cuanto al tiempo de permanencia en el medio inicial, los mejores tratamientos referentes a la frecuencia embriogénica están dados cuando el cultivo estuvo 14 días en PCG (24% para UF273 y 20% para SCA6). Sin embargo, el mejor promedio de número de embriones por explante para UF273 (6,67) se da cuando el cultivo estuvo por 28 días en PCG. Respecto a esto, Arnold *et al.* (2002), mencionan que la expresión de los genes que dan la señal específica para la embriogénesis somática aparece y decae varias veces durante este proceso, no obstante el disparador que causa la activación de estos genes en estados específicos, aún no es bien entendido. Entonces es posible que la señal que marca el inicio de la embriogénesis no se suceda una sola vez en el medio de inducción, sino que sea fluctuante y continúe por varios días. Sin embargo, en el caso del cacao es posible que la señal inductora sea más fuerte en los primeros 14 días, ya que son estos tratamientos los que respondieron en mayor número a la embriogénesis. En café, luego de cosechado el callo embriogénico, el explante continúa produciendo más callo embriogénico una o dos veces más (?).

También se observa que los explantes de pétalo respondieron a la embriogénesis en mayor número de tratamientos que los estaminoides. Estos datos difieren de los mostrados por Alemanno (1995) y Li *et al.* (1998), quienes obtuvieron mejores respuestas embriogénicas de los estaminoides frente a los pétalos.

Para determinar los mejores tratamientos para cada uno de los clones, es necesario considerar tanto la frecuencia embriogénica, como el número promedio de embriones por explante. De esta manera se puede considerar que el mejor tratamiento para UF273 es aquel en que se utiliza como explante el estaminoide, la sacarosa como fuente de carbono a una concentración de 40 g/l, con una permanencia de 28 días en el medio PCG y como fuente de citocinina la BAP. Tomando en consideración que la frecuencia embriogénica para este clon es de 12 % y su número promedio de

? Vásquez N. 2004. Producción de callo embriogénico en café. Turrialba, CR. CATIE. Comunicación personal.

embriones por explante es de 6,67, el producto de estas dos variables mostraría la posibilidad de obtener alrededor de 80 embriones de cada 100 explantes introducidos. Mientras que para SCA6 el mejor tratamiento estaría dado por los pétalos como explante, la BAP como fuente de citocinina y la glucosa a una concentración de 30 g/l con un tiempo de permanencia de 14 días en medio PCG. Bajo estas condiciones la frecuencia embriogénica es de 12 % y el promedio de embriones por explante es de 5,75; que da como resultado la posibilidad de obtener 69 embriones de 100 explantes sembrados. Como se observa, con excepción de la fuente de citocinina, ningún otro factor es coincidente entre los dos clones, por lo tanto no es posible seleccionar factores en forma separada, sino en conjunto (Cuadro 5).

Cuadro 5. Mejores resultados de la Frecuencia Embriogénica y el Número Promedio de embriones por explante logrados en los clones UF273 y SCA6.

Clon	Tiempo en PCG (días)	Azúcar	Azúcar (g/l)	Explante	Citocinina	Frecuencia embriogénica (%)	Promedio de embriones por explante	TOTAL
UF273	14	Glucosa	40	Pétalo	BAP	24	2,5	60
	28	Sacarosa	40	Estaminoide	BAP	12	6,67	80,04
	14	Glucosa	20	Pétalo	Kinetina	8	1,5	12
	28	Glucosa	30	Pétalo	Kinetina	4	5	20
SCA6	14	Sacarosa	40	Pétalo	BAP	20	3,17	63
	14	Glucosa	30	Pétalo	BAP	12	5,75	69
	28	Glucosa	50	Pétalo	BAP	12	1,67	20,04
	14	Sacarosa	50	Pétalo	BAP	12	1,33	15,96
	28	Glucosa	40	Pétalo	Kinetina	8	6	48
	14	Glucosa	40	Pétalo	Kinetina	4	11	44

Cabe mencionar que SCA6 había sido probado en trabajos anteriores, en los que se obtuvo diferentes resultados; por ejemplo Alemanno (1995), sólo logró una frecuencia embriogénica del 1,2%, trabajando en medio MS; mientras Li *et al.* (1998), trabajando con el mismo clon, con medios para especies maderables, obtuvo frecuencias de 98,3 y 100 % y números promedio de embriones por explante de 40,9 y 45,7. No se encontraron registros para UF273, aunque Li *et al.* (1998) trabajó con UF613, que mostró una frecuencia embriogénica de 45,6% y una media de embriones por

explante de 5,6. Estos resultados y los de la presente investigación remarcan el papel que juega el genotipo y su interacción con los otros que formaron parte del estudio.

4.5. Histología del callo

El conocimiento histológico de la embriogénesis somática del cacao, provee importante información para mejorar el proceso (Alemanno *et al.*, 1996). En las Figuras 10A y 10B se observa el corte histológico del callo en fase de expresión de la embriogénesis somática de un explante del cual se originaron embriones somáticos.

En algunos casos las células embriogénicas se encuentran en división formando posibles proembriones (Fig 10A). Por la distribución aislada de los grupos de células en división, se puede pensar que el embrión se origina de células individuales aisladas que forman un proembrión, que es el que da origen posteriormente al embrión. Estas observaciones concuerdan con lo descrito por Michaux-Ferrière y Schwendiman (1992), quienes indican que los embriones somáticos de cacao están formados por la división de una sola célula embriogénica aislada por un engrosamiento de su pared celular, conocida como célula madre. Sin embargo, Alemanno *et al.* (1996), consideran que el embrión somático de cacao se origina de un grupo de células embriogénicas, las cuales a su vez se derivan de una sola célula meristemática.

La Figura 10B presenta una célula aislada con características embriogénicas, similares a las citadas por Alemanno *et al.* (1996), la cual muestra un citoplasma denso, núcleos grandes con un nucleolo grande y conspicuo, fuertemente teñido de azul. Alrededor de esta célula se encuentran células que en su mayoría parecen estar necrosadas, con abundantes granos de almidón, lo que hace pensar que pudieron haber reunido en algún momento las características de una célula embriogénica. Sin embargo, como mencionan Dudits *et al.* (1995) la iniciación de la embriogénesis está restringida solo a ciertas células competentes del explante primario, las cuales tienen el potencial de activar los genes involucrados en la generación de células embriogénicas

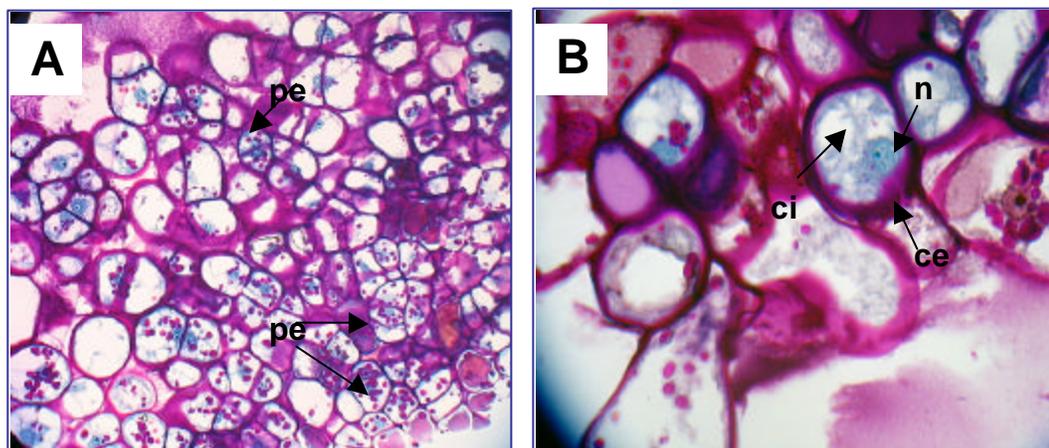


Figura 10. A. Corte histológico de callo mostrando posibles proembriones (pe), los cuales contienen gránulos de almidón, (25X). B. Posible célula embriogénica (ce); núcleo con nucleolo (n), citoplasma denso (ci) y la pared celular engrosada rodeando esta célula (100X).

Como se observa en las Figuras 10A y 10B, las células embriogénicas son restringidas en número y frecuentemente están rodeadas de grandes masas de células vacuoladas las cuales acumulan compuestos polifenólicos. Estudios histológicos más detallados podrían permitir encontrar las condiciones bajo las cuales estas células interesantes pudieran proliferar o bajo que condiciones la embriogénesis somática de una sola célula embriogénica pudiera ser favorecida (Alemanno *et al.*, 1996).

4.6. Desarrollo de callo y respuesta a la embriogénesis somática.

Una vez analizados por separado el desarrollo del callo y la respuesta embriogénica, se intentó determinar el grado de correlación entre el desarrollo de callo con la frecuencia embriogénica y el número de embriones por explante.

La dispersión de los puntos en los gráficos de correlación entre el desarrollo de callo con la frecuencia embriogénica y el desarrollo de callo con el número de embriones por explante tanto del clon SCA6 como UF273 (Fig. 11); indica que no existe correlación entre el desarrollo del callo al final del segundo subcultivo (medio SCG) con ninguno de los dos factores que miden la producción de embriones en cada tratamiento. Estos resultados están respaldados por la prueba de Correlación de Pearson.

A pesar de que no se muestre una correlación entre los factores mencionados, no se puede descartar por completo esta posibilidad, ya que como indican Alemanno (1995) y Sreenath *et al.*, (1995), para cacao y café, respectivamente, previo a la embriogénesis somática, se da el cese del crecimiento del callo. Es posible que este no se refleje en los datos trabajados, ya que fueron tomados hasta el mes y medio de cultivo, cuando todavía no se expresaba la embriogénesis somática.

Por otro lado, las observaciones visuales muestran que en instancias posteriores, a la embriogénesis somática durante el cultivo de los explantes en medio ED, el desarrollo del callo en los estaminoides, se mantiene en forma continua, de esta manera cuando una capa de callo empieza a envejecer, enseguida es recubierta por una nueva capa. Esto hace que algunos de los explantes de estaminoide, puedan llegar a alcanzar hasta más de 2 cm de diámetro alrededor de los 5 meses de cultivo. Cabe señalar que los estaminoides fueron los explantes con mayor éxito en la formación de callo y que aquellos explantes de estaminoide que produjeron embriones siguieron el proceso mencionado de necrosamiento y cese de crecimiento.

4.7. Ontogenia de la embriogénesis somática

Dodeman *et al.* (1997), mencionan que el desarrollo embrionario puede estar dividido en dos pasos principales: 1. La embriogénesis en su sentido estricto y 2. La maduración del embrión seguida de la germinación. De igual manera señala que existen varias similitudes entre la embriogénesis cigótica y la embriogénesis somática, con excepción de dos diferencias principales, como son la falta de la diferenciación del endospermo y el tejido suspensor. Estas similitudes pueden ser observadas a partir del estado globular desde donde la embriogénesis somática puede continuar los siguientes pasos en forma similar a la embriogénesis cigótica, es decir la manifestación de los estados globular tardío, triangular, de corazón, de torpedo y cotiledonar (Kononowics, 1984a; Dodeman *et al.*, 1997 y Arnold *et al.*, 2002).

En el presente trabajo fue posible observar varios de estos estados, los cuales son mostrados en las Figuras 12 y 13. Los estados globular, triangular (Fig. 12A) y corazón (Fig. 12B) fueron vistos por primera vez alrededor del segundo mes de cultivo en el medio ED.

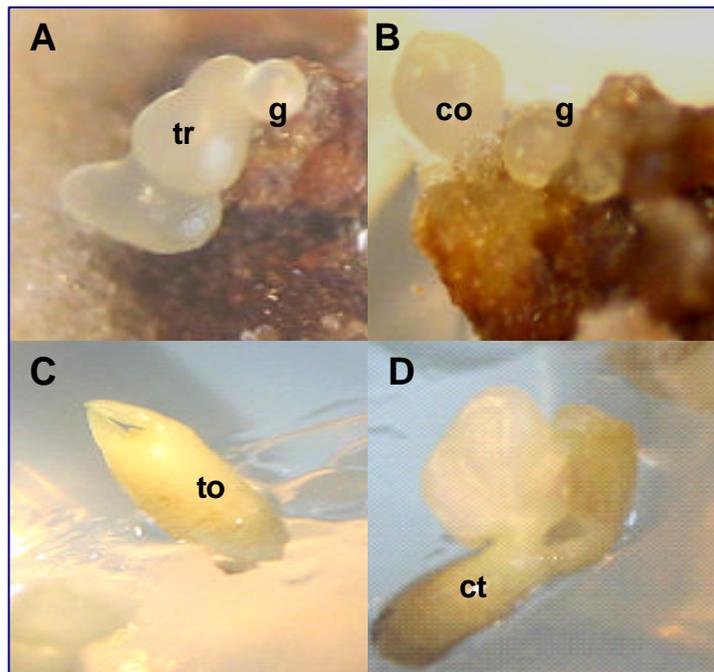


Figura 12. Estados ontogénicos de la embriogénesis somática del cacao. A. Estados globular (g) y triangular (tr). B. Estados corazón (co) y globular (go). C. Estado de torpedo (to). D. Estado cotiledonar (ct).

El embrión llegó al estado torpedo aproximadamente un mes después (Fig.12C), el cual evolucionó posteriormente al estado cotiledonar (Fig.12D). Como muestran las figuras 12A y 12B, la aparición de nuevos embriones, no es un proceso sincrónico por lo que en un mismo callo es posible observar varios estados de desarrollo del embrión.

Durante el estado de maduración los embriones somáticos sufren varios cambios morfológicos y químicos. Los órganos de almacenamiento, los cotiledones, se expanden concomitantemente con el depósito y almacenamiento de sustancias de reserva como proteínas, lípidos y almidones (Thomas, 1993). De esta manera en nuestros cultivos se pudo observar como los cotiledones del embrión adquirieron una coloración antocianica como resultado de la acumulación de compuestos como material de reserva necesarios para la posterior germinación (Fig. 13A). En la Figura 13B se presenta un embrión maduro, cercano a la germinación, cuyos cotiledones han

adquirido una coloración verde debido a la síntesis de pigmentos fotosintéticos, producto de la acción de la luz, presente en esta etapa.

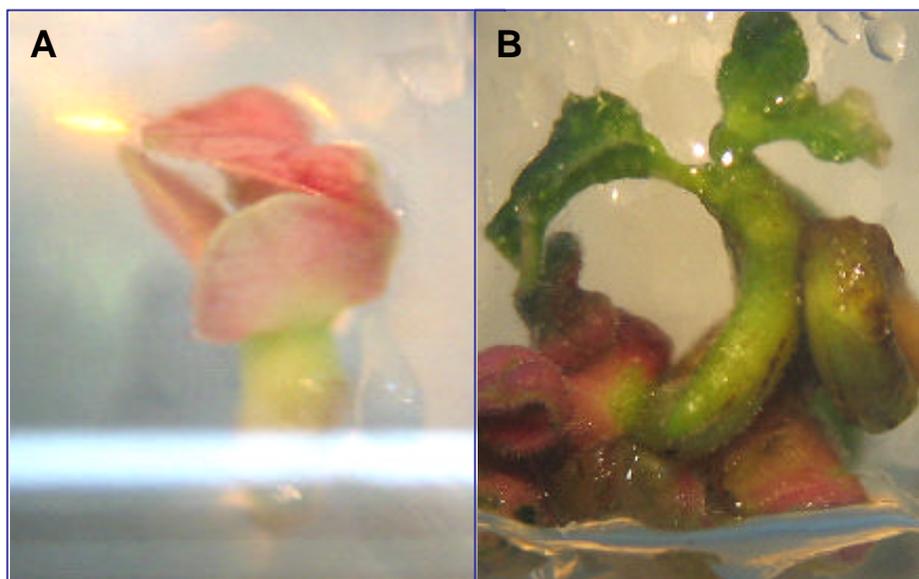


Figura 13. Estados de desarrollo durante la maduración del embrión somático. A. El embrión muestra una coloración antocianica. B. Embrión maduro con cotiledones verdes.

4.8. Embriogénesis secundaria

De acuerdo a Li *et al.* (1998) y Maximova *et al.* (2002), la embriogénesis secundaria de cacao, tiene el potencial de incrementar la producción de embriones y mejorar su calidad ayudando a la reducción de costos. Por este motivo se probó la factibilidad de producir embriones secundarios a partir de los embriones primarios ya obtenidos en los ensayos previos.

Las células embriogénicas, usualmente aquellas que se encuentran en las capas más externas de los embriones en desarrollo, continúan su división y forman nuevos centros meristemáticos, los cuales se rediferencian y producen embriones secundarios. Las células permanecen determinadas y continúan por una vía morfogénica la cual fue inducida en un estado más temprano (Ziv, 1999).

En el medio ED, aproximadamente después de un mes de cultivo se dio la diferenciación de embriones secundarios en estado globular pero solo sobre explantes extraídos de los embriones formados a partir de estaminoides del clon UF273 (Figura 14).

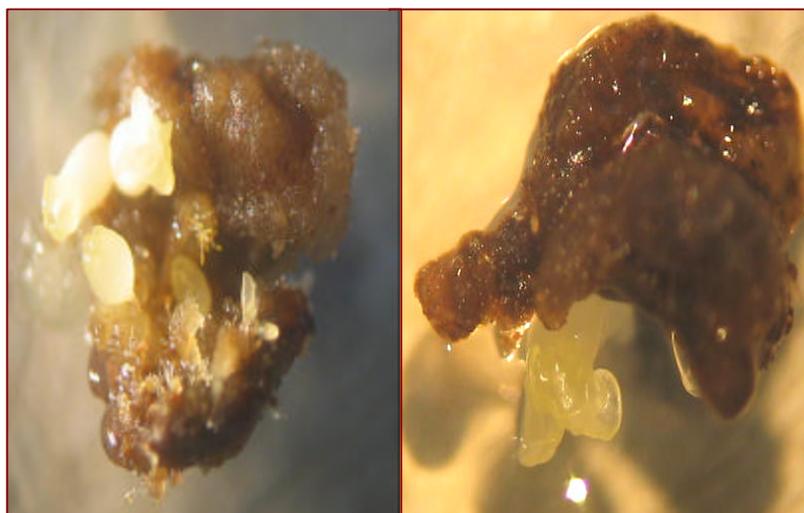


Figura 14. Callo formado a partir de embrión primario que produjo embriogénesis secundaria.

El tiempo de expresión de embriones secundarios es menor al de aparición de embriones primarios y coincide con lo manifestado por Maximova *et al.* (2002), quien además observó que también en la embriogénesis secundaria la respuesta es dependiente del genotipo. En este ensayo, la mayoría de embriones observados no resultaron totalmente normales, ya que presentaron más de dos cotiledones. Otros tipos de embriones somáticos secundarios que se observaron fueron los de origen adventicio, formados en diferentes partes del eje del embrión somático primario (Figuras 15A, B y C).

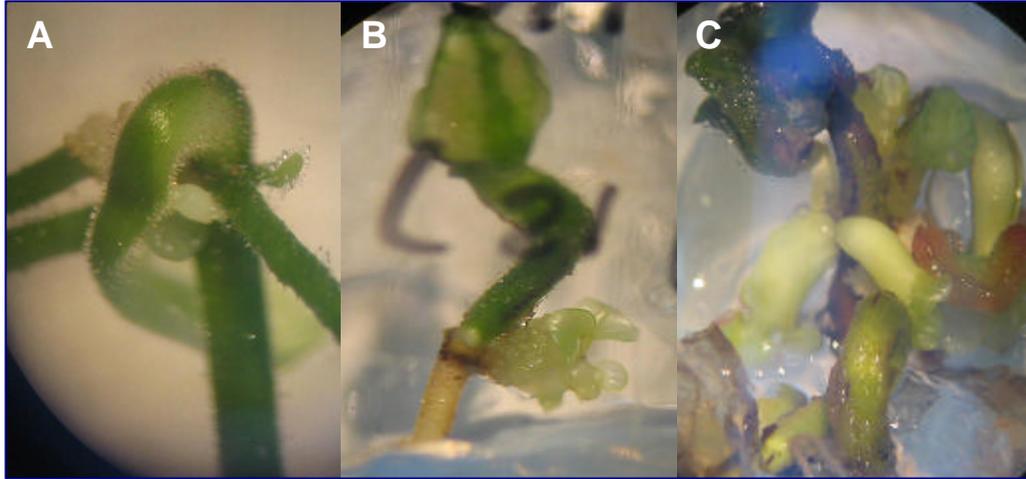


Figura 15. A. Embriogénesis secundaria adventicia sobre el nudo cotiledonar del hipocótilo, B. Embriogénesis secundaria en la unión del hipocótilo con la raíz, C. Embriones secundarios en diferentes partes del hipocótilo.

4.9. Clasificación morfológica de los embriones somáticos

Varios autores han clasificado los embriones somáticos, comparándolos en la mayoría de los casos con los embriones cigóticos y basándose en diferentes criterios como la coloración, forma, tamaño y/o número de cotiledones y eje o hipocótilo (Buchheim *et al.*, 1989; Chalupa, 1990; Alemanno, 1995; Alemanno *et al.*, 1997; Garin *et al.*, 1997; Li *et al.*, 1998).

Tomando en cuenta algunos de los criterios mencionados y con base en las observaciones propias, se clasificó a los embriones por el número y tamaño de los cotiledones, por la forma y presencia del eje, la ausencia de una formación bipolar, y embriones que presentan embriogénesis adventicia. De esta manera por el número de cotiledones, los embriones se clasifican en monocotiledonares (Fig.16A), dicotiledonares (Fig. 16B) y multicotiledonares (Fig. 16C); por el tamaño de los cotiledones se clasifican en embriones con cotiledones poco desarrollados (Fig. 16D), normales (Fig. 16E), y muy desarrollados (Fig. 16D).

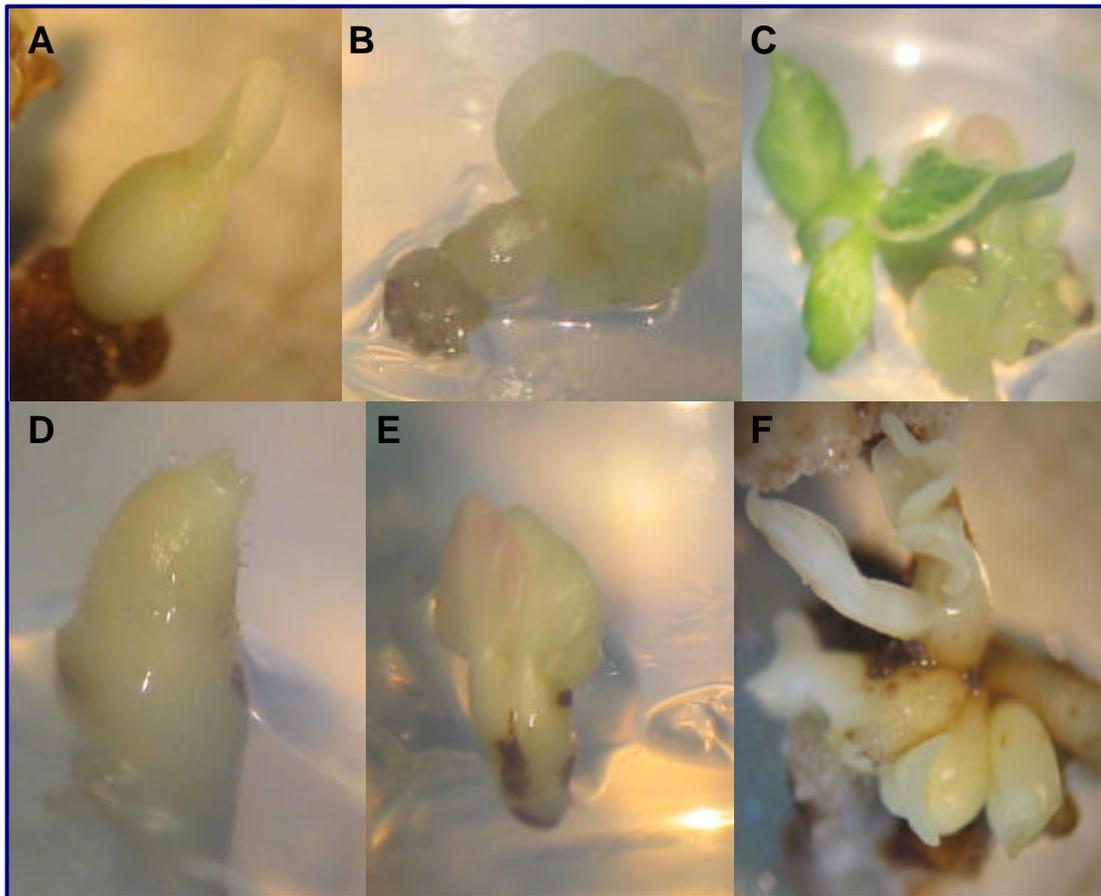


Figura 16. Clasificación de embriones somáticos por el número de cotiledones: A. Monocotiledonar, B. Dicotiledonar, C. Multicotiledonar. Clasificación por el tamaño de los cotiledones: D. Poco desarrollados, E. Normales y F. Muy desarrollados.

Por su eje los embriones somáticos se clasifican en normales con un solo eje, sin eje, con ejes fusionados y con ejes enrollados. Así, las Figuras 17A y 17B, muestran embriones con un solo eje en dos estados, la primera en un estado inmaduro y la segunda en estado de maduración. De igual manera, las Figuras 17C, 17D y 17E presentan embriones con ejes fusionados (morfología conocida como fasciación) en diferentes estados de desarrollo.

La Figura 17F presenta un embrión sin eje. Figura 17G hace notorio que el enrollamiento puede manifestarse desde etapas tempranas de desarrollo del embrión, la Figura 17H representa un embrión con eje enrollado en etapa de maduración.

Finalmente la Figura 17G presenta un embrión nominados como “tronco”, que histológicamente está constituido de tejido embrionario, sin embargo, morfológicamente, no presenta organización bipolar, ni eje, ni coltilodones (Alemanno, 1995).

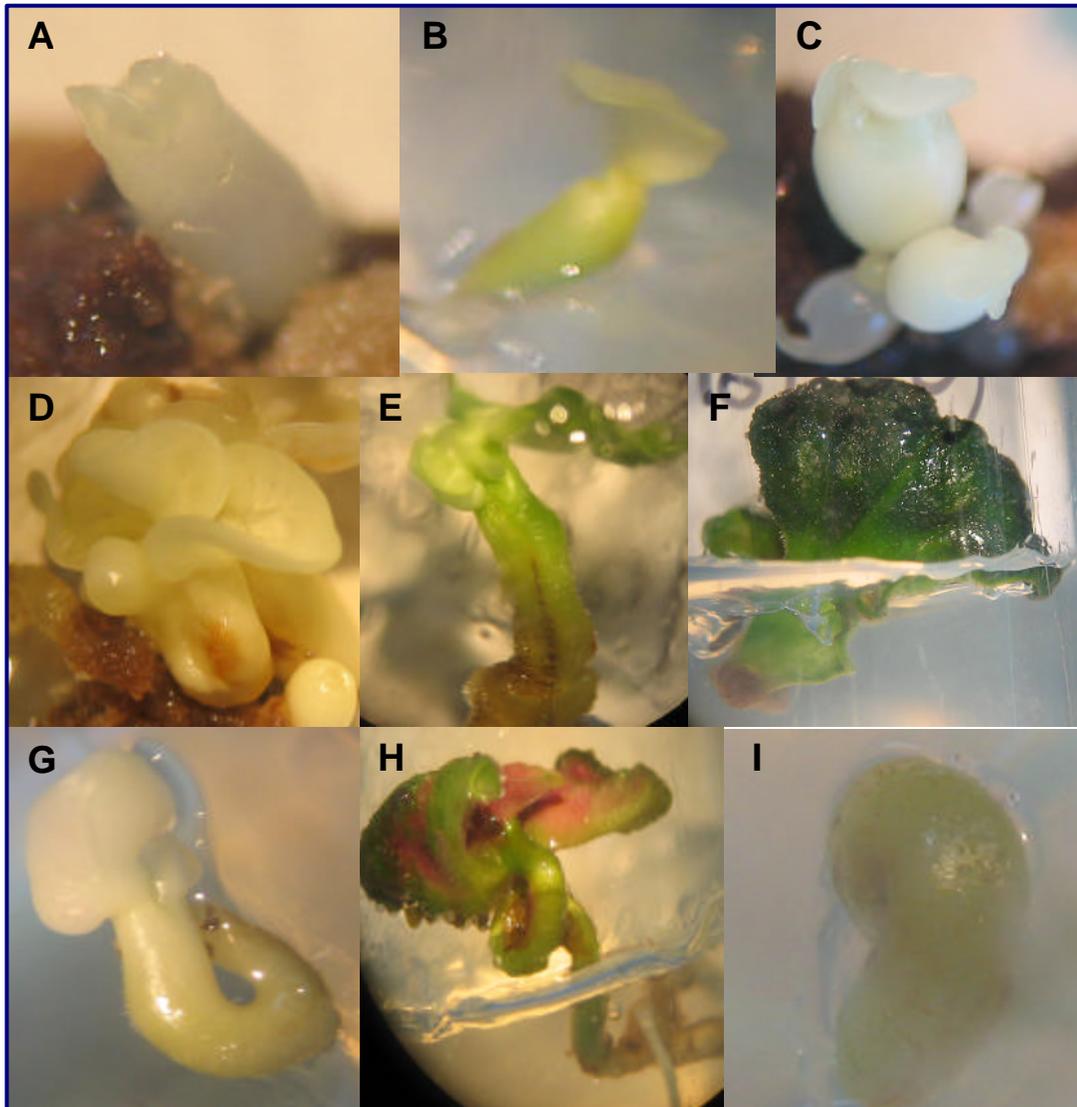


Figura 17. Tipos de embriones somáticos de acuerdo a su eje o hipocótilo. A. Embrión en estado de torpedo con un solo eje; B. Embrión en estado de maduración con un solo eje; C y D. Embriones con ejes fusionados, en estados tempranos; E. Embrión maduro con hipocótilo fusionado; F. Embrión sin eje; G Embrión con eje que comienza a enrollarse; H. Embrión maduro con hipocótilo enrollado. I. Embrión tronco.

Los embriones somáticos mantienen una similitud con los cigóticos; sin embargo tanto *in vivo* como *in vitro*, pueden ocurrir algunas anomalías en su desarrollo, por ejemplo la fasciación y la fusión de los cotiledones (Litz y Jarret, 1991). Los embriones que exhiben una clara bipolaridad con un eje y dos cotiledones son considerados normales; no obstante, embriones con diferente número de cotiledones pueden también entrar en esta categoría, mientras se respete la bipolaridad (Alemanno, 1995; Alemanno *et al.*, 1997). De acuerdo a estos criterios el número de embriones anormales en los cultivos fue elevado; sin embargo, las anomalías morfológicas no indican necesariamente un subsecuente desarrollo anormal de la planta; no obstante su desarrollo *in vitro* se da en proporción más baja que en los embriones normales (Carvalho, *et al.*, En prensa; Li *et al.*, 1998).

Durante el proceso de germinación de los embriones, también se presentan diferencias, como las que son mostradas en la Figura 18, donde A muestra un embrión somático en fase de germinación con un mayor desarrollo de la raíz frente al hipocótilo; mientras en la Figura 18B el desarrollo del hipocótilo es mayor. La habilidad que tienen estos tipos de embriones somáticos para la conversión a planta no ha sido evaluada todavía.

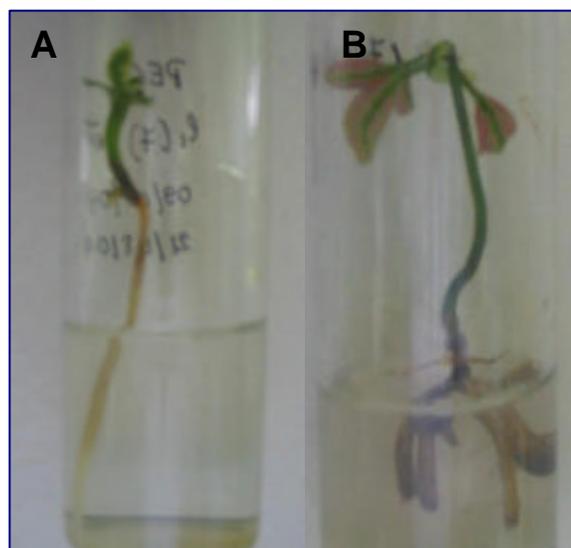


Figura 18. A. Embrión somático en germinación con mayor desarrollo de la raíz, B. Embrión somático con mayor desarrollo del hipocótilo.

Es importante resaltar que aunque la conversión de los embriones somáticos en planta y su posterior desarrollo, no formaron parte de los objetivos de esta investigación; en el transcurso de la misma, fue posible evaluar algunos aspectos referentes a estas etapas posteriores a la fase de expresión. Esto nos permitió conocer diferentes patrones del desarrollo de los embriones desde su expresión en el estado globular hasta la obtención de embriones con características propias de estado maduro y con potencial de germinación. De esta manera al final del estudio se mantienen alrededor de 100 embriones de los clones SCA6 y UF273 en medio para germinación (Fig. 19).



Figura 19. Recipientes conteniendo embriones en medio PEC (Primary Embryo Conversion Medium) para germinación.

El logro más importante de este trabajo fue la obtención de la conversión completa de un embrión somático en planta, producto de la germinación de un embrión del clon UF273, que en estados más tempranos presentaba una morfología atípica por presentar fasciación y enrollamiento de su eje. No obstante, una vez que se dio el proceso de germinación, el desarrollo de la planta hasta el momento se manifiesta normal. Actualmente esta plántula se encuentra en medio de cultivo para promover su desarrollo vegetativo y eventualmente puede ser transferida a la fase de

aclimatación (Fig. 20). La obtención de una plántula a partir de un embrión anormal, demuestra que a pesar de todas las dificultades que pueda tener la metodología de la embriogénesis somática, las expectativas futuras son promisorias.



Figura 20. Plántula en medio RD (Root Development and Maintenance Médium) camino a la aclimatación.

5. CONCLUSIONES

1. Un tratamiento de desinfección adecuado permite obtener niveles altos de asepsia y de sobrevivencia de los explantes florales de *Theobroma cacao*.
2. El Índice de callo revela mayor información en cuanto al desarrollo del callo para determinar niveles de respuesta a la callogénesis, más detallados para cada uno de los clones en estudio.
3. Todos los clones respondieron positivamente a la callogénesis, pero esta respuesta fue variable de acuerdo a cada uno de los tratamientos. Esto indica que la respuesta a la callogénesis es el resultado de la acción de varios factores como el medio de cultivo, la naturaleza del explante y los factores genéticos, que no trabajan solos sino que interactúan unos con otros.
4. Cada uno de los clones de *Theobroma cacao* tiene diferente aptitud a la embriogénesis somática ya que la respuesta a la misma está muy ligada al factor genético, el que en interacción con los factores del medio de cultivo y el tipo de explante produce respuestas específicas.
5. Pétalos y estaminoides de UF273 y sólo los pétalos de SCA6, en tratamientos específicos fueron competentes a la embriogénesis somática; pero ninguno de los explantes de PA169 respondió a la formación de embriones somáticos.
6. No existe una correlación directa entre el desarrollo del callo en sus primeras etapas con la respuesta embriogénica, por lo tanto la formación y nivel de desarrollo de callo en estas fases no es un indicador de la expresión de la embriogénesis somática. No obstante, la expresión de la embriogénesis somática si parece estar relacionada con el cese del crecimiento del callo en etapas posteriores y con la formación de compuestos fenólicos y posiblemente también con el tipo de callo.

7. Para determinar los mejores tratamientos, es necesario tomar en cuenta tanto la frecuencia embriogénica como el número promedio de embriones por explante. Los factores que dan la mejor respuesta para UF273 (28 días en PCG, sacarosa, 40g/l, estaminoide, BAP) y para SCA6 (14 días, glucosa, 30g/l, pet, BAP), son diferentes para cada clon, por lo tanto es necesario ajustar un protocolo específico para cada caso.
8. La frecuencia embriogénica lograda en esta investigación es baja por el momento; sin embargo, el solo hecho de haber obtenido embriones somáticos en materiales superiores abre la posibilidad de optimizar los protocolos y a futuro mejorar la escala de multiplicación.
9. Los resultados logrados, dan la posibilidad de obtener un mayor número de plantas para formar jardines clonales que permitan la propagación de materiales UF273 con resistencia a Monilia y SCA6 con resistencia a Escoba de Bruja, seleccionados en el Programa de Mejoramiento Genético del CATIE, ayudando a solucionar el problema de escasez de semilla de calidad superior para plantación.

6. RECOMENDACIONES

- Con base en los resultados obtenidos, se podría utilizar las variables que dieron lugar a los mejores tratamientos, para probar otros factores adicionales como fuente y concentración de auxinas.
- Definir menos variables para trabajar con menos tratamientos, pero aumentar el número de repeticiones por tratamiento para tener mayor fiabilidad de los resultados.
- Es importante realizar más estudios histológicos y seguimiento de los tipos de callo, para tener un mayor conocimiento referente a los procesos de la embriogénesis somática que permita ampliar el entendimiento de este fenómeno.
- Mantener el cultivo de los embriones obtenidos, para estudiar su potencial de germinación y hacer un seguimiento de este material para observar su conformidad genética.
- Continuar la investigación, tendiente a lograr un protocolo eficiente de multiplicación.

7. LITERATURA CITADA

- Adu-Ampomah, Y; Novak, F; Afza, R; Van Duren, M; Perea-Dallos, M. 1988. Initiation and Growth of Somatic Embryos of Cocoa (*Theobroma cacao*). *Café, Cacao, Thé* 32(3): 187-199
- Afrol news, 2002. http://www.afrol.com/es/Noticias2002/cma011_precioscacao.htm
- Aguilar, M.E. 1990. Obtención de Plantas de Cacao (*Theobroma cacao* L.) a partir de Microinjerto de Embriones Somáticos. Tesis MSc. Costa Rica, Turrialba, CATIE. 131 p.
- Aguilar, M. E.; Villalobos, V; Vásquez, N. 1992. Production of Cocoa Plants (*Theobroma cacao* L.) Via Micrografting of Somatic Embryos. *In Vitro Cell. Dev* 28: 15-19.
- Alemanno, L, 1995. Embryogenese Somatique du Cacaoyer *Theobroma cacao* L. Contraintes, Progres et Perspectives. Tesis Doctora. Montpellier, Francia, Universite Montpellier II. 194 p.
- Alemanno, L; M. Berthouly ; Michaux-Ferriere, M. 1996. Histology of Somatic Embryogenesis From Floral Tissues in *Theobroma cacao* L. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 46: 187-194.
- Alemanno, L; Berthouly, M; Michaux-Ferriere, M. 1997. A Comparision between *Theobroma cacao* L. Zygotic Embryogenesis and Somatic Embryogenesis from Floral Explants. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant*. 33:163-172.
- Anzidei, M; Bennici, A; Schiff, S; Tani, C; Mori, B. 2000. Organogenesis and somatic embryogenesis in *Foeniculum vulgare*: Histological observations of developing embryogenica callus. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 61: 69-79.
- Archibald, J. 1954. Culture in vitro of cambial tissue of cacao. *Nature* 173: 351-352.
- Arnold, S; Sabala, I; Bozhkov, P; Dyachok, J;Filonova, L. 2002. Developmental Pathways of Somatic Embryogenesis. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 69:233-249.
- Baker. W. 1891. The Chocolate Plant (*Theobroma cacao*) and its products. Jhon Wilson and son. Cambridge, England. 164p.
- Barahona, J. 1987. Manual del Cultivo del Cacao. INIAP. Quevedo, Ecuador. 109 p.
- Bertrand, B. 1987. Algunos Aspectos de la Reproducción por Microestacas del Cacao (*Theobroma cacao* L.). *Café Cacao, Thé* 31(3): 175 -182.
- Buchheim, J; Colburn, S; Ranch, J. 1989. Maturation of Soybean Somatic Embrios and the Transition to Plantet Growth. *Plant Physiology* 89: 768-775.
- Carvalho, E; Domingos, D; Santos, L; Machado, R; Aitken, W. s/f. Propagation of Cocoa Trees (*Theobroma cacao*, L.) via Somatic Embryogenesis. En prensa.

- Chalupa, V. 1990. Plant Regeneration by Somatic Embryogenesis from Cultured Inmature embryos of Oak (*Quercus robur* L.) and Linden (*Tilia cordata* Mill.). *Plant Cell Reports*. 9: 398-401.
- Chatelet, P; Dufour, M. 1990. Culture *in Vitro* du Cacaoyer (*Theobroma cacao* L.). Progrés Récent en Embryogenèse Somatique et Micropropagation. Cinquantenaire de la Culture *in Vitro*. France. Versailles. Les Colloques de l'INRA 51.
- Chatelet, P; Michaux Ferriere; Dublin, P. 1992. Potentialités Embryogènes du Nucelle du Tégumen Interne de Graines Inmatures de Cacaoyer (*Theobroma cacao* L.). *Compte-Rendus de l'Academie des Sciences*. no. 315: 55-62
- Dodeman, V; Ducreux, G; Kreis, M. 1997. Zygotic Embryogenesis *versus* Somatic Embryogenesis. *Journal of Experimental Botany* 48:1493-1509.
- Dos Santos, A; Machado, R. 1989. A Scanning Electron Microscope Study of *Theobroma cacao* L. Somatic Embryogenesis. *Ann Bot* no. 64: 293-296.
- Dudits, D; Gyorgyey, J; Bogre; L; Bako, L. (1995). Molecular Biology of the somatic embriogenesis. In. Thorpe TA. ed. *In Vitro Embryogenesis in Plants*. Kluwer Academia Publishers, Dordrecht, Boston, London. p 267-308.
- Dufour, M; Dublin, P. 1985. Algunos Datos acerca de la Multiplicación Vegetativa *in vitro* del Arbol del Cacao Cultivado (*Theobroma cacao* L.). *Café, Cacao Thé* 29(4): 235-244.
- Duham, K; Le Mercier N; Boxus, P. 1989. Donnés Nouvelles sur l'induction et le Development d'embryons Somatique chez *Theobroma cacao* L *Café, Cacao, Thé* 33(1): 9-14.
- Elhag, H; Whipkey, A; Janick, J. 1988. Factors Affecting Asexual Embryogenesis Via Callus in *Theobroma cacao* L. *Agril. Biol Sci*. 6(1): 31-43.
- Emershad, R; Ramming, D. 1994. Somatic Embryogenesis and Plant Development from Inmature Zygotic Embryos of Sedless Grapes (*Vitis vinifera* L.). *Plant Cells Reports* 14: 6 -12.
- Enjarlic, F; Carron, M; Lardet, L. 1988. Contamination of Primary cultures in Tropical Areas: The case of *Hevea brasiliensis*. *Acta Horticulturae* 225: 57- 77.
- Enríquez, G. 1983. *El Cultivo del Cacao*. CATIE, Turrialba, Costa Rica. 162 p.
- Enríquez, G; Soria, J. 1984. Mejoramiento Genético para Resistencia a Cinco Enfermedades del Cacao. Revisión de Literatura. CATIE, Turrialba, Costa Rica. 26 p.
- Eskes, B. 2001. Introductory Notes. *In*. *Ingenic. Proceedings of the International Workshop on new Technologies and Cocoa Breeding*. Malaysia. Ingenic.190 p.

- Essan, E. 1977. Tissue Culture Studies on Cocoa (*Theobroma cacao* L.) A Suplimentation of Current Research. Actes de la 5^a Conférence Internationales sur la Recherche Cacaoyere. Nigeria. Ibadan:116- 125.
- Etienne, H; Barry-Etienne, D; Vásquez, N; Berthouly, M. 1999. Aportes de la Biotecnología al Mejoramiento Genético del Café: El Ejemplo de la Multiplicación por Embriogénesis Somática de Híbridos F1 en América Central. *In*. Bertrand, B y Rapidel, B. Eds. Desafíos de la Caficultura en Centroamérica. Costa Rica, San José. Cirad, IICA. p 457-499.
- Fehér, A; Taras, P; Pasternak, P; Dudits, D. 2003. Transition of Somatic Plant Cell to an Embryogenic State. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 74: 201-228.
- Figueira, A.; Janick, J. 1993. Development of Nucellar Somatic Embrios of *Theobroma cacao*. *Acta Horticulturae* 336: 231-236.
- Fisichella, M; Silvi, E; Morini, S. 2000. Regeneration of Somatic Embryos and Roots from Quince Leaves Cultured on Media with Diferent Macroelement Composition. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 63: 101–107.
- Garin, E; Grenier, E; Grenier-De March, G. 1997. Somatic Embryogenesis in Wild Cherry (*Prunus avium*). *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 48: 83-91,
- Gendy, C; Séne, M; Van le, B; Vidal, J; Tran Thanh Van, K. 1996. Somatic Embriogénesis and Plant Regeneration in *Sorgum bicolor* (L) Moench. *Plant Cells Reports*. 15:900 – 904.
- Gray, D. 2000. Nonzygotic embryogenesis. *In* Trigiano, R; Gray, D. eds. *Plant Tissue Culture Concepts and Laboratory Exercises*. USA, CRC Press. P. 175 – 190.
- Guiltinan, M. 2000. Application of Tissue Culture to Propagation of Cacao. *Cacao Tissue Culture Protocol Book*. USA. Penn State University. 32p
- Hall, R; Collin, H. 1975. Initiation and Growth of Tissue Cultures of *Theobroma cacao*. *Annals of Botany* no. 39: 555-570.
- Han, K; Park, Y. 1999. Somatic Embryogenesis in Black Locust (*Robinia pseudoacacia* L.). *Somatic Embryogenesis in Woody Plants*. 5:149-161.
- Hardy, F. 1960. *Cacao Manual (English Edition)*. IICA. Turrialba, Costa Rica. 395 p.
- Hess, Oleen. 1990. *Cocoa Production Technology*. The Pan American Development Foundation Cocoa Rehabilitation & Development Project. 176 p
- ITC. 2001. *Cocoa; A Guide to Trade Practices*. International Trade Centre. Product and Market Development. Geneva. 180 p
- INGENIC, 2001. *Proceedings of the International Workshop on new Technologies and Cocoa Breeding*. Ingenic. 190 p.

- Janick, J; Whipkey, A. 1985. Axillary Proliferation of Shoots from Cotyledonary Nodal Tissue of Cacao. *Revista Theobroma*. 15(3): 125-131.
- Kohlenbach, H. 1985. Fundamental and Applied Aspects of In Vitro Plant Regeneration by Somatic Embryogenesis. *In*. Nijhoff, M; Junk, W. Eds. *In Vitro* Techniques, Propagation an Long Term Storage.
- Kononowickz, H; Kononowickz, A; Janick, J. 1984a. Asexual Embryogenesis Via Callus of *Theobroma cacao* L. *Z. Pflanzenphysiologie* 113: 347-358.
- Kononowickz, H; Kononowickz, A; Janick, J. 1984b. Response of Embryogenic Callus of *Theobroma cacao* L. To Gibberellic Acid and Inhibitors of Gibberellic Acid Synthesis. *Pflanzenphysiologie*. no. 113: 359-366.
- Krikorian, A; Berquam, D. 1969. *Revista Botánica*. 35p
- Krikorian, A. 1991. *Propagación clonal in vitro*. *In* CIAT. Roca, W; Mroginski; eds. Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones. Colombia. p 91-125.
- Lardet, L; Aguilar, M. E; Michaux-Ferrière, N; Berthouly, M. 1998. Effect of Strictly Plant-Related Factors on the Response of *Hevea brasiliensis* and *Theobroma cacao* Nodal Explants Cultured *In Vitro*. *In Vitro Cell. Dev. Biol* 34:34-40.
- Lass, R.1985. Diseases. Cocoa. London. Longman. p 265-365.
- Legrand, B; Cilas, C; Mississo, E. 1984. Comportamiento de los tejidos de *Theobroma cacao* L. Var. Amelonado, cultivados in vitro. *Café Cacao Thé*. 28(4): 245-250.
- Legrand, B; Mississo, E. 1986. Influencia de las Dimensiones de los Explantes y de los Reguladores de Crecimiento con Respecto al desarrollo de los tejidos de *Theobroma cacao* L. var. Amelonado, en cultivo in vitro. *Café Cacao Thé*. 30(4): 239-246.
- Leifert, C; Ritchie, J; Waites, W. 1991. Contaminants of Plant Tissue and Cell Culture. *World Journal of Mycrobiology and Biotechnology* 7: 452-469.
- León, Jorge. 2000. *Botánica de los Cultivos Tropicales*. Tercera edición. Costa Rica, San José, IICA. 678p
- Li, Z; Abdoulaye, T; Maximova, S; Guiltinan, M. 1998. Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration from Floral Explants of Cacao (*Theobroma cacao* L.) Using Thidiazuron. *In Vitro Cell. Dev. Biol.- Plant* 34: 293-299.
- Litz, R; Moon, P; Chavez, V. 1995. Somatic Embryogenesis from Leaf Callus Derived from the Mature Trees of the Cycad *Ceratozamia hildae* (Gymnospermae). *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 40:25-31
- Litz, R; Jarret, R.1991. Regeneración de Plantas en el Cultivo de Tejidos: Embriogéniesis Somática y Organogénesis. *In* CIAT. Roca, W; Mroginski; eds. Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones. Colombia. p 111-120.

- Litz, R. 1984. In vitro Somatic embryogenesis from nucellar callus of monoembryonic mango. *HortScience* 19: 715-717.
- López-Báez, O; Bollon, H; Eskes, A; Pétiard, V. 1993. Embryogenèse Somatique de cacaoyer (*Theobroma cacao* L.) à partir de Pièces Florales. *Compte- Rendus de L'Académie de Sciences* 316: 579-584.
- Lopez-Báez, O. 1996. Biotecnologías Aplicadas al Mejoramiento Genético y propagación de Cacao. *Actas de la IX Reunión Científica, Tecnológica, Forestal y Agropecuaria*. Mexico. Tabasco. Villa Hermosa. p 176-171
- Lopez-Báez, O; Esponda, G; Hernandez, V; Fraire, V; Evans, H; Fontanel, A. 1997. Progresos Recientes en el Clonamiento de Cacao. *Actas del Primer Congreso Venezolano del Cacao y su Industria*. Venezuela. Maracay. p 15-16.
- Lopez-Báez, O; Moreno, J; Pacheco, S. 2001. Avanzos en Propagación de Cacao-*Theobroma cacao*- por Embriogénesis Somática en México. *In Ingenic. Proceedings of the International Workshop on new Technologies and Cocoa Breeding*. Malaysia. Ingenic. p 163-176.
- Lu, C; Vasil, I; Ozias-Akins, P. 1982. Somatic Embryogenesis in *Zea mays* L. *Theor. Appl. Genet.* 62:109 - 112.
- Maxwell, P; Blake, J. 1984. Micropropagation of cacao through Axillary bud Culture. *Plant Tissue Culture and its Agricultural Applications* sep: 17-21.
- Maximova, S; Alemanno, L; Young, A; Ferriere, N; Traore, A; Gultinan, M. 2002. Efficiency, Genotypic Variability, and Cellular Origin of Primary and Secondary Somatic Embryogenesis of *Theobroma cacao* L. *In Vitro Cell. Dev. Biol-Plant* 38: 252-259.
- Mejía L. y Palencia G. 2000. Manejo Integrado del Cultivo de Cacao. Primera Edición. Bucaramanga. CO. Litografía y Tipografía La Bastilla Ltda. 24 p.
- Michaux – Ferrière, N; Schwendiman, J. 1992. Histology of somatic embryogenesis. *In* Datté, Y; Dumas, C; Gallais, A. eds. *Reproductive Biology and Plant Breeding*. Berlin, Springer-Verlag. p 247 -259.
- Moreno, L; Cadavid, S; Cubillos, G; Sánchez, J. 1983. Manual para el Cultivo del Cacao. Compañía Nacional de Chocolates. Colombia. 151 p.
- Mroginski, L; Roca, W. 1991. Establecimiento de cultivos vegetales in vitro. *In* CIAT. Roca, W; Mroginski; eds. *Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones*. Colombia. p 19-40.
- Mossu, G. 1990. Le cacaoyer. *Le Technicien d'agriculture Tropicale*. Editions Maisonneuve et Larose. 159 p.
- Murashige, T; Skoog, F. 1962. A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiol. Plant.* 15:473-497.

- Novak, F; Donini, B; Owusu, G. 1986. Somatic Embryogenesis and In Vitro Plant Development of Cocoa (*Theobroma cacao* L.). Proc Int Symp nuclear Techniques and In Vitro Culture for Plant Improvement. IAEA. Vienna. p 443-449.
- Omokolo, D; Ndzomo, G; Niemenak, N. 1997. Phenol Content, Acidic Peroxidase and IAA- oxidase During Somatic Embryogenesis in *Theobroma cacao* L. *Biologia Plantarum* 39(3): 337-347.
- Orchard, J; Collin, H; Hardwick, K. 1979. Culture of Shoot Apices of *Theobroma cacao*. *Physiología Plantarum* 47: 207-210.
- Organización Mundial de Comercio (OMC). 2001. Cacao Guía de Prácticas comerciales. Nuevas Iniciativas. Cacao Orgánico. OMC. Ginebra. Apéndice IV.
- Passey, A; Jones, O. 1983. Shoot Proliferation and Rooting in vitro of *Theobroma cacao* L. Type Amelonado. *Journal of Horticultural Science*. 58(4): 589-592.
- Pence, V; Hasegawa, M; Janick, J. 1979. Asexual Embryogenesis in *Theobroma cacao* L. *Journal of American Society for Horticultural Science* 104(2):145-148.
- Pence, V. 1980. Initiation and Development of Sexual Embryos *Theobroma cacao* L. In *Vitro Z Pflanzelphysiol.* 98: 1-14.
- Pence, V. 1995. Somatic Embryogenesis in Cacao (*Theobroma cacao*). *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. 30:455-467.
- Pereira, J. 2000. Perspectivas para el Control de las Enfermedades del Cacao. I Congreso Venezolano del Cacao y su Industria. p 93-109.
- Phillips, W. 2003. Nuevas Expectativas en la Lucha contra la Moniliasis del Cacao: origen, dispersión y diversidad genética del hongo *Moniliophthora roreri* e incorporación de fuentes de resistencia a través de mejoramiento genético. CATIE, Costa Rica. 3p
- Quiroz-Figueroa, F; Mendez-Zeel, M; Larque-Saavedra, A; Layola-Vargas. 2001. Picomolar Concentrations of Salicylates Induce Cellular Growth and Enhance Somatic Embryogenesis in *Coffea arabica* Tissue Culture. *Plant Cell Report*. 20: 679-684.
- Rivera, S. 2003. Respuesta de Clones de Cacao (*Theobroma cacao* L.) a la Embriogénesis Somática de Explantes Florales. Tesis Ingeniera. Cartago, Costa Rica, Instituto Tecnológico de Costa Rica. 64 p.
- Rosales, U. 2001. Estudio de la Variación Somaclonal en Clones de Híbridos F1 de Café (*Coffea arabica* L.) Regenerados de Suspensiones Celulares Embriogénicas. Tesis Mag. Sc. Costa Rica. Turrialba. Catie. 70p.
- Sagare, A; Suhasini, K; Krishnamurthy, K. 1993. Plant regeneration embryogenesis in chick pea (*Cicer arietinum* L.). *Plant Cell Reports*. 12: 652-655

- Sreenath, H; Shanta, H; Harinat, K; Naidu. 1995. Somatic Embryogenesis from Integument (perisperm) Cultures of Coffee. *Plant Cell Reports* 14: 670-673.
- Sondhal, M; Sereduk, T; Chen, Z; Bellato, C. 1989. Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration of Cacao Patent. Republic of South Africa.
- Sondahl, M; Liu, S; Bellato, C; Bragin, A. 1993. Cacao Somatic Embryogenesis. *Acta Horticulturae* 336: 245- 248.
- Soto, J; Herrera, S. 1985. Propagación. In. SARH. Manual sobre el Cultivo del Cacao. Tapachula, Chiapas, México. p 38-49
- Street, H. 1976. Cell Cultures: A tool in Plant Biology. *Cell Genetics in Higher Plants*. House Hungarian Academy of Sciences. Hungria Budapest. p 7-38.
- Thomas, T. 1993. Gene Expression during Plant Embryogenesis and Germination: An overview. *Plant Cell* 5:1401- 1410.
- Toxopeus, H. 1985. Botany, Types and Population, in *Cocoa*. London. Longman. p 11-37.
- Traore, A; Maximova, S; Gultinan, M. 2003. Micropropagation of *Theobroma cacao* L. using Somatic Embryo- Derived Plants. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant not Know*. p 1-7
- Urquhart, D. 1963. Cacao. Costa Rica. Turrialba. IICA. p 322.
- Van der Vossen, H. 1999. Strategies of Variety Improvement in Cocoa with Emphasis on Durable Disease Resistance. *In* Ingenic. Proceedings of the International Workshop on the Contribution of Disease Resistance to Cocoa Variety Improvement. Imprenta CIRAD. p 23-31.
- Vera, J. 1987 a. Botánica y Clasificación del Cacao. *In* Suarez, C. ed. Manual del Cultivo del Cacao. Programa Nacional del Cacao. Quevedo, INIAP. p 16-26.
- Vera, J. 1987. Material de Siembra y Propagación. *In* Suarez, C. ed. Manual del Cultivo del Cacao. Programa Nacional del Cacao. Quevedo, INIAP. p 16-26.
- Wang, Y; Janick, C. 1984. Inducing Precocious Germintion in Asexual Embryos of Cacao. *Hort.Sciences* 19: 839-841.
- Wetherell, D. 1984. Enhanced Adventive Embryogenesis Resulting from Plasmolysis of cultured wild carrot cells. *Plant Cell Tiss. Org Cult.* 3:221-227.
- Wilkinson, M. 2001. The Aplications and Constrains of New Tecnologies in Plant Breeding. *In* Ingenic. Proceedings of the International Workshop on new Technologies and Cocoa Breeding. Ingenic. p 12-23
- Wood, G; Lass, R. 1985. *Cocoa*, New York, Longman Group Limited. Cuarta edición 620 p.

- Wood, G; Lass, R. 1987. Cocoa, New York, Longman Scientific & Technical and John Wiley & Sons. 620 p.
- Young, A; Miller, C; Antunez, G; Swanson, J; Pishak, S; Maximova,S; Gultinan, M. 2003. Cacao Tissue Culture Protocol Book. Versión 1.4. Pennsylvania State University. 32 p.
- Ziv, M. 1999. Developmental and Structural Patterns of *In Vitro* Plants. *In* Soh, W; Bhojwani, S. eds. Morphogenesis in Plant Tissue Culture. Netherlands, Kluwer Academic Publisher. p 235-249.

ANEXOS

ANEXO 1

CUADROS

Cuadro 1. Análisis de varianza para la inducción de callo a los 14 días de cultivo en medio PCG, donde es posible observar el nivel de interacción de los factores en estudio: Genotipo (Gen), explante (Exp), fuente de carbono (Car) y su concentración (Con).

Fuente de variación	GL	Cuadrado medio	F calculado	Pr > F
Gen	2	10.36142765	47.21	<.0001
Car	1	15.22683091	69.38	<.0001
Gen*Car	2	2.70190660	12.31	<.0001
Con	3	13.88367314	63.26	<.0001
Gen*Con	6	1.95886859	8.93	<.0001
Car*Con	3	19.03395107	86.73	<.0001
Gen*Car*Con	6	0.87222229	3.97	0.0007
Exp	1	64.27547538	292.88	<.0001
Gen*Exp	2	1.86250387	8.49	0.0002
Car*Exp	1	22.83388640	104.05	<.0001
Gen*Car*Exp	2	2.76695749	12.61	<.0001
Con*Exp	3	11.03272934	50.27	<.0001
Gen*Con*Exp	6	0.32436200	1.48	0.1840
Car*Con*Exp	3	2.93872266	13.39	<.0001
Gen*Car*Con*Exp	6	1.67472141	7.63	<.0001

Cuadro 2. Análisis de varianza para la inducción de callo a los 28 días de cultivo en medio PCG, donde es posible observar el nivel de interacción de los factores en estudio: Genotipo (Gen), explante (Exp), fuente de carbono (Car) y su concentración (Con).

Fuente de variación	GL	Cuadrado medio	F calculado	Pr > F
Gen	2	37.57583695	120.90	<.0001
Car	1	0.02167012	0.07	0.7919
Gen*Car	2	14.36208272	46.21	<.0001
Con	3	2.18627897	7.03	0.0001
Gen*Con	6	0.90904164	2.92	0.0083
Car*Con	3	2.85284353	9.18	<.0001
Gen*Car*Con	6	1.00722884	3.24	0.0040
Exp	1	52.71524892	169.61	<.0001
Gen*Exp	2	1.20058301	3.86	0.0217
Car*Exp	1	17.45286926	56.15	<.0001
Gen*Car*Exp	2	1.77812569	5.72	0.0035
Con*Exp	3	2.55296755	8.21	<.0001
Gen*Con*Exp	6	1.07686064	3.46	0.0024
Car*Con*Exp	3	2.80789647	9.03	<.0001
Gen*Car*Con*Exp	6	0.94697435	3.05	0.0063

Cuadro 3. Análisis de varianza para la inducción de callo en el medio SCG, después del cultivo durante 14 días en medio PCG. En el cuadro es posible observar el nivel de interacción de los factores en estudio: Genotipo (Gen), explante (Exp), fuente de carbono (Car) y su concentración (Con), más la fuente de citocinina (Cit).

Fuente de variación	GL	Cuadrado medio	F calculado	Pr > F
Gen	2	31.40048205	148.10	<.0001
Car	1	1.49459267	7.05	0.0083
Gen*Car	2	6.04517826	28.51	<.0001
Con	3	4.02585991	18.99	<.0001
Gen*Con	6	1.87762611	8.86	<.0001
Car*Con	3	0.37202314	1.75	0.1554
Gen*Car*Con	6	4.45830306	21.03	<.0001
Exp	1	56.45539258	266.28	<.0001
Gen*Exp	2	4.22919155	19.95	<.0001
Car*Exp	1	11.78175695	55.57	<.0001
Gen*Car*Exp	2	0.11167509	0.53	0.5910
Con*Exp	3	2.57375399	12.14	<.0001
Gen*Con*Exp	6	0.81351342	3.84	0.0010
Car*Con*Exp	3	2.73915204	12.92	<.0001
Gen*Car*Con*Exp	6	0.30894139	1.46	0.1918
Cit	1	0.00454756	0.02	0.8836
Gen*Cit	2	2.15212232	10.15	<.0001
Car*Cit	1	0.29289418	1.38	0.2406
Gen*Car*Cit	2	0.58765705	2.77	0.0638
Con*Cit	3	0.30511995	1.44	0.2309
Gen*Con*Cit	6	0.19552761	0.92	0.4787
Car*Con*Cit	3	0.25321547	1.19	0.3117
Gen*Car*Con*Cit	6	0.75606813	3.57	0.0019
Exp*Cit	1	0.16471163	0.78	0.3786
Gen*Exp*Cit	2	0.13368113	0.63	0.5329
Car*Exp*Cit	1	0.82900943	3.91	0.0487
Gen*Car*Exp*Cit	2	0.65264568	3.08	0.0472
Con*Exp*Cit	3	0.91138530	4.30	0.0053
Gen*Con*Exp*Cit	6	0.49825006	2.35	0.0305
Car*Con*Exp*Cit	3	0.12221088	0.58	0.6308
Gen*Car*Con*Exp*Cit	6	0.27722103	1.31	0.2526

Cuadro 4. Análisis de varianza para la inducción de callo en el medio SCG, después del cultivo durante 28 días en medio PCG. En el cuadro es posible observar el nivel de interacción de los factores en estudio: Genotipo (Gen), explante (Exp), fuente de carbono (Car) y su concentración (Con), más la fuente de citocinina (Cit).

Fuente de variación	GL	Cuadrado medio	F calculado	Pr > F
Gen	2	62.8406482	108.65	<.0001
Car	1	6.4951440	11.23	0.0009
Gen*Car	2	7.8499998	13.57	<.0001
Con	3	1.7871209	3.09	0.0271
Gen*Con	6	2.7012053	4.67	0.0001
Car*Con	3	2.4594353	4.25	0.0057
Gen*Car*Con	6	0.2113542	0.37	0.9007
Exp	1	78.8680629	136.36	<.0001
Gen*Exp	2	1.1510372	1.99	0.1381

Car*Exp	1	33.6056601	58.10	<.0001
Gen*Car*Exp	2	4.0215320	6.95	0.0011
Con*Exp	3	5.6588873	9.78	<.0001
Gen*Con*Exp	6	0.8121764	1.40	0.2117
Car*Con*Exp	3	4.4682792	7.73	<.0001
Gen*Car*Con*Exp	6	0.7067207	1.22	0.2940
Ci t	1	0.2271898	0.39	0.5312
Gen*Ci t	2	0.1245006	0.22	0.8064
Car*Ci t	1	1.3843878	2.39	0.1227
Gen*Car*Ci t	2	1.4687211	2.54	0.0802
Con*Ci t	3	1.1832178	2.05	0.1070
Gen*Con*Ci t	6	1.1099451	1.92	0.0767
Car*Con*Ci t	3	1.1382778	1.97	0.1183
Gen*Car*Con*Ci t	6	0.6275452	1.08	0.3707
Exp*Ci t	1	0.0686739	0.12	0.7306
Gen*Exp*Ci t	2	0.0456476	0.08	0.9241
Car*Exp*Ci t	1	0.0006149	0.00	0.9740
Gen*Car*Exp*Ci t	2	0.6746965	1.17	0.3125
Con*Exp*Ci t	3	1.0242222	1.77	0.1522
Gen*Con*Exp*Ci t	6	0.2673267	0.46	0.8362
Car*Con*Exp*Ci t	3	0.3205348	0.55	0.6456
Gen*Car*Con*Exp*Ci t	6	0.1971962	0.34	0.9150

Cuadro 5. Análisis de varianza de la respuesta embriogénica ante los diferentes tratamientos dados por la combinación de los factores genotipo (Gen), explante (Exp), fuente de carbono (Car) y su concentración (Con), más la fuente de citocinina (Cit).

Fuente de variación	GL	Cuadrado medio	F calculado	Pr > F
Gen	2	0.13634812	11.12	<.0001
Car	1	0.04779136	3.90	0.0487
Gen*Car	2	0.01754837	1.43	0.2396
Con	3	0.04018913	3.28	0.0205
Gen*Con	6	0.02167669	1.77	0.1028
Car*Con	3	0.01800155	1.47	0.2218
Gen*Car*Con	6	0.04138090	3.38	0.0027
Exp	1	0.24997155	20.39	<.0001
Gen*Exp	2	0.14347579	11.70	<.0001
Car*Exp	1	0.08627747	7.04	0.0081
Gen*Car*Exp	2	0.04113878	3.36	0.0354
Con*Exp	3	0.01312071	1.07	0.3609
Gen*Con*Exp	6	0.00799117	0.65	0.6886
Car*Con*Exp	3	0.00950837	0.78	0.5077
Gen*Car*Con*Exp	6	0.05190922	4.23	0.0003
Ti e	1	0.02348272	1.92	0.1667
Gen*Ti e	2	0.00764907	0.62	0.5361
Car*Ti e	1	0.00280906	0.23	0.6323
Gen*Car*Ti e	2	0.07174973	5.85	0.0030
Con*Ti e	3	0.01503873	1.23	0.2989
Gen*Con*Ti e	6	0.01186907	0.97	0.4456
Car*Con*Ti e	3	0.02084432	1.70	0.1655
Gen*Car*Con*Ti e	6	0.07127676	5.81	<.0001
Exp*Ti e	1	0.05214768	4.25	0.0395
Gen*Exp*Ti e	2	0.01356055	1.11	0.3313
Car*Exp*Ti e	1	0.01641434	1.34	0.2476
Gen*Car*Exp*Ti e	2	0.04470312	3.65	0.0265
Con*Exp*Ti e	3	0.02112902	1.72	0.1606
Gen*Con*Exp*Ti e	6	0.01706153	1.39	0.2150
Car*Con*Exp*Ti e	3	0.03233645	2.64	0.0486
Gen*Car*Con*Exp*Ti e	6	0.03774619	3.08	0.0055
Ci t	1	0.03405390	2.78	0.0960
Gen*Ci t	2	0.01221422	1.00	0.3697
Car*Ci t	1	0.00146586	0.12	0.7296

Gen*Car*Ci t	2	0.00042965	0.04	0.9656
Con*Ci t	3	0.00810932	0.66	0.5759
Gen*Con*Ci t	6	0.02204285	1.80	0.0967
Car*Con*Ci t	3	0.00177595	0.14	0.9330
Gen*Car*Con*Ci t	6	0.00899093	0.73	0.6227
Exp*Ci t	1	0.00058731	0.05	0.8268
Gen*Exp*Ci t	2	0.01453907	1.19	0.3060
Car*Exp*Ci t	1	0.00135655	0.11	0.7395
Gen*Car*Exp*Ci t	2	0.00566860	0.46	0.6299
Con*Exp*Ci t	3	0.00848840	0.69	0.5568
Gen*Con*Exp*Ci t	6	0.00662923	0.54	0.7773
Car*Con*Exp*Ci t	3	0.00358946	0.29	0.8306
Gen*Car*Con*Exp*Ci t	6	0.01576771	1.29	0.2609

... Continuación

Fuente de variación	GL	Cuadrado medio	F calculado	Pr > F
Ti e*Ci t	1	0.00577686	0.47	0.4926
Gen*Ti e*Ci t	2	0.00254361	0.21	0.8126
Car*Ti e*Ci t	1	0.00001168	0.00	0.9754
Gen*Car*Ti e*Ci t	2	0.02554335	2.08	0.1252
Con*Ti e*Ci t	3	0.04239484	3.46	0.0161
Gen*Con*Ti e*Ci t	6	0.01081422	0.88	0.5073
Car*Con*Ti e*Ci t	3	0.05065734	4.13	0.0064
Gen*Car*Con*Ti e*Ci t	6	0.03698627	3.02	0.0064
Exp*Ti e*Ci t	1	0.02283834	1.86	0.1727
Gen*Exp*Ti e*Ci t	2	0.00672700	0.55	0.5779
Car*Exp*Ti e*Ci t	1	0.00514088	0.42	0.5174
Gen*Car*Exp*Ti e*Ci t	2	0.01026462	0.84	0.4332
Con*Exp*Ti e*Ci t	3	0.05491140	4.48	0.0040
Gen*Con*Exp*Ti e*Ci t	6	0.01530349	1.25	0.2792
Car*Con*Exp*Ti e*Ci t	3	0.01515825	1.24	0.2953
Ge*Ca*Co*Exp*Ti e*Ci	6	0.00657809	0.54	0.7806

Cuadro 6. Frecuencia de explantes embriogénicos y promedio de embriones por explantes para los clones UF273 y SCA6, con cada uno de los factores del tratamiento en que se produjo la embriogénesis.

GENOTIPO	TIEMPO EN	FUENTE DE	CONCENTRACION	EXPLANTE	FUENTE DE	FRECUENCIA	PROMEDIO DE
							EMBRIONES POR
	PCG (días)	CARBONO (FC)	FC (g/l)		CITOCININA	EMBRIOGENICA (%)	EXPLANTE
UF273	14	Glucosa	40	Pétalo	BAP	24a	2,5 (+)
	28	Sacarosa	40	Estaminoide	BAP	12a	6,67 (++)
	14	Glucosa	20	Pétalo	Kinetina	8a	1,5 (+)
	28	Glucosa	30	Pétalo	Kinetina	4a	5 (++)
	14	Glucosa	40	Pétalo	Kinetina	4a	3 (+)
	28	Glucosa	20	Estaminoide	BAP	4a	2 (+)
	28	Glucosa	20	Pétalo	BAP	4a	1 (+)
	14	Glucosa	40	Estaminoide	BAP	4a	1 (+)
	28	Glucosa	40	Pétalo	Kinetina	4a	1 (+)
	14	Sacarosa	20	Estaminoide	BAP	4a	1 (+)
	28	Sacarosa	50	Estaminoide	BAP	4a	1 (+)
SCA6	14	Sacarosa	40	Pétalo	BAP	20a	3,17 (+)
	14	Glucosa	30	Pétalo	BAP	12a	5,75 (++)
	28	Glucosa	50	Pétalo	BAP	12a	1,67 (+)
	14	Sacarosa	50	Pétalo	BAP	12a	1,33 (+)
	14	Glucosa	20	Pétalo	Kinetina	8a	4,5 (++)
	28	Glucosa	20	Pétalo	BAP	8a	2 (+)
	28	Glucosa	40	Pétalo	Kinetina	8a	6 (++)
	14	Sacarosa	40	Pétalo	Kinetina	8a	1 (+)
	14	Glucosa	40	Pétalo	Kinetina	4a	11 (+++)
	14	Sacarosa	30	Pétalo	BAP	4a	6 (++)
	14	Sacarosa	30	Pétalo	Kinetina	4a	5 (++)
	14	Glucosa	30	Pétalo	Kinetina	4a	2 (+)
	28	Glucosa	20	Pétalo	Kinetina	4a	1 (+)
	28	Glucosa	50	Pétalo	Kinetina	4a	1 (+)
	28	Sacarosa	40	Pétalo	Kinetina	4a	1 (+)
	14	Sacarosa	50	Pétalo	Kinetina	4a	1 (+)
	14	Glucosa	40	Pétalo	BAP	4a	1 (+)
	28	Glucosa	40	Pétalo	BAP	4a	1 (+)

Cuadro 7. Resumen de la respuesta embriogénica de los mejores resultados de los genotipos UF273 y SCA6. El cuadro muestra la frecuencia embriogénica ordenada de mayor a menor (Frecuencia %), número embriones por explante (Nº emb/exp), donde x=1-4, xx=5-10, xxx=11 o más; el tipo de explante, sea pétalo (Pet) o estaminoide (Est); La fuente de carbono, sacarosa (Sac) o glucosa (Gluc), y su concentración en gramos por litro (g/l); el tiempo de permanencia en el medio inicial (Tiempo (días)) Kin, Kinetina.

Clon	Frecuencia %	Nº emb/exp	Explante		Fuente de carbono (g/l)					Tiempo en PCG (días)		Citocininas		
			Pet	Est	Sac	Gluc	20	30	40	50	14	28	Kin	BAP
UF273	24	x	x			x			x		x			x
	12	xx		x	x			x				x		x
	8	x	x			x	x				x		x	
	4	xx	x			x		x				x		x
	4	x	x				x		x		x			x
SCA6	20	x	x		x				x		x			x
	12	xx	x				x			x				x
	12	x	x				x					x		x
	12	x	x			x			x		x			x
	8	xx	x				x				x			x
	4	xxx	x				x		x			x		x
	4	xxx	x				x		x		x			x

Salida de SAS 1

CORRELACION DE PEARSON

----- GENOTIPO=sca6 -----

The CORR Procedure

1 With Variables: Desarrollo_callo
 2 Variables: FRECUENCIA No_Embri ones

Simple Statistics

Variable	N	Mean	Std Dev	Sum
Desarrollo_callo	18	13.13333	5.81196	236.40000
FRECUENCIA	18	7.33333	4.39251	132.00000
No_Embri ones	18	3.35667	3.28194	60.42000

Simple Statistics

Variable	Minimum	Maximum
Desarrollo_callo	5.00000	27.80000
FRECUENCIA	4.00000	20.00000
No_Embri ones	1.00000	11.00000

Pearson Correlation Coefficients, N = 18
 Prob > |r| under H0: Rho=0

	FRECUENCIA	No_Embri ones
Desarrollo_callo	-0.22673 0.3656	-0.22562 0.3680

Salida de SAS 2

CORRELACION DE PEARSON

```
----- GENOTIPO=uf273 -----  
The CORR Procedure  
1 With Variables: Desarrollo_callo  
2 Variables: FRECUENCIA No_Embri ones  
  
Simple Statistics  
Variable N Mean Std Dev Sum  
Desarrollo_callo 11 9.96364 3.17467 109.60000  
FRECUENCIA 11 6.90909 6.22020 76.00000  
No_Embri ones 11 2.25818 1.90878 24.84000  
  
Simple Statistics  
Variable Minimum Maximum  
Desarrollo_callo 7.00000 15.20000  
FRECUENCIA 4.00000 24.00000  
No_Embri ones 1.00000 6.67000  
  
Pearson Correlation Coefficients, N = 11  
Prob > |r| under H0: Rho=0  
FRECUENCIA No_Embri ones  
Desarrollo_callo 0.08692 0.22854  
0.7994 0.4991
```

ANEXO 2

FORMULACION DE MEDIOS

A. MEDIO PCG (Primary Callus Growth Medium)

	1 Litro
Macro A DKW (10X)	100 ml
Macro B DKW (10X)	100 ml
Micro DKW (10X)	10 ml
Glucosa	20 g
Glutamina	250 mg
Myo-Inositol	100 mg
2,4-D (1mg/ml stock)	2 ml
TDZ (0, mg/ml stock)	25 ul
PH 5,8	
Phytigel	2 g

B. MEDIO SCG – 1 (Secondary Callus Growth Medium)

	1 Litro
Sales de Mc Cow	2,3 g
Vitaminas B5 (1000X stock)	1,0 ml
Glucosa	20,0 g
Agua de coco	50,0 ml
2,4-D (1mg/ml stock)	2,0 ml
Kinetina (1 mg/ml stock)	300,0 ml
PH 5,7	
Phytigel	2,2 g

B. MEDIO SCG – 2 (Secondary Callus Growth Medium)

	1 Litro
Sales de Mc Cow	2,3 g
Vitaminas B5 (1000X stock)	1,0 ml
Glucosa	20,0 g
Agua de coco	50,0 ml
2,4-D (1mg/ml stock)	2,0 ml
BA (1 mg/ml stock)	300,0 ml
PH 5,7	
Phytigel	2,2 g

C. MEDIO ED (Embryo Development Medium)

	1 Litro
Macro A DKW (10X)	100 ml
Macro B DKW (10X)	100 ml
Micro DKW (10X)	10 ml
Vitaminas DKW (1000X)	1 ml
Glucosa	1 g
Sacarosa	30 g

PH 5,7	
Phytigel	2 g

D. MEDIO PEC (Primary Embryo Conversion)

	1 Litro
Macro A DKW (10X)	100,0 ml
Macro B DKW (10X)	100,0 ml
Micro DKW (10X)	10,0 ml
KNO ₃	0,3 g
Solución Stock de AA 1000X	1,0 ml
Glucosa	20,0 g
Sacarosa	10,0 g
PH 5,8	
Phytigel	1,75 g

E. MEDIO RD (Root Development and Maintenance Medium)

	1 Litro
Macro A DKW (10X)	50,0 ml
Macro B DKW (10X)	50,0 ml
Micro DKW (10X)	5,0 ml
Vitaminas DKW (1000X)	0,5 ml
KNO ₃	0,3 g
Glucosa	10,0 g
Sacarosa	5,0 g
PH 5,8	
Phytigel	1,75 g

ANEXO 3

FORMULACION DE SOLUCIONES STOCK

A. Macroelementos DKW 10x

	1 Litro
NH ₄ NO ₃	14,16 g
Ca (NO ₃) ₂ . 4 H ₂ O	19,69 g
CaCl ₂ . 2H ₂ O	1,49 g
K ₂ SO ₄	15,59 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	7,40 g
KH ₂ PO ₄	2,65 g

B. Microelementos DKW 100x

	1 Litro
Zn(NO ₃) ₂	1,700 g
MnSO ₄ .H ₂ O	3,340 g
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025 g
H ₃ BO ₃	0,480 g
Na ₂ MoO ₄ . 2H ₂ O	0,039 g
FeSO ₄ .7H ₂ O	3,380 g
Na- EDTA	4,540 g

C. Vitaminas DKW 1000X

	100 ml
Myo-Inositol	10,0 g
Tiamnina-HCL	0,2 g
Acido nicotínico	0,1 g
Glicina	0,2 g

D. Vitaminas B₅ 1000X

	100 ml
Myo-Inositol	5,0 g
Acido nicotínico	50,0 mg
Piridoxina	50,0 mg
Tiamnina	500,0 mg

E. Solución Stock de Amino Acidos 1000X

100 ml

Arginina	43,55 mg
Glicina	18,76 mg
Leucina	32,80 mg
Lisina	45,65 mg
Triptófano	51,05 mg