

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

ESTUDIO MOREOGENICO DE CACAO (Theobroma cacao L.)  
EMPLÉANDO EMBRIONES HAPLOIDES

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

**Magister Scientiae**

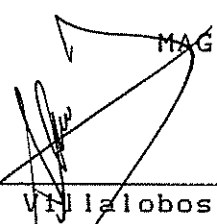
por

**TOMAS PALMA ZUÑIGA**

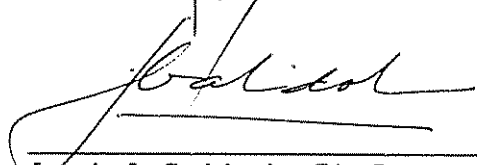
CATIE  
Turrialba, Costa Rica  
1988

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


MAGISTER SCIENTIAE

  
\_\_\_\_\_  
Víctor Villalobos Ph.D.

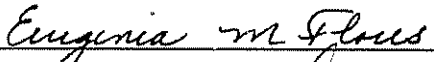
Profesor Consejero

  
\_\_\_\_\_  
José J. Galindo Ph.D.

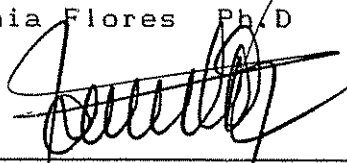
Miembro del Comité


  
\_\_\_\_\_  
Carlos Ramírez Ph.D.

Miembro del Comité

  
\_\_\_\_\_  
Eugenia Flores Ph.D.

Miembro del Comité

  
\_\_\_\_\_  
Ramón Lastra Rodríguez. Ph.D.  
Coordinador Programa de Estudios de Posgrado en  
Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales . CATIE.

  
\_\_\_\_\_  
Dr José Luis Parisí.  
Subdirector General Adjunto de Enseñanza.

  
\_\_\_\_\_  
Tomás Palma Zúñiga, Candidato

A Claribel por su amor y comprensión

A mis hijas Melissa y Mónica

A mis padres por su apoyo constante

## AGRADECIMIENTOS

El autor expresa sus sinceros agradecimientos a las siguientes personas e instituciones:

A Víctor Villalobos A. Ph.D Jefe del Programa de Mejoramiento de Cultivos Tropicales del CATIE por sus enseñanzas, apoyo y orientación para la realización de éste estudio.

A Eugenia Flores Ph.D. por su amplia colaboración y valiosos aportes en la revisión del presente trabajo.

A Carlos Ramirez Ph.D y José Galindo Ph.D. por su apoyo y participación como miembros del Comité Asesor.

Al CONICIT y Gobierno de Holanda quienes hicieron posible mis estudios.

Al Ing. Jorge Sandoval, Lic. María Elena Aguilar, Ing. Eduardo Ledezma, Ing. Nidia Guzmán y Lic. Silvana Alvarenga por su amplia colaboración y amistad brindada.

A Gilberth, Luis, Rodolfo, Juan Luis y Edgar, personal de la Unidad de Biotecnología del CATIE por su colaboración, apoyo logístico y amistad brindada.

Al Dr Marc Berthouly por su colaboración brindada.

A Ludwig Muller Ph.D por sus enseñanzas y colaboración en éste estudio.

A Gustavo Enríquez Ph.D. por su colaboración y sugerencias brindadas.

A Pedro Ferreira Ph.D por su asesoramiento y apoyo en el análisis estadístico.

Al señor Rigoberto Aguilar y demás personal de la Personal de la Biblioteca Orton por su eficiente colaboración en la obtención y reproducción de información .

A las familias Araya Rodríguez y Guevara Gómez por la amistad y experiencias compartidas durante el estudio.

## BIOGRAFIA

El autor nació en San Ramón Provincia de Alajuela, Costa Rica.

Obtuvo el título de Ingeniero Agrónomo Fitotecnista en la Facultad de Agronomía de la Universidad de Costa Rica en el año de 1978.

En 1982 realizó estudios de Posgrado en La Estación del Zaidín, Universidad de Granada, España en Biología Vegetal y Edafología.

Desde 1978 se desempeña como docente e investigador en el Departamento de Agronomía del Instituto Tecnológico de Costa Rica, Sede San Carlos.

El 16 de Setiembre de 1986 ingresó al Programa de Posgrado en Ciencias Agrícolas del CATIE y obtuvo el título de Magister Scientiae el 30 de setiembre de 1988.

## CONTENIDO

RESUMEN .....	X
SUMMARY .....	XIII
LISTA DE CUADROS.....	XXII
LISTA DE FIGURAS .....	XXII
1. INTRODUCCION .....	1
2. REVISION DE LITERATURA .....	4
2.1 Uso de los haploides .....	4
2.1.1 Origen de los haploides.....	6
2.1.2 Naturaleza de los haploides .....	9
2.2 Morfología de los haploides de T. cacao. ....	9
2.2.1 Las almendras aplanadas en cacao y su relación con la haploidía .....	10
2.2.2 Características morfológicas de las almendras planas de T.cacao .....	12
2.3 Importancia práctica del cultivo in vitro de embriones .....	13
2.4 Composición del medio de cultivo para el desarrollo y crecimiento in vitro de embriones de plantas. ....	14
2.5 Desinfección de semillas previo a la disección de embriones .....	15
2.6 Cultivo de embriones de cacao .....	18
2.7 Embriogénesis somática en cacao .....	19
2.8 Cultivo de cacao en suspensión celular.....	21
3. MATERIALES Y METODOS .....	23
3.1 Localización del estudio .....	23
3.2 Material experimental .....	23
3.3 Medios de cultivo para el rescate de em- briones provenientes de semillas aplanadas de cacao .....	23

3.4	Desinfección superficial de las semillas, aislamiento y cultivo in vitro de embriones...	24
3.4.1	cultivo in vitro de embriones provenientes de semillas aplanadas .....	27
3.5	Microscopía electrónica de rastreo.....	28
3.6	Determinación del nivel de ploidía .....	29
3.7	Inducción de callo y organogénesis a partir de cotiledones de semillas aplanadas de cacao .....	30
3.8	Cinética de crecimiento de callos inducidos a partir de cotiledones de cacao .....	33
3.9	Establecimiento y crecimiento del cultivo de células en suspensión .....	34
3.10	Análisis estadístico del estudio .....	35
3.10.1	Variables medidas en el embrión .....	36
3.10.2	Inducción del callo .....	37
3.10.3	Cinética de crecimiento y cultivos en suspensión celular .....	37
3.10.4	Procesamiento de la información .....	37
3.10.4.1	Análisis de varianza .....	37
3.10.4.2	Prueba de Duncan .....	40
4.	RESULTADOS .....	41
4.1	Evaluación del crecimiento de ejes embrionales de cacao de los híbridos EET-95 X SCA-6 y POUND-7 X UF-613 bajo la influencia de siete medios de cultivo durante un periodo de 5 semanas .....	41
4.1.1.	Porcentaje de sobrevivencia.....	41
4.1.2.	Longitud del eje-hipocotilo-radicular...	41
4.1.3.	Longitud del epicotilo.....	43
4.1.4.	Número de hojas.....	43
4.1.5.	Longitud de las hojas.....	46
4.1.6.	Número de raíces laterales.....	46
4.2.	Parámetros morfológicos en ejes embrionales de cacao del híbrido POUND-7 X UF-613 y EET-95 X SCA-6 en un medio MS modificado y suplementado con 200 mg.l-1 de glutamina y 200 mg.l-1 de CH durante 35 días .....	49
4.3.	Comportamiento de embriones provenientes de semilla aplanadas en cruces intraespecíficos y trasplante a invernadero. ....	53
4.4.	Morfología de los tipos básicos de embriones provenientes de semillas aplanadas de cacao .....	55



4.5.	Efecto de ANA + BA y 2,4-D sobre la inducción de callo a partir de cotiledones de cacao .....	65
4.6.	Efecto de CH sobre el desarrollo de callo en un medio basal MS suplementado con agua de coco (10 %), BA y 2iP .....	67
4.7.	Cinética de crecimiento del callo a partir de cotiledones de cacao .....	70
4.7.1.	Iniciación del crecimiento y desarrollo del callo .....	70
4.8.	Cultivos en suspensión .....	73
5.	DISCUSION .....	78
5.1.	Sobrevivencia, contaminación y oxidación.....	78
5.2.	Parámetros morfológicos en ejes embrionales de cacao del híbrido POUND-7 X UF-613 y EET-95 X SCA-6 en un medio MS enriquecido con glutamina y caseína hidrolizada.....	79
5.3.	Rescate de embriones de semillas aplanadas de cacao .....	81
5.4.	Efecto del ANA más BA y 2,4-D sobre la inducción del callo a partir de cotiledones de cacao .....	83
5.5.	Efecto del AC, CH, BA y 2iP sobre el desarrollo de callo a partir de cotiledones de semillas aplanadas de cacao. ....	84
5.6.	Cinética de crecimiento de callos de cotiledones de cacao inducidos y desarrollados con 2,4-D, CH y AC .....	85
5.7.	Cultivos en suspensión celular.....	86
6.	CONCLUSIONES.....	88
7.	RECOMENDACIONES .....	90
8.	BIBLIOGRAFIA.....	91
9.	APENDICE .....	100

PALMA Z., T. 1988. Estudio morfogénico de cacao (Theobroma cacao L.) empleando embriones haploides. Tesis Mg. Sc., Turrialba, Costa Rica, CATIE. p 110.

Palabras claves: Theobroma cacao L., rescate de embriones, haploidía, callos, organogénesis, embriogénesis asexual, sales, suspensiones celulares.

## RESUMEN

El presente estudio se realizó en Unidad de Biotecnología del Programa de Mejoramiento de Cultivos Tropicales del CATIE, Turrialba, Costa Rica con el fin de establecer la metodología necesaria para el rescate de embriones provenientes de semillas aplanadas de cacao, considerada una fuente de haploidía y su caracterización morfológica, además estudiar la aplicación del cultivo in vitro en la micropropagación de cacao utilizando cotiledones provenientes de éstas semillas a través del callo y suspensiones celulares. Para los efectos se estudió la respuesta morfogénica de ejes embrionales de los híbridos EET-95 X SCA-6 y POUND-7 X UF-613. Estas estructuras que se aproximan a los embriones provenientes de semillas aplanadas permitió determinar como medio apropiado las sales MS suplementado con ( $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ): tiamina-HCl 1, piridoxina-HCL 1, ácido nicotínico 1, glicina 4, inositol 200, glutamina 200, caseína hidrolizada 200, sacarosa 40000 y gel rite 1500.

Los embriones fueron mantenidos en incubación a una temperatura  $27\pm 3$  y un fotoperiodo de 16 horas.

temperatura  $27\pm 3$  y un fotoperiodo de 16 horas.

El porcentaje de plántulas desarrolladas fue muy variable y los valores fluctuaron de 16 a 87 %. Los embriones y plántulas se caracterizaron como tipos morfológicamente que se correlacionaron con los tipos de haploides existentes en cacao, luego las plantas haploides se verificaron mediante el conteo de cromosomas en hojas jóvenes, obteniéndose un 1.7 % de haploidía. En el medio en que efectuó el rescate de embriones se presentaron diferentes respuesta morfogénicas observándose organogénesis y embriogénesis somática en los híbridos POUND-7 X UF-613, UF-613 X IMC-67 y EET-62 X SCA-6

El medio MS suplementado con 2,4-D, enriquecido con caseína hidrolizada y agua de coco promovió un crecimiento rápido y sostenido de callo a partir de cotiledones de semillas aplanadas. La suplementación de éste medio con BA y ANA en una proporción 3:1 permitió la formación de embriones somáticos.

El callo inducido en el medio MS suplementado con 2,4-D y desarrollado en el mismo medio basal enriquecido con caseína hidrolizada, al transferirse a un medio MS líquido suplementado con 2,4-D se obtuvo con éxito la suspensión celular con un incremento del peso fresco de 25 veces en 6 semanas con subcultivos realizados cada 14 días.

La cinética de crecimiento del callo durante 7 semanas

indica un mayor desarrollo del mismo después de dos semanas de inoculado el explante ; desde la quinta hasta la séptima semana el crecimiento fue menor y a partir de ésta semana no se obtuvo ningún incremento en el crecimiento.

PALMA Z.T. 1988. Morphogenetic studies of cocoa (Theobroma cacao L.) with haploids embryos. Master Science Thesis, Turrialba, C.R. CATIE. 111 p.

Key words: Theobroma cacao L. Embryo rescue, haploids, callus, organogenesis, asexual embryogenesis. Suspension cultures.

#### SUMMARY

The present study was carried out in the Biotechnology Unit of the Tropical Crops Breeding Program of CATIE at Turrialba, Costa Rica, in order to establish the necessary methodology for the embryo rescue from flat beans of cocoa, considered a source of haploidy and its morphological characterization. The application of in vitro culture to the cocoa micropropagation using cotyledon explants from mature flat beans by callus and cellular suspension was also investigated. The morphogenesis of embryonic axis of the hybrids 'EET-95 X SCA-6' and 'POUND-7 X UF-613' was studied. This structures with the embryo explants of flat beans made possible the determination of the following appropriated medium: MS salts supplemented with: 1 mg/l thiamine-HCl, 1 mg/l pyridoxine HCl, 1 mg/l nicotine acid, 4 mg/l glycine 200 mg/l inositol, 200 mg/l glutamina, 200 mg/l casein hydrolysate, 40000 mg/l and 1500 mg/l gel rite 1500.

The embryos were incubated at  $27 \pm 3$  °C with a photoperiod of 16 hours.

The percentage of seedlings developed was variable

and, the values varied from 16 to 87 %. The embryos and seedling were characterized as morphological types wich correlated with the haploid types present in cocoa.

Further, the haploidy level were confirmed with chromosome counting using the squash method in young leaves we obtain a 1.7 % of haploids plants in the mediu utilized from embryos rescue there were diferent responses.

Organogenesis and somatic embryogenesis was observed in the flat beans.

The MS medium supplemented with 2,4-D and enriched with casein hydrolysate and coconut water, stimulated a rapid and sustained growth of callus from flat bean cotyledons.

The supplementation of this medium with 3 mg/l BA and 1 mg/l NA permitted the somatic embryos differentiation.

Callus was induced in MS mediu supplemented with 2,4-D and developed in the basal medium enriched with casein hydrolysate.

Cellular suspension cultures were obtained from callus induced in the MS medium supplemented with 2,4-D, developed in the same basal medium enriched with casein hydrolyzate, with a final transfer to a MS liquid medium with 2,4-D. The increase in fresh weight and dry weight of the cell suspension culture was over 25 fold in 6 weeks with subcultures every 14 days.

The growth kinetics of the callus during 7 weeks showed a better response of callus at 2 weeks after explant inoculation, with gradual decline in growth after the fifth week.

## LISTA DE CUADROS

En el texto

Cuadro		Página
1	Composición de medio de cultivo de Murashige y Skogg (1962) .....	25
2	Composición de los medios de cultivo utilizados en la inducción de callos y organogénesis a partir de cotiledones de semillas aplanadas de cacao ( <u>T. cacao</u> L.) .....	26
3	Composición de los medios de cultivo utilizados para el rescate de ejes embrionales de cacao con diferentes dosis de glutamina .....	26
4	Composición de los medios de cultivo utilizados en la inducción de callo y morfogénesis a partir de cotiledones de semillas aplanadas de cacao ( <u>T. cacao</u> L.).....	32
5	Promedio de las variables del porcentaje de sobrevivencia, longitud hipocotilo-radicular y número de raíces laterales en ejes embrionales de cacao del híbrido EET-95 X SCA-6, cultivados en 7 medios de cultivo durante 7 días....	42
6	Promedio de las variables del porcentaje de sobrevivencia, longitud hipocotilo-radicular y número de raíces laterales en ejes embrionales de cacao del híbrido POUND-7 X UF-613 cultivados en 7 medios de cultivo durante 7 días.....	42
7	Promedio de las variables del porcentaje de sobrevivencia, longitud hipocotilo-radicular longitud del epicotilo, número y longitud de hojas y número de raíces en ejes embrionales de cacao del híbrido EET 5 X SCA 6 cultivados <u>in vitro</u> durante 14 días en 7 medios de cultivo.....	44
8	Promedio de las variables porcentaje de sobrevivencia longitud hipocotilo-radicular, longitud del epicotilo, número y longitud de hojas y número de raíces en ejes embrionales de cacao del híbrido POUND-7 X UF-613 cultivados <u>in vitro</u> durante 14 días, en 7 medios de cultivo.....	44



9	Promedio de las variables del porcentaje de sobrevivencia, longitud hipocotilo-radicular longitud del epicotilo, número y longitud de hojas y número de raíces, en ejes embrionales de cacao del híbrido EET-95 X SCA6 cultivados <u>in vitro</u> durante 21 días en 7 medios de cultivo.....45	45
10	Promedio de las variables porcentaje de sobrevivencia, longitud hipocotilo-radicular longitud del epicotilo, número y longitud de hojas y número de raíces en ejes embrionales del híbrido POUND-7 X UF-613 cultivados <u>in vitro</u> durante 21 días en 7 medios de cultivo.....46	46
11.	Promedio de las variables porcentaje de sobrevivencia, longitud del hipocotilo-radicular, longitud del epicotilo, número y longitud de hojas y número de raíces laterales en ejes embrionales de cacao del híbrido EET-95 X SCA-6 cultivados <u>in vitro</u> durante 28 días en 7 medios de cultivo.....47	47
12.	Promedios de las variables porcentaje de sobrevivencia, longitud hipocotilo-radicular longitud del epicotilo, número y longitud de hojas y número de raíces laterales en ejes embrionales de cacao del híbrido POUND-7 X UF-613 cultivados <u>in vitro</u> durante 28 días en 7 medios de cultivo.....47	47
13.	Promedio de las variables porcentaje de sobrevivencia , longitud del hipotilo-radicular longitud de epicotilo número y longitud de hojas y número de raíces laterales en ejes embrionales de cacao del híbrido EET-95 X SCA-6 cultivados <u>in vitro</u> durante 35 días en en 7 medios de cultivo.....48.	48.
14.	Promedio de las variables porcentaje de sobrevivencia, longitud hipocotilo-radicular longitud del epicotilo, número y longitud de hojas y número de raíces laterales en ejes embrionales de cacao del híbrido POUND-7 X UF 613 cultivados <u>in vitro</u> durante 35 días en 7 medios diferentes.....48	48
15	Porcentaje de almendras aplanadas vanas, con embrión y plantas provenientes de diferentes híbridos de <u>T.cacao</u> .....54	54

16. Promedio del área de callo a partir de cotiledones de semillas aplanadas del híbrido POUND-7 X CATONGO en un medio MS bajo la influencia de ANA:BA y 2,4-D durante 4 semanas de desarrollo .. 69
17. Promedio del área de callo a partir de cotiledones de semillas aplanadas del híbrido POUND-7 X CATONGO en un medio basal MS con CH bajo la influencia de AC, BA y 2iP durante 6 semanas.....69
18. Peso fresco promedio de los callos a partir de cotiledones de cacao del híbrido POUND-7 X CATONGO en un medio basal MS con 2,4-D, CH y AC durante 7 semanas de desarrollo.....71
19. Peso seco promedio de callos inducidos de cotiledones de cacao del híbrido POUND 7 X CATONGO en un medio basal MS con 2,4-D, CH y AC durante 7 semanas de desarrollo.....71
20. Peso fresco promedio de una suspensión celular a partir de cotiledones del híbrido POUND-7 X CATONGO en un medio basal MS con 2,4-D, CH y AC durante 6 semanas.....75
21. Peso seco promedio de una suspensión celular a partir de cotiledones del híbrido POUND-7 X CATONGO en un medio basal MS con 2,4-D, CH y AC durante 6 semanas.....75

APENDICE

Cuadro N<sup>o</sup>

Página

1A	Cuadrados medios, coeficientes de variación y significancia de las variables de crecimiento estudiadas en ejes embrionales de cacao del híbrido EET-95 X SCA-6 cultivados <u>in vitro</u> en 7 medios de cultivo durante 7 días.....	101
2A	Cuadrados medios, coeficientes de variación y significancia de las variables de crecimiento estudiadas en ejes embrionales de cacao del híbrido EET-95 X SCA-6 cultivados <u>in vitro</u> en 7 medios de cultivo durante 14 días.....	101
3A	Cuadrados medios, coeficientes de variación y significancia de las variables de crecimiento estudiadas en ejes embrionales de cacao del híbrido EET-95 X SCA-6 cultivados <u>in vitro</u> en 7 medio de cultivo durante 21 días.....	102
4A	Cuadrados medios, coeficientes de variación y significancia de las variables de crecimiento estudiadas en ejes embrionales de cacao del híbrido EET-95 X SCA-6 cultivados <u>in vitro</u> en 7 medios de cultivo durante 28 días.....	102
5A	Cuadrados medios, coeficientes de variación y significancia de las variables de crecimiento estudiadas en ejes embrionales de cacao del híbrido EET-85 X SCA-6 cultivados <u>in vitro</u> en 7 medios de cultivo durante 35 días.....	103
6A	Cuadrados medios, coeficientes de variación y significancia de las variables de crecimiento estudiadas en ejes embrionales de cacao del híbrido POUND-7 X UF-613 cultivados <u>in vitro</u> en 7 medios de cultivo durante 7 días.....	103
7A	Cuadrados medios, coeficientes de variación y significancia de las variables de crecimiento estudiadas en ejes embrionales de cacao del híbrido POUND-7 X UF-613 cultivados <u>in vitro</u> en 7 medios de cultivo durante 14 días.....	104

8A	Cuadrados medios, coeficientes de variación y significancia de las variables de crecimiento estudiadas en ejes embrionales de cacao del híbrido POUND-7 X UF-613 cultivados <u>in vitro</u> en 7 medios de cultivo durante 21 días.....	104
9A	Cuadrados medios, coeficientes de variación y significancia de las variables de crecimiento estudiadas en ejes embrionales de cacao del híbrido POUND-7 X UF-613 cultivados <u>in vitro</u> en 7 medios de cultivo durante 28 días.....	105
10A	Cuadrados medios, coeficientes de variación y significancia de las variables de crecimiento estudiadas en ejes embrionales de cacao del híbrido POUND-7 X UF-613 cultivados <u>in vitro</u> en 7 medios de cultivo durante 35 días.....	105
11A	Cuadrados medios, coeficientes de variación y significancia para el área de callo por efecto del medio basal MS con ANA+BA y 2,4-D ....	106
12A	Cuadrados medios, coeficientes de variación y significancia para el área de cotiledones de semillas aplanadas de cacao por efecto de 5 tratamientos con reguladores de crecimiento durante 7 semanas de desarrollo.....	106
13A	Cuadrados medios, coeficientes de variación y significancia para el peso fresco de callos en un medio basal MS suplementado con 2,4-D, CH y AC.....	107
14A	Cuadrados medios, coeficientes de variación y significancia para el peso fresco de callos en un medio basal MS suplementado con 2,4-D, CH y AC.....	107
15A	Cuadrados medios, coeficientes de variación y significancia para el peso fresco de cultivos de suspensión celular de cacao en un medio MS con 2,4-D, Ac y CH.....	108
16A	Cuadrados medios, coeficientes de variación y significancia para el peso seco de cultivos de suspensión celular de cacao en un medio MS 2,4-D, AC y CH.....	108
17A	Longitud promedio del eje hipocotilo-radicular en embriones de cacao en diferentes híbridos provenientes de semillas aplanadas.....	109

18A	Número promedio de raíces en embriones de cacao en diferentes híbrido provenientes de semillas aplanadas.....	109
19A	Longitud promedio del epicotilo en embriones de cacao en diferentes híbridos provenientes de semillas aplanadas .....	110
20A	Número promedio de hojas en embriones de cacao en diferentes híbridos provenientes de semillas aplanadas.....	110
21A	Longitud promedio de hojas en embriones de cacao en diferentes híbridos provenientes de semillas aplanadas.....	111

## LISTA DE FIGURAS

Figura N <sup>o</sup>		Página
1	Número de hojas y raíces laterales en ejes embrionales de cacao del híbrido EET-95 X SCA-6 cultivados <u>in vitro</u> , en un medio MS modificado y enriquecido con 200 mg·l <sup>-1</sup> de CH y 200 mg·l <sup>-1</sup> de glutamina durante 5 semanas.....	50
2	Longitud del eje hipocotilo-radicular, y hojas (peciolo más lámina foliar) en ejes embrionales de cacao del híbrido EET-95 X SCA-6, cultivados <u>in vitro</u> en un medio MS enriquecido con 200 mg·l <sup>-1</sup> de CH y 200 mg·l <sup>-1</sup> de glutamina durante 5 semanas.....	50
3	Longitud del eje hipocotilo-radicular, epicotilo y hojas en ejes embrionales de cacao del híbrido POUND-7 X UF-613, cultivados <u>in vitro</u> , en un medio MS modificado y enriquecido con 200 mg·l <sup>-1</sup> de CH y 200 mg·l <sup>-1</sup> de glutamina durante 5 semanas.....	51
4	Número de hojas y raíces laterales en ejes embrionales de cacao del híbrido POUND-7 X UF-613 cultivados <u>in vitro</u> , en un medio MS modificado y enriquecido con 200 mg·l <sup>-1</sup> de CH y 200 mg·l <sup>-1</sup> de glutamina durante 5 semanas.....	51
5	Morfología típica de los embriones provenientes de semillas aplanadas de cacao A. Embrión provenientes de una semilla normal con remoción parcial del cotiledón (c) para exponer el hipocotilo (h). D.organogénesis observada en el híbrido IMC-67 X UF-654. Los brotes (b) se originan del hipocotilo.....	56
6	Morfología típica de los embriones provenientes de semillas aplanadas de cacao.....	58
7	Morfología típica de los embriones provenientes de semillas aplanadas de cacao.....	60

8	Organogénesis en hipocotilos de embriones provenientes de semillas aplanadas de cacao. A. vista lateral de un brote (b) desarrollado en el hipocotilo (h). B. Detalle de primordios foliares del brote. C. Brote del hipocotilo en el híbrido EET-95 X SCA-6. D. Detalle de la estructura epidérmica de la superficie abaxial del primordio foliar. E. Brote.....	61
9	Vástagos obtenidos por organogénesis en el híbrido UF-613 X IMC-67. h. estructura hipocotilar . a.v. Apice del vástago. ef estructura foliar entre cotiledones y megafilas.....	63
10	Cromosomas observados en el ápice de un planta de cacao haploide, proveniente de semillas aplanadas.....	64
11	Diferentes características de los embriones de cacao provientes de semillas aplanadas ....	64
12	Iniciación del callo a partir de cotiledones de cacao del híbrido POUND-7 X CATONGO en medio MS con ANA + BA y 2,4-D.....	67
13	Desarrollo de callo a partir de cotiledones de cacao del híbrido POUND-7 X CATONGO en un medio MS más agua de coco, CH, BA y 2iP.....	68
14	Acumulación de peso fresco (o) y peso seco (o) en callos de cotiledones de cacao en un medio MS con 2,4-D ( $1 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ ) durante 7 semanas.....	68
15	Acumulación de peso fresco (o) y peso seco (o) en callos de cotiledones de cacao en un medio MS con en un medio MS con 2,4-D ( $1 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ ) y CH ( $2000 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ ).....	68
16	Acumulación del peso fresco (o) y peso seco (o) en callos de cotiledones de cacao en un medio MS con 2,4-D ( $1 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ ) + AC(10%) durante 7 semanas.....	72
17	acumulación del peso fresco (o) y peso seco (o) en callos de cotiledones de cacao en un medio MS con 2,4-D ( $1 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ ) y CH ( $2000 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ ) y AC (10%) durante 7 semanas.....	72

18	Incremento del peso fresco (o) y peso seco ( o ) de cultivos en suspensión a partir de cotiledones de cacao en un medio MS suplementado con 2,4-D (1 mg·l <sup>-1</sup> ).....76
19	Incremento del peso fresco (o) y peso seco ( o ) de cultivos en suspensión a partir de cotiledones de cacao en un medio MS con CH y suplementado con 2,4-D.....76
20	Incremento del peso fresco (o) y peso seco ( o ) de cultivos en suspensión a partir de cotiledones de cacao en un medio MS con AC y suplementado con 2,4-D.....77
21	Incremento del peso fresco (O) y peso seco ( o ) de cultivos en suspensión a partir de cotiledones de cacao en un medio MS con AC enriquecido con CH y suplementado con 2,4-D .....77



## 1. INTRODUCCION

Los programas de mejoramiento genético de cacao se basan en la producción de híbridos entre grupos bien diferenciados de la especie Theobroma cacao L. La diversidad genética es evidente en estos grupos, a saber el criollo, con semillas blancas o rosadas; el forastero con semillas color púrpura, separable a su vez en dos grupos originarios del alto o bajo Amazonas y por último el Trinitario, que es un grupo obtenido entre árboles forasteros y criollos (Lanaud 1987).

Los híbridos debido al origen de sus progenitores son muy heterocigotos. Esta heterogeneidad de los cultivares de cacao, aunada a la incompatibilidad y a un ciclo de reproducción largo, han justificado la búsqueda de plantas homocigotas, autocompatibles y vigorosas (Dublin 1974). La identificación y estudio de plantas haploides de cacao para su subsiguiente duplicación clonal representa la mejor alternativa para la obtención rápida de líneas o genotipos isogénicos en este cultivo. Además, la utilización de haploides duplicados permite acortar el ciclo de selección (Dublin 1974).

El interés en los haploides espontáneos de cacao se inició con Dublin (1972), quién publicó la existencia

y las posibilidades de uso de estas plantas con fines de mejoramiento, sin embargo los haploides se presentan con una baja frecuencia, que varía con el genotipo y es, usualmente del orden de  $10^{-3}$  a  $10^{-4}$ .

A fin de que se pueda emplear los haploides con fines de mejoramiento, se requiere de un número considerable de plantas (Maggon y Khanna 1963, Claude 1978). La regeneración de estos haploides in vitro pudiera ser la técnica que ofreciera el mayor coeficiente de multiplicación (Dublin 1974). Por otro lado los estudios de Dublin (1974) demuestran que los haploides de Theobroma cacao L. son incapaces de desarrollarse en forma natural; éste fenómeno parece relacionarse con un desequilibrio vástago-raíz

Aunque la regeneración de plantas de cacao mediante el cultivo de tejidos no ha sido exitosa, se logró desarrollar callos y, en algunos casos, se ha inducido raíces en callos provenientes de cambium (Archibald 1954), raíces de plántulas, hipocotilo, cotiledones (Hall y Collins 1975, Wang y Janick 1982), embriones y cultivos de anteras (Prior 1977, Adu-Ampomah et al., 1987), cultivo de ápices (Orchard y Collins, 1979; Passey y Jones, 1983; Adu-Ampomah et al., 1987) ; y aislamiento de protoplastos, Thompson et al., 1987).

Pence et al., (1975) obtuvieron la proliferación de

embriones somáticos a partir de embriones cigóticos inmaduros y Novak (1985) describió, por primera vez, la regeneración de plantas de cacao, vía embriogénesis somática, utilizando el mismo tipo de explante.

Con base en estos antecedentes, se plantearon los siguientes objetivos para la realización de éste trabajo:

1. Desarrollar la metodología necesaria para el rescate de embriones provenientes de semillas aplanadas de T.cacao.
2. Estudiar el nivel de ploidía de plántulas provenientes de semillas aplanadas de cacao de la Unidad de Recursos Fitogenéticos del CATIE.
3. Caracterizar morfológicamente los embriones provenientes de semillas aplanadas de cacao.
4. Determinar la metodología que permite la inducción de callo y organogénesis en cacao.
5. Establecer la cinética de crecimiento de los callos y sus pensiones celulares en cacao.
6. Analizar el comportamiento de las plantas germinadas in vitro

## 2. REVISION DE LITERATURA

### 2.1 USO DE LOS HAPLOIDES

La haploidía en plantas superiores fue descrita, por primera vez, en Datura stramonium hace 66 años (Collins y Legg 1974) . Después de este artículo se han hecho esfuerzos continuos para obtener, caracterizar y utilizar los haploides en estudios de mejoramiento de las plantas superiores, con especial énfasis en las especies de importancia económica (Collins y Legg 1974). La renovación del interés en los haploides para el mejoramiento de plantas se basó en la producción exitosa de plantas a partir de microsporas, realizada por Guha y Maheshwari (1964).

Quizás el uso más práctico de los haploides es la producción y explotación de las formas homocigotas que pueden producirse al duplicarlos con colchicina (Kimber y Ryley 1963) o bien duplicarse en forma espontánea. Sin embargo, aunque éste uso potencial de los haploides se conoce desde hace muchos años, son pocas las especies mejoradas por este método y cultivadas comercialmente.

Existen varias dificultades en el uso comercial de los haploides duplicados . Primero, la frecuencia de haploides es muy baja en la mayoría de las especies, aunque mediante

el uso de poliembrionia o marcado genético de plántulas en una población, se puede recuperar los haploides. (Lanaud, 1987; Amefia, 1984).

Una de las ventajas de los haploides en los programas de mejoramiento es que en cualquier población se puede realizar una selección directa de individuos para caracteres genético y teóricamente, es más simple obtener individuos homocigotos para ciertos caracteres deseables mediante duplicación directa de los monoploides que por mejoramiento continuo para obtener líneas puras (Chase 1969).

Las líneas puras a partir de haploides pueden tener los siguientes usos (Harland 1955):

a. Emplearse como una constante genética para medir variaciones morfológicas, la cual se puede deber a las condiciones del ambiente. Además, puede determinarse la concentración de cada genotipo, así como del medio ambiente, hacia la expresión de un carácter particular. El aislamiento y comparación de líneas puras, a partir de variedades establecidas podría, además indicar la variabilidad genética aún existente en una especie y si las variedades deseables pueden producirse mediante la unión de líneas puras o, mediante combinación de híbridos de mayor o menor complejidad para una multiplicación comercial.

b. Pueden ser usadas como una base para transferir

caracteres deseables.

c. Es una fuente de recombinantes puros en especies cruzadas. En el caso de los haploides duplicados como ejemplo, G. hirsutum y G. barbadense dan recombinantes estables en la F1; éstos son equivalentes al producto de varios años de autofecundación, por el método convencional.

d. Se puede llevar a cabo, en forma más efectiva, ensayos de mejoramiento en resistencia a enfermedades.

c. La células haploides pueden utilizarse para ingeniería genética pues no enmascaran ningún carácter.

### 2.1.1 ORIGEN DE LOS HAPLOIDES

#### A) Espontáneo:

Los individuos haploides pueden ser de origen espontáneo y encontrarse en baja frecuencia en la población natural. Los embriones haploides pueden aparecer en semillas monoembriónicas normales o en semillas poliembriónicas (Lacadena 1974).

La detección de los individuos haploides se puede hacer por su tamaño pequeño y a través de su ciclo vegetativo, ya que se conoce que el tamaño de las células está directamente relacionado con el nivel ploidía. Lacadena (1974) encontró que sólo en pocos casos las plantas haploides y diploides tienen tamaño similar.

La identificación morfológica de los haploides en la semilla es difícil, ya que por lo general, el endosperma es triploide aunque el embrión sea haploide (Lacadena 1974).

#### **B) Inducida:**

Debido a la potencialidad teórica y aplicada de los haploides, además de la ocurrencia espontánea, se ha estudiado su inducción artificialmente. Hay diferentes métodos para inducir haploidía:

i) Retraso de la polinización, ii) uso de polen abortivo, iii) cruza amplias, iv) altas y bajas temperaturas, v) radiación y vi) sustancias mutagénicas.

**i) Retraso de la polinización.** Este método ha aumentado la frecuencia de los haploides espontáneos en varios cultivos. En Triticum monococcum aumentó esta frecuencia al retrasar la polinización (Kihara 1940, Smith 1946).

**ii) Uso de polen abortivo.** El polen de algunas especies puede ser capaz de proporcionar el estímulo hormonal para el desarrollo de la célula huevo y del endosperma, aunque no se efectúe la fertilización. Esto permite la estimulación de la célula huevo y la obtención de un haploide natural al no existir la fusión de gametos.

**iii) Cruzas amplias.** En los cruces entre progenitores no emparentados taxonómicamente con frecuencia son incapaces

de llevar a cabo la fertilización, aun cuando puede estimular el desarrollo de embriones. Esto permite obtener algunos individuos haploides . Aun cuando la hibridación distante y la producción de haploides se relacionan en muchos casos, algunos autores opinan que no hay relación entre ambas (Kimber y Ryley 1963).

iv. **Altas y bajas temperatura.** Al someter las plantas a temperaturas más altas y más bajas puede estimular el desarrollo partenogénico de la célula huevo. Nordenskiöld (1939) citado por Maggon y Khanna, (1963) obtuvieron plantas haploides en arroz sometiendo las plantas a una temperatura de 41 °C durante 45 minutos, 21 horas después de la polinización.

v. **Radiación :** el primer haploide reconocido fue Datura stramonium obtenido mediante la aplicación de rayos X a polen de flores emasculadas. En Zea mays se obtuvo haploides por métodos similares (Maggon y Khanna, 1963).

vi. **Sustancias químicas.** Los tratamientos con hidrazida maleica en plantas de maíz y en concentraciones de 50 ppm aplicada 24 horas antes de la polinización resultó efectiva en la inducción de plantas haploides, además en remolacha azucarera se ha inducido la producción de plantas haploides con colchicina (Maggon y Khanna, 1963).



### 2.1.2 NATURALEZA DE LOS HAPLOIDES

La producción de haploides es el resultado de uno de los siguientes procesos i) Desarrollo de una célula huevo no fertilizada (partenogénesis), ii) Desarrollo de una célula espermática (androgénesis), .iii) Desarrollo de cualquier célula haploide del saco embrionario (sinérgidas o antípodas) (Lacadena 1974). Estos procesos pueden ser independientes o simultáneos. En la poliembrionía, los embriones haploides pueden originarse de la célula huevo y las sinérgidas. Rara vez son de origen androgénico (Campos y Morgan 1960).

### 2.2. MORFOLOGIA DE LOS HAPLOIDES EN CACAO

El haploide es un individuo reducido de la versión diploide correspondiente (Magoon y Khanna 1963).

Según Dublin (1972) las plántulas haploides muestran variabilidad morfológica, como producto de las diferencias en reserva cotiledonar y variabilidad genotípica del progenitor. Su desarrollo se caracteriza por una emergencia cotiledonar normal, seguida de una disminución del crecimiento y emisiones foliares periódicas de sólo una o dos hojas. El tallo tiene entrenudos cortos y estípulas más persistentes. Las hojas son pequeñas, ovaladas, de peciolo corto. Las primeras hojas tienen una lámina foliar irregular, pero este fenómeno disminuye posteriormente. La

hoja es variegada con zonas verdes más claras y muestran corrugaciones laterales con respecto a la vena media y venas secundarias y terciarias. La coloración antociánica es inferior a la del diploide y el indumento foliar es menor. Por lo general, existe relación entre el nivel de ploidía y las dimensiones y número de los estomas.

El sistema radical es similar al de la planta diploide, pero las raíces laterales son menores.

### 2.2.1 LAS ALMENDRAS APLANADAS DE CACAO Y SU RELACION CON LA HAPLOIDIA

En la mazorca del cacaotero hay una baja frecuencia de semillas livianas de forma aplanada mezcladas con las semillas normales. Dublin (1973) trató de establecer una relación entre el porcentaje de haploidía y el carácter aplanado de estas semillas. Resultado de estos estudios mostró la presencia de un un 3.1 % de haploidía en plántulas provenientes de semillas aplanadas. Asimismo observó que la mortalidad de las plántulas provenientes de éstas semillas es de 50 %. El porcentaje de semillas aplanadas vanas determinadas por Dublin (1973) es de 46 % en los diferentes grupos genéticos representados en Costa de Marfil (Amelonado Trinitario y Alto Amazónico). Dentro de los híbridos interespecíficos e intergenéricos, la tasa de semillas aplanadas sin embrión puede alcanzar hasta un 90 %. Los estudios realizados por Dublin (1973) indican que existe una

tendencia de estas semillas aplanadas a concentrarse en el extremo distal de la mazorca (opuesto al pedúnculo).

Dublin (1973) propuso que estas semillas pueden deberse a: 1. el resultado de una fecundación retardada, 2. una combinación genética desfavorable que ocasiona una disminución del crecimiento del embrión, 3. un fenómeno de esterilidad parcial ligado a una deficiencia de fecundación, 4. una falla de megasporogénesis o 5. efecto de desarrollo, partenogénico posterior a un estímulo normal de cualquier origen.

El análisis enzimático de más o menos 250 haploides espontáneos de cacao realizados por Lanaud (1987), puso en evidencia que hay varios procesos relacionados con la formación de haploides. De acuerdo con su estudio hay dos tipos: haploides homogéneos de origen femenino o masculino y haploides quiméricos productos de semigamia, que se define como la fertilización anormal en el cual el núcleo femenino y masculino no se fusionan y se dividen independientemente, dando origen a embriones quiméricos formados por tejido materno y paterno.

Las quimeras haploide/diploide son inestables en los estados iniciales de desarrollo; la parte diploide es heterocigota y quizás una fusión parcial de células de un embrión quimérico conduce a una mezcla de tejido haploide y diploide en ellas. Turcotte y Faester (1973) observaron un

fenómeno igual en algodón (Gossypium barbadense var. Pima.) y propusieron la existencia de divisiones mitóticas suplementarias del núcleo masculino en el saco embrionario antes de la fertilización, el cual está, además, estimulado por la tendencia maternal de la planta para la semigamia. Estos autores demostraron que la semigamia en el algodón está gobernado genéticamente. Este aspecto no se ha estudiado en cacao, pero el sistema de autoincompatibilidad gametofítico y esporofítico puede ser favorable para que se presente la semigamia. Esta actúa sólo en los rudimentos seminales donde la fusión de los gametos está bloqueada, a pesar de la germinación normal del polen.

EL análisis enzimático realizado por Lanaud (1987) permitió demostrar que la mayoría de los haploides de cacao tienen por origen la autofecundación del progenitor hembra ; no se encontró ningún haploide ni individuo homocigoto para todos los loci estudiados.

## 2.2.2 CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS DE LAS ALMENDRAS PLANAS

### DE T. cacao.

Las almendras aplanadas son de pequeño tamaño y forma aplastada. Algunas de ellas son vanas y contienen mucílago. Sin la sarcotesta, el embrión se observa como una masa de forma y peso pequeño. La radícula es muy conspicua, los

cotiledones son de forma y coloración variable y a veces, vestigiales (Dublin. 1973).

### 2.3 IMPORTANCIA DEL CULTIVO in vitro DE EMBRIONES.

A continuación se señalan las aplicaciones prácticas de la técnica de cultivo in vitro de embriones :

- a) Permite la supervivencia de materiales provenientes de hibridaciones interespecíficas ( Alvarez et al. 1981, Bhojwani y Razdan 1983, Braak y Kooistra 1975, Evans 1962, Honma 1955, Litz 1984, Raghavan 1966) e intergenéricas (Bhojwani y Razdan 1983, Mok et al. 1978).
- b) Disminuye los ciclos de mejoramiento genético (Bhojwani y Razdan 1983, Meyer y Justus 1960).
- c) Permite el rescate de embriones haploides (Bhojwani y Razdan 1983; Kasha y Kao 1970; Yeung , Thorpe y Jensen 1981, Lanaud , 1986, 1987 ).
- d) Facilita la determinación de la la viabilidad de las semillas (Bhojwan y Razdan 1983)
- e) Permite estudiar las condiciones fisico-químicas de la embriogénesis cigótica experimental (nutrición, medio ambiente óptimo, etc.) ( Collins y Grocer 1984; Yeung Thorpe y Jensen 1981, Marayanaswami y Nortog 1964, Smith 1973, Larkin 1981) ).

- f) Hace posible la colecta , conservación y distribución de germoplasma y el establecimiento de bancos (Iyer 1982; Adams 1984, 1987 , Whitters 1980, 1984, IBPGR1984) .
- g) Supera las barreras naturales que limitan la germinación inmediata de semillas (latencia, etc.) ( Yeung , Thorpe y Jensen 1981).
- h) Incrementa la tasa de germinación de semillas (Raghavan 1977).

#### 2.4 COMPOSICION DEL MEDIO DE CULTIVO PARA EL DESARROLLO Y CRECIMIENTO IN VITRO DE EMBRIONES DE PLANTAS.

Los medios nutritivos utilizados en el cultivo in vitro de embriones son muy variados (Raghavan 1977) y constituyen uno de los aspectos más importantes a considerar (Raghavan 1976; Yeung, Thorpe y Jensen 1981 Monnier 1976, Nortog 1977, Novak 1976 ).

En la nutrición del embrión Raghavan (1966) reconoce dos fases :

- a) Heterótrofa: se caracteriza por la dependencia del embrión. Este se nutre del endospermo y los tejidos circundantes.
- b. Autótrofa: El embrión es capaz de sintetizar las sustancias necesarias para su crecimiento a partir de las sales minerales básicas y azúcar; por lo tanto, es independiente .

Cada una de estas fases varía con la especie en estudio (Raghavan 1976). En Capsella bursa-pastoris los embriones son heterótrofos hasta el estado globular y pasan a ser autótrofos en las últimas etapas de forma acorazonada. (Raghavan 1976).

Entre las dos fases descritas con anterioridad los requerimientos exógenos de los embriones cultivados se simplifican progresivamente, conforme aumentan en edad (Bhojwani y Razdan 1983). Esto se comprobó en Capsella (Raghavan y Torrey 1963).

El cultivo in vitro de embriones rescatados en la fase autótrofa es más sencilla que la de embriones en estado globular o de corazón temprano. Por lo general, éstos últimos requieren de refinamiento excesivo en el medio de cultivo (Collin y Grocer 1984).

Para el cultivo in vitro de embriones se requieren varios constituyentes básicos, que según Collins y Grosser (1984) son: a) un medio basal (sales minerales y carbohidratos, b) fuentes nitrogenadas, c) reguladores de crecimiento y otros suplementos (vitaminas, leche de coco, ácidos orgánicos, agar, etc).

## 2.5 DESINFECCION DE SEMILLAS Y DISECCION DE EMBRIONES

Un principio básico que debe considerarse al cultivar

embriones in vitro , es la disección aséptica de éstos para luego transferirlos a un medio de cultivo adecuado. Este constituye el primer paso de ésta técnica para la obtención de plantas libres de contaminación, (Raghavan 1977).

Las características morfológicas de las semillas deben considerarse de tal manera, que aquellas con cubiertas seminales duras se esterilizan superficialmente y luego se sumergen en agua por pocas horas o pocos días. En el último caso, es conveniente realizar una segunda desinfección superficial antes de la disección . La asepsia continua con la disección del embrión y la transferencia a un medio nutritivo en una campana de flujo laminar. Finalmente se procede a la extracción del embrión, bajo condiciones asépticas y, se transfiere un medio nutritivo con agar (Yeung, Thorpe y Jensen 1981)

Cuando los embriones extraídos estén ubicados dentro de la semilla se requiere esterilización superficial sólo de los tejidos que lo envuelven .

La desinfección de la semilla se efectúa con una solución al uno por ciento de hipoclorito de sodio (NaClO). Además, se agrega unas gotas de un agente humectante (Tween 80) que proporciona un mejor humedecimiento de la superficie del material para permitir que la solución esterilizante penetre y combata los microorganismos. Para obtener resultados óptimos, las semillas deben colocarse dentro de



ésta solución durante 30 minutos y luego someterlas a varios lavados con agua estéril, colocada en un frasco que se somete a la acción de un agitador magnético en el cuarto de cultivo durante 18 horas (Beelen, 1981).

Un producto muy utilizado para la desinfección de tejidos, previo a su cultivo in vitro, es el blanqueador comercial (Clorox), a base de hipoclorito de sodio ( $\text{NaClO}$ ) cuya concentración es de aproximadamente 5,25% de  $\text{NaClO}$ . Esta concentración se diluye a su quinta o décima parte. Los tejidos se sumergen en la solución del producto por pocos minutos y luego se lavan con agua destilada y estéril para la posterior disección (Beelen 1981).

Cuando se utilizan embriones maduros de cacao Esan (1982) recomienda primero la desinfección de la superficie de la mazorca mediante un lavado con agua tibia a  $35^{\circ}\text{C}$ , al cual se le adicionan unas gotas de líquido antiséptico y una gotas de un detergente, posteriormente las mazorcas se sumergen en una solución de hipoclorito de sodio al 0.5 % (10 % de clorox) durante 15 minutos, procediéndose a cortar la mazorca para extraer los embriones en forma cuidadosa y aséptica. La desinfección propuesta por Pence, Hasegawa y Janick (1979) para la siembra embriones de cacao incluye sólo la desinfección superficial de la mazorca en una solución de hipoclorito de sodio con 0.5 % de  $\text{NaClO}$  más 0.1 % de un surfactante (Tween 20).

## 2.6 CULTIVO DE EMBRIONES DE CACAO

El primer intento para cultivar embriones de cacao in vitro fue hecho por Ibañez (1964). Se utilizó el medio modificado de Rudolph y Cox (1943) y se investigó la acción de diferentes azúcares (sacarosa, dextrosa, maltosa, lactosa y sorbosa) sobre la tasa de respiración de embriones maduros, sin cotiledones, y se encontró que la dextrosa y la sorbosa son utilizados rápidamente, seguido de la sacarosa, mientras que la maltosa y la lactosa parecen inhibir la respiración endógena.

Esan (1975) cultivó diversos tejidos de cacao y concluyó que los ejes embrionales crecen bien en un medio MS con glucosa, sacarosa o ambos. Además, observó que se obtiene un mejor crecimiento en un medio basal solidificado con agar.

Lanaud (1987) realizó un estudio para determinar un medio que favoreciera el crecimiento de los embriones provenientes de semillas planas o poliembriónicas y propuso el siguiente: macroelementos MS, microelementos de Heller, hierro como EDTA, vitaminas de Morel, agar al 0,8 % y el pH ajustado a 5,5. Este medio se suplementó con varios tratamientos de glucosa y reguladores de crecimiento de éste estudio. Lanaud (1987) seleccionó el medio basal con glucosa al 2 %, ya que permitió un buen crecimiento de los embriones con una tasa moderada de formación de callo.

## 2.7 EMBRIOGENESIS SOMATICA

Kato y Kateuchi, 1963 ; Sharp et al., 1980 establecieron dos patrones generales para la embriogénesis in vitro: la iniciación directa a partir de tejido diferenciado y la iniciación indirecta por medio de un callo intermedio. La embriogénesis directa es el resultado de células determinadas como embriogénicas (Kato y Kateuchi 1963). La embriogénesis indirecta requiere desdiferenciación de células, proliferación de callo y diferenciación de células embriogénicas (Kononowicz et al, 1984).

La embriogénesis asexual in vitro a veces ocurre en ausencia de reguladores exógenos (Halpein y Jensen 1967), pero en la mayoría de los casos, requiere la manipulación de un balance hormonal endógeno y exógeno (Gamborg et al., 1970; Kamada y Harada 1979; Jones 1974; Nessler 1982, ).

La embriogénesis somática directa a partir de embriones cigóticos e inmaduros de cacao, se lleva a cabo mediante dos patrones distintos: un proceso de brotes en el cual las células de la epidermis del hipocótilo desarrollan una simulación de los estados normales de embriogénesis, incluyendo el desarrollo de un suspensor ( Pence et al., 1979, Essan 1982; ) y un proceso en el que no hay brotes, en donde la diferenciación de embriones es a partir de tejido cotiledonar meristemático interno. La embriogénesis somática directa se presenta en bajas frecuencias, en un medio basal.

Si se adiciona auxinas (AIA, ANA, o 2,4-D) y agua de coco se estimula el proceso embriogénico (Pence et al., 1979).

Los procesos de brotación continúa a partir de embriones asexuales y, en algunos cultivos, sigue proliferando en un medio sin reguladores.

La formación de callo en cacao puede iniciarse a partir de varios tejidos como hojas (Pence et al., 1979; Searles et al.; 1976), frutas (Searles et al. 1976), plántulas (Hall y Collins 1975) y embriones cigóticos (Hall y Collins 1975 ; Pence et al. 1979; Tsai y Kinsella 1981).

La embriogénesis somática por intermediación de callo en cacao fue descrita, primeramente por Kononowicz et al., (1984). Este proceso morfogénico se presentó en dos clones de cacao empleando, el medio MS libre de reguladores; sin embargo, bajo estas condiciones, la embriogénesis se presentó con una frecuencia bastante baja . Los estudios histológicos hechos en esa investigación estudio, sugieren que hay diferencias entre la embriogénesis directa e indirecta y se presenta en los estados iniciales de desarrollo. Durante la embriogénesis directa, los brotes del hipocotilo son de forma globular, de 4 células y se conectan al hipocótilo por medio de estructuras semejante a un suspensor, compuesto de 3 a 4 células (Pence et al.,1979). El desarrollo posterior es similar al del embrión cigótico (globular, forma de corazón, torpedo y finalmente

cotiledonar). Los callos embriogénicos pueden ser homogéneos mediante la combinación de 10 % de agua de coco y  $1.0 \text{ mg.l}^{-1}$  de 2,4-D o puede incrementarse su frecuencia embriogénica con 2,4-D a  $10^{-3} \text{ mg.l}^{-1}$ .

Kononowiz (1984) señala que el precursor inicial y los estados tempranos de embriones sexuales no han sido identificados en forma absoluta y las estructuras semejantes al suspensor podrían no reconocerse hasta el estado globular de desarrollo.

Novak et al., (1985) lograron regenerar estructuras embriogénicas completas, en un medio MS con 1 uM de zeatina y 0.01 uM de ANA. Transferencias posteriores a un medio igual indujeron la embriogénesis secundaria sobre la superficie de embriones somáticos primarios. El desarrollo de los embriones somáticos tuvo lugar en un medio MS con caseína hidrolizada y ausencia o presencia de auxina. En este estudio se obtuvieron 5 plántulas que fueron trasladadas a un sustrato de perlita pero no se menciona el comportamiento en estas condiciones.

## **2.8 Cultivo de cacao en suspensión celular**

El cultivo en suspensión celular, consiste de células o grupos de células dispersa en un medio de cultivo líquido. Estas células libres o grupos de células derivan de un callo

friable el cual se transfiere al medio líquido en continúa agitación (Dixon, 1985) . Con esta técnica hay un intercambio gaseoso continuo entre el medio de cultivo y la atmósfera del mismo, además las células tienen un fácil acceso a los nutrientes en el medio por encontrarse en condiciones muy similares (Beelen, 1981).

Desde el punto de vista de la micropropagación, las suspensiones celulares podrían proveer una multiplicación estremadamente rápida mediante la formación de embriones somáticos (embrioides) los cuales serían transferidos a condiciones que favorezcan su desarrollo.

El cultivo de células en suspensión fue establecida exitosamente a partir de callos de cotiledones de cacao por Hall y Collins, (1975) y Tsai y Kinsella, (1981). La suspensión mantuvo una fase inicial de poco crecimiento y alcanzando un máximo alrededor de los 20 días, con un peso seco total de 450 mg en 60 ml de medio MS suplementado con AIA ( $2 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ ) IBA ( $2 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ ), cinetina ( $0.1 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ ) y agua de coco (10 %) (Hall y Collins, 1975).

Tsai y Kinsella (1981) emplearon un medio MS modificado y suplementado con 2,4-D ( $1 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ ) , glicina ( $2 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ ) y cinetina ( $0.2 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ ) obteniendo una ganancia de peso fresco y seco de 20 veces en 14 días.

### 3. MATERIALES Y METODOS

#### 3.1 Localización del estudio.

El trabajo se realizó en la Unidad de Biotecnología del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE), Turrialba, Costa Rica, durante noviembre de 1987 a agosto de 1988.

#### 3.2 Material experimental.

Se utilizaron genotipos de la colección de cacao de la unidad de Recursos Fitogenéticos del Programa de Mejoramiento de Cultivos Tropicales del CATIE.

#### 3.3 Medios de cultivo para el rescate de embriones provenientes de semillas aplanadas de cacao.

Se empleo el medio básico de Murashige y Skoog (MS, 1962) (cuadro 1) suplementado con  $1 \text{ mg.l}^{-1}$  de tiamina HCL  $1 \text{ mg.l}^{-1}$  piridoxina-HCL,  $1 \text{ mg.l}^{-1}$  de ácido nicotínico,  $4 \text{ mg.l}^{-1}$  glicina,  $200 \text{ mg.l}^{-1}$  de inositol,  $40.000 \text{ g.l}^{-1}$  de sacarosa,  $1.5 \text{ g.l}^{-1}$  de gelrite-TM (Kelko). En un primer experimento se realizaron 7 tratamientos 5 de los cuales estuvieron constituidos con las siguientes concentraciones de caseína hidrolizada ( $\text{mg.l}^{-1}$ ) 0, 200, 400, 600 y 1000 conteniendo

en todos los casos  $200 \text{ mg.l}^{-1}$  de glutamina.

En un segundo experimento se analizaron cuatro concentraciones de glutamina (en  $\text{mg.l}^{-1}$ ): 0, 200, 400 y 600, se mantuvo una concentración constante de  $200 \text{ mg.l}^{-1}$  de caseína hidrolizada, En forma adicional, se probaron tres variantes del medio de cultivo : a) sales completas de MS; b) sales completas MS más agua de coco al 10 % y c) sales MS más  $200 \text{ mg.l}^{-1}$  de glutamina y  $1000 \text{ mg.l}^{-1}$  de caseína hidrolizada. (cuadro 1 y 2).

El pH se ajustó a 5.7 con NaOH 0.1 N antes de agregar el gelrite y se vertió 15 ml de medio de cultivo por tubo de ensayo de 15 cm por 2.5 cm. Estos fueron esterilizados en autoclave durante 20 minutos a  $121 \text{ }^{\circ}\text{C}$  ( $1.1 \text{ kg}$  de presión / $\text{cm}^2$  ).

### 3.4 Desinfección superficial de las semillas , aislamiento y cultivo in vitro de embriones

Se utilizaron los siguientes híbridos para el aislamiento en embriones:

'UF 613 X POUND-7, UF 668 X IMC-67, POUND 7 X UF 668, POUND 7 X UF 667, UF 296 X CC18, EET 62 X SCA 6, UF 613 X POUND 12, UF 667 X SCA 12, UF 662 X IMC 67, UF 612 X SPA 31, UF 29 X UF 667, EET 48 X SCA 6, POUND 7 X UF 613, POUND 7 X UF 16, UF 29 X POUND 7, POUND 12 X CATONGO, UF 668 X IMC 67, CATONGO X POUND 7, UF 668 X IMC 67, POUND 7 X UF 668 SPA 9 X UF 613'.



Cuadro 1. Composición del medio de cultivo básico de Murashige y Skoog (1962).

COMPONENTES	CONCENTRACION	
	mg l <sup>-1</sup>	moles
<b>Macroelementos</b>		
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650.00	20.60
KNO <sub>3</sub>	1900.00	18.79
CaCL <sub>2</sub> . 2H <sub>2</sub> O	440.00	2.99
MGSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	370.00	1.50
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170.00	1.25
NA <sub>2</sub> EDTA	37.30	0.11
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	27.80	0.075
<b>Microelementos</b>		
		μmol
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.20	100.00
MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	22.30	99.00
ZnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	8.60	29.00
KI	0.83	4.90
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.25	1.03
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0.025	1.00
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0.025	1.05
<b>Compuestos orgánicos</b>		
Inositol	100.00	555.00
Acido nicotínico	0.50	0.406
Piridoxina-HCl	0.50	2.43
Tiamina-HCl	0.10	0.296
Glicina	2.00	26.64

Cuadro 2. Composición de los medios de cultivo utilizados para el rescate de ejes embrionales en cacao con diferentes dosis de caseína hidrolizada.

MEDIO DE CULTIVO	DOSIS DE CASEINA HIDROLIZADA mg.l <sup>-1</sup>
1. MS completo	0
2. Sales MS *	0
3. Sales MS	200
4. Sales MS	400
5. Sales MS	600
6. MS completo + 1000 mg.l <sup>-1</sup> inositol	1000
7. MS completo + agua de coco al 10 %.	0

\* Las sales MS de los tratamientos 2,3,4 y 5 contenían en (mg.l<sup>-1</sup>), 1 de tiamina-HCl, 1 de piridoxina, 1 de ácido nicotínico, 4 de glicina, 200 de inositol, 200 de glutamina, 40,000 de sacarosa y 1,500 de gelrite.

Cuadro 3. Composición de los medios de cultivo utilizados para el rescate de ejes embrionales de cacao. con diferentes dosis de glutamina.

MEDIO DE CULTIVO	DOSIS DE GLUTAMINA mg.l <sup>-1</sup>
1. MS completo	0
2. Sales MS*	0
3. Sales MS	200
4. Sales MS	400
5. Sales MS	600
6. MS completo + 1000 mg.l <sup>-1</sup> de inositol**	0
7. MS completo + agua de coco al 10 %.	0

\* Las sales MS de los tratamientos 2,3,4 y 5 contenían ( en g.l<sup>-1</sup>) : 1 de tiamina-HCl, 1 de piridoxina, 1 de ácido nicotínico, 4 de glicina, 200 de inositol, 200 de caseína hidrolizada 40,000 de sacarosa y 1500 de gelrite.

\*\* Enriquecido con 1000 mg.l<sup>-1</sup> de caseína hidrolizada.

Las semillas provenientes de mazorcas maduras se llevaron al laboratorio y se les removió la sarcotesta. Luego se sumergieron en Clorox (blanqueador comercial a base de hipoclorito de sodio al 5 %), diluido al 50 %. A esta solución se le adicionó un detergente no iónico (Tween 20) al 1 % y se agitó durante 15 minutos, en un agitador magnético. Luego en una cámara de flujo laminar el material se lavó tres veces con agua destilada estéril. La disección del embrión se realizó en condiciones asépticas. El eje embrionario se separó de los cotiledones y se utilizó como explante.

Después de la siembra, los embriones se colocaron en una cámara de crecimiento con un fotoperiodo de 16 horas, una temperatura de  $27 \pm 2$  °C durante el día y  $23 \pm 2$  °C durante la noche y una intensidad lumínica de 2000 lux proporcionada con lámparas fluorescentes.

#### 3.4.1 Cultivo in vitro de embriones provenientes de semillas aplanadas de cacao.

Se separó las semillas aplanadas de las semillas normales, se removió la sarcotesta y se desinfectó según el procedimiento descrito con anterioridad. El medio utilizado (en  $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ ) consistió en: sales de Murashige y Skoog (1962), 1 de tiamina HCl, 1 de piridoxina HCl, 1 de ácido nicotínico, 4 de glicina, 200 de inositol, 200 de caseína

hidrolizada, 200 de glutamina, 40000 de sacarosa y 1500 de gel rite TM (marca Kelko). Se dispensaron 15 ml de medio en tubos de 15 cm X 2.5 mm y se mantuvieron en las condiciones descritas anteriormente.

Cuando las plántulas desarrollaron el segundo par de hojas hasta alcanzar una longitud de 3 a 4 cm de lámina foliar se transfirieron a un medio MS diluido al 50 % donde se mantuvieron en las mismas condiciones durante 15 días. Luego se trasladaron al invernadero bajo riego con nebulizadores de 12 segundos cada hora.

### 3.5 Microscopía electrónica de ratreo.

Los embriones provenientes de semillas aplanadas que presentaron organogénesis in vitro se procesaron para microscopía electrónica de rastreo. Para ello se seleccionaron muestras de hipocotilo y cotiledones y se fijaron en glutaraldehido al 2 % durante 3 horas, seguido de tres lavados en buffer de fosfatos, de 10 minutos cada uno . Se efectuó una posfijación en tetróxido de osmio al 2 %, seguido de tres lavados con buffer de fosfato . Las muestras se deshidrataron en una serie ascendente de etanol y se secaron en un secador de punto crítico marca Hitachi HCP2 ; se colocaron en bases de aluminio utilizando pintura de plata y se cubrieron con oro con un cobertor iónico marca Hitachi-IB3. Finalmente se observaron en un microscopio

electrónico de rastreo marca Hitachi 5570.

### 3.6 Determinación del nivel de ploidía.

Para realizar el conteo de cromosomas somáticos en ápices del vástago se utilizó el método de aplastado ("squash") con aceto-carmin, en plántulas de 2 meses de edad. Consta de las siguientes etapas.

- a) Se fija el tejido en alcohol- ácido acético durante 24 horas o durante 15 minutos a 60 °C.
- b) Se lava el tejido con agua destilada durante 30 minutos.
- c) Se transfiere el tejido a una gota de colorante acetocarmin.
- c) Se corta y desecha el material excepto 1 a 2 mm finales del ápice
- d) Se macera el tejido con una aguja o una varilla de vidrio con extremo redondeado y se coloca una gota de colorante fresco.
- e) Se agrega trazas de sulfato amónico ferroso.
- f) Se calienta sobre la llama, sin dejarlo hervir luego se absorbe el líquido sobrante con papel secante.
- g) Se coloca un cubreobjetos limpio sobre la preparación.
- h) Se observa en un microscopio con lente de inmersión de 100 X con objetivo de 20 .

### 3.7. inducción de callo y morfogénesis a partir de cotiledones de semillas aplanadas de cacao.

En este estudio se utilizaron cotiledones de semillas aplanadas del híbrido POUND 12 X CATONGO 11. La composición del medio estuvo constituido (en  $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ) por sales minerales MS ,0.1 de tiamina, 0.5 de ácido nicotínico, 0.5 de piridoxina HCl, 0.1 de tiamina-HCl, 2 de glicina, 100 de inositol, 30,000 de sacarosa , 7000 de agar Los tratamientos consistieron en :

1. MS completo
2. MS completo +  $1\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  de ANA (ácido naftalen acético) +  $1\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  +  $3\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  de BA.
3. MS completo +  $1\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  de ANA +  $3\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  de BA.
4. MS completo +  $1\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  de 2,4-D.

El medio de cultivo donde se hizo crecer el cotiledón se vertió en tubos de 11 cm x 2.5 cm con 15 ml de medio basal. Estos se colocaron bajo una intensidad lumínica de 2000 lux provenientes de lámparas fluorescentes. El fotoperiodo fue de 16 horas y la temperatura de  $27^{\circ}\text{C}$ .

Los medios de cultivo permanecieron en las condiciones descritas durante 21 días y más tarde se subcultivaron sobre

un medio fresco.

21 días después del primer subcultivo, se dividieron los callos en porciones aproximadas de 10 mm<sup>2</sup> y se colocaron en 5 medios diferentes que contenían citocininas, al mismo tiempo se eliminaron las auxinas para ser utilizado como medio de regeneración.

Un 50 % de los callos provenientes del tratamiento MS completo + 1 mg·l<sup>-1</sup> de ANA + 1 mg·l<sup>-1</sup> de BA se transfirieron a ese medio carente de auxinas pero enriquecido con 2000 mg·l<sup>-1</sup> de un hidrolizado de caseína . El otro 50 % se subcultivó en el mismo medio y se sustituyó el BA por 1 mg·l<sup>-1</sup> de 2iP (2-Isopentenil adenina).

Los callos provenientes del tratamiento con 1 mg·l<sup>-1</sup> de ANA y 3 mg·l<sup>-1</sup> de BA fueron subcultivados en el mismo medio sin auxinas y enriquecido con 2000 mg·l<sup>-1</sup> de caseína hidrolizada.

Los callos cultivados en el medio MS más 2,4-D se subcultivaron en dos medios distintos. 50% de esos callos se transfirieron al mismo medio, sin el 2,4-D, pero enriquecido con agua de coco. El otro 50 % de los callos se subcultivaron en el mismo medio, sin reguladores de crecimiento , con 2000 mg·l<sup>-1</sup> de caseína hidrolizada.

Cuadro 4. Composición de los medios de cultivo utilizados en la inducción de callo y morfogénesis a partir de cotiledones de semillas aplanadas de cacao (*T. cacao*. L.)

MEDIO BASICO	REGULADORES DE CRECIMIENTO (MG·l <sup>-1</sup> )			
	ANA	2,4-D	BA	2iP
<b>Inducción</b>				
MS	0	0	0	
MS	1	0	1	
MS	1	0	3	
MS	0	1	0	
<b>Fase de desarrollo *</b>				
MS	0	0	1	
MS	0	0	0	1
MS	0	0	3	
MS	0	0	0	**
MS	0	0	0	

\*\* A todos los medio de la fase de desarrollo se le adicionó 2000 mg·l<sup>-1</sup> de un hidrolizado de caseína.

\*\* Se le adicionó agua de coco al 10 %.



### 3.8 Cinética de crecimiento de callos inducidos a partir de cotiledones de cacao

Se utilizaron secciones de cotiledones de 0,3 g promedio, provenientes de mazorcas de 6 meses de edad, del híbrido 'POUND 12 X CATONGO'. Las semillas a las cuales se les removió la sarcotesta fueron esterilizadas superficialmente en una solución de hipoclorito de sodio al 2,5 a esta solución se le adicionó Tween 20 al 1 % y se mantuvo en agitación continua en un agitador magnético durante 15 minutos. El material se trasladó a una cámara de flujo laminar en donde se lavó tres veces con agua destilada estéril. El cotiledón se disectó asépticamente en 4 secciones cada una de las cuales se sembró en un tubo de cultivo de 11 cm x 2.5 cm conteniendo el medio basal MS. Se estudió el efecto de 2,4-D, agua de coco y caseína hidrolizada sobre la inducción y crecimiento del callo, en los siguientes tratamientos; a) 2,4-D ( $1 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ ), b) 2,4-D ( $1 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ ) + CH ( $2000 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ ), c) 2,4-D ( $1 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ ) + AC (10 %) V/V y d) 2,4-D ( $1 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ ) + CH ( $2000 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ ) + AC (10 %). Los cultivos fueron incubados durante 7 semanas en una cámara de crecimiento con un fotoperiodo de 16 horas, una temperatura de  $27 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$  y una intensidad lumínica de 2000 lux. La tasa de crecimiento del callo fue evaluada mediante el peso fresco y el peso seco semanalmente. El peso fresco se obtuvo pesando el callo inmediatamente después que se removió el agua adherida con papel filtro y el peso seco se obtuvo después de secar el callo a  $80 \text{ }^{\circ}\text{C}$  por 24 horas.

### 3.9 Establecimiento y crecimiento del cultivo de células en suspensión.

El cultivo de células en suspensión se inició con la transferencia aséptica de una porción de callo friable de aproximadamente 0,5 g de peso fresco a un Erlenmeyer de 125 ml conteniendo 30 ml de medio líquido MS. Este callo friable se obtuvo a partir de cotiledones de mazorcas maduras de cacao cultivadas en un medio MS con 2,4-D ( $1 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ ) + CH ( $2 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ ) + AC (10% V/V). En cultivos de células en suspensión se estudiaron 4 tratamientos: a) 2,4-D ( $1 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ ) b) 2,4-D ( $1 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ ) + CH ( $2000 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ ) c) 2,4-D ( $1 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ ) + AC (10 %) y d) 2,4-D ( $1 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ ) + CH ( $2000 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ ) + AC (10 %).

El callo friable transferido al medio líquido fue incubado a una temperatura de  $27 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$  en un agitador rotatorio Bellco Glass con agitación continua a 100 rpm lo que provocó la disociación del callo y la producción de una suspensión celular, que fue filtrado en una malla de  $95 \mu$  7 días después de establecida la suspensión. El filtrado se transfirió a tubos cónicos de 15 ml de capacidad que fueron colocados en una centrifuga Dynac II Clay Adams a 1000 rpm durante 5 minutos. El líquido supernatante se decantó asépticamente, transfiriéndose las células y agregados celulares a un medio fresco. La suspensión se subcultivo

cada dos semanas, transfiriendo una alícuota de 1 ml a 30 ml de medio fresco. La tasa de crecimiento de la suspensión se obtuvo mediante la determinación del peso fresco y el peso seco semanalmente. El peso fresco se determinó de alícuotas de 1 ml de la suspensión celular, el peso seco se cuantificó transfiriendo la alícuota a un papel de filtro después de su secado a 80 °C por 24 horas.

### 3.10 Análisis estadísticos del estudio.

Para determinar el medio que permite el rescate y desarrollo de embriones provenientes de semillas planas, se utilizó un diseño completamente aleatorio. Se analizaron 7 tratamientos en dos ensayos. En el primer ensayo se evaluaron diferentes dosis de glutamina con el híbrido de cacao 'EET 95 X SCA 6' y en el segundo ensayo se evaluaron diferentes dosis de caseína hidrolizada. Este segundo ensayo se realizó con el híbrido 'POUND 7 x UF 613'. En cada uno de los ensayos se utilizaron 4 repeticiones con 10 embriones por unidad experimental. Los embriones utilizados fueron desprovistos de sus cotiledones para aproximarlos a las características morfológicas de los embriones provenientes de las semillas aplanadas.

El efecto de diferentes reguladores de crecimiento sobre la inducción de callo se estudió mediante un diseño

completamente aleatorio con 4 tratamientos y 5 repeticiones. Cada unidad experimental estuvo constituida por 10 tubos de cultivo con secciones de cotiledón del híbrido 'POUND 12 X CATONGO' .

Para la fase de desarrollo se emplearon 5 tratamientos y 4 repeticiones ordenados en un diseño completamente aleatorio con 10 tubos de cultivo por unidad experimental.

En el cultivo de células en suspensión se utilizaron 4 tratamientos y 6 repeticiones en un diseño completamente aleatorio.

#### 3.10.1. Variables medidas en el embrión.

1. Las variables medidas en cada embrión fueron las siguientes:

- a) Supervivencia ( % )
- b) Número de hojas
- c) Longitud de la lámina foliar más peciolo (mm)
- f) Longitud del epicotilo (mm)
- g) Longitud del eje hipocotilo-radicular (mm)
- h) Número de raíces laterales.
- i) Presencia de callo

Estas variables fueron cuantificadas cada 7 días hasta completar 35, con el fin de elaborar curvas de crecimiento

y determinar así un medio que permitiera el rescate y un rápido desarrollo de los embriones de cacao provenientes de semillas planas . "

### 3.10.2. Inducción de callo.

Los explantes se evaluaron cada 7 días con base en los siguientes parámetros

- a) Area del callo, derivado de dos diámetros, el más largo y el perpendicular a éste dividido entre 4 (Area callo= $D1.D2/4$ . (Kononowicz, 1984)
- b) Estructura del callo.
- c) Color del callo.
- e) Presencia o ausencia de estructuras globulares.

### 3.10.3 Cinética de crecimiento y cultivos en suspensión celular.

Las variables evaluadas fueron:

- a) Peso fresco (g)
- b) Peso seco (g).
- c) Morfología de las células en suspensión.

### 3.10.4 Procesamiento de la información.

#### 3.10.4.1. Análisis de varianza.

Los análisis de varianza se realizaron con la ayuda del Centro de Cómputo del CATIE, utilizando el programa SAS.

El modelo estadístico que consideró los 7 medios de cultivo para el rescate de embriones fue un diseño completamente aleatorio, con la siguiente fórmula:

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

En donde

$Y_{ij}$  = variable de respuesta

$U$  = media general

$M_i$  = efecto del medio de cultivo

$E_{ij}$  = error experimental.

El análisis de varianza se estructuró de la siguiente forma:

FUENTE DE VARIACION		GRADOS DE LIBERTAD	
M	Medio de cultivo	(M-1)	6
E	Error experimental	M(r-1)	21

Las fases de inducción y desarrollo del callo se establecieron bajo el siguiente modelo:

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

en donde:

$Y_{ij}$  = Area del callo

$U$  = Media general

$M_i$  = Efecto del medio de cultivo

$E_{ij}$  = Error experimental.

Correspondió a este estudio el siguiente análisis de varianza:

FUENTE DE VARIACION		GRADOS DE LIBERTAD	
M	Medio de cultivo	(M-1)	3
E	Error experimental	M( r-1)	12

El modelo estadístico que correspondió a la cinética de crecimiento de callo a partir de cotiledones de cacao fue el siguiente:

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

en donde

$Y_{ij}$  = Peso fresco o peso seco del callo

$U$  = Media general.

$E_{ij}$  = Error experimental

El análisis de varianza correspondiente a éste estudio fue el siguiente:

FUENTE DE VARIACION		GRADOS DE LIBERTAD	
M	Medio de cultivo	M-1	3
E	Error experimental	M (r-1)	12

El modelo estadístico que considera el efecto de 2,4-D, 2,4-D + CH, 2,4-D + AC y 2,4-D + AC + CH sobre el cultivo de células en suspensión es el siguiente:

$$Y_{ij} = U + M_i + E_{ij} \text{ en donde :}$$

$Y_{ij}$  = Peso fresco o peso seco de las células o agregados celulares

$U$  = Media general

$M_i$  = Efecto del 2,4-D, AC y CH.

$E_{ij}$  = Error experimental.

El análisis de varianza correspondiente es de la siguiente forma:

FUENTE DE VARIACION		GRADOS DE LIBERTAD	
M	Medio de cultivo	M-1	3
E	Error experimental	M(r-1)	20

#### 3.10.4.2. Prueba de Duncan.

Para detectar la significancia estadística entre los promedios de cada variable evaluada, se utilizó la prueba de Duncan al nivel del 0.05 % de probabilidad.



## 4. RESULTADOS

4.1 Evaluación del crecimiento de ejes embrionales de cacao de los híbridos 'EET 95 x SCA 6 y POUND 7 X UF 613' bajo la influencia de siete medios de cultivo durante un periodo de cinco semanas.

### 4.1.1. Porcentaje de sobrevivencia

El análisis de varianza mostró diferencias significativas como respuesta a los diferentes medios de cultivo para el híbrido 'POUND 7 X UF 613', cuyos porcentajes de sobrevivencia variaron de 57,50 a 85 (cuadro 6) Los porcentajes finales registrados a los 35 días fueron de 52,50 a 82,50.

El estudio con el híbrido 'EET-95 X SCA-6' no mostró diferencias estadísticas durante los 35 días. Los porcentajes de sobrevivencia registrados en la primera semana oscilaron de 95 a 82,50 (cuadro 5); a los 35 días estos porcentajes disminuyeron hasta alcanzar valores de 67,50 a 85,00%

### 4.1.2. Longitud del eje hipocotilo-radicular

Los cuadros 5 a 14 indican la respuesta significativa a los diferentes medios de cultivo, tanto para el híbrido 'EET-95 X SCA-6' como para el 'POUND-7 X UF-613'. Para el

Cuadro 5. Promedio de las variables del porcentaje de sobrevivencia longitud hipocotilo-radicular y número de raíces laterales en ejes embrionales de cacao del híbrido EET-95 X SCA-6 cultivados en 7 medios durante 7 días.

Medio cultivo Glutamina (mg)	Porcentaje de sobrevivencia	D\1	Longitud hipoc-raiz (cm)	D	Número raíces laterales	D
MS	87,50	a	3,07	a	0,96	b
Sales MS/2	95,00	a	3,60	ab	3,36	a
MS + 200	92,50	a	3,83	a	0,93	b
MS + 400	90,00	a	3,82	a	0,61	b
MS + 600	80,00	a	3,72	a	1,04	b
MS/3	82,50	a	3,48	ab	1,18	b
MS+AC	87,50	a	3,32	ab	0,88	b

1. Prueba Duncan, en donde los valores promedios con la misma letra no difieren entre sí estadísticamente ( $P \leq 0.05$ ).
2. Las vitaminas, inositol y sacarosa modificados.
3. Se adicionó 1000 mg.l-1 de inositol.

Cuadro 6. Promedio de las variables del porcentaje de sobrevivencia longitud hipocotilo-radicular y número de raíces laterales en ejes embrionales de cacao del híbrido POUND-7 X UF-613 cultivados en 7 medios durante 7 días.

Medio cultivo Caseína (mg)	Porcentaje de sobrevivencia	D\1	Longitud hipoc-raiz (cm)	D	Número de raíces laterales	D
MS	85,00	a	3,38	b	0,20	b
Sales MS/2	67,50	b	3,58	ab	1,31	ab
MS + 200	62,50	b	3,94	ab	0,94	ab
MS + 400	57,50	b	4,05	a	0,31	b
MS + 600	57,50	a	4,19	a	0,63	b
MS/3	85,00	a	3,75	ab	0,55	b
MS + AC	85,00	a	3,70	ab	2,06	a

1. Prueba Duncan, en donde los valores promedios con la misma letra no difieren entre sí estadísticamente ( $P \leq 0.05$ ).
2. Las vitaminas, inositol y sacarosa modificados.
3. Se adicionó 1000 mg.l-1 de inositol.

primer híbrido, la mayor longitud hipocotilo-radicular se obtuvo con el medio MS modificado y enriquecido con  $200 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  de glutamina en la primera semana. Este comportamiento se mantuvo durante los 35 días.

La mayor respuesta morfogénica para el híbrido POUND-7 X UF-613 se obtuvo con un medio MS modificado y enriquecido con  $600 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  de CH. No hubo diferencias significativas con  $200$  y  $400 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  con CH y la respuesta se mantuvo hasta la evaluación final realizada a los 35 días (Cuadro 14).

#### 4.1.3. Longitud del epicotilo.

El híbrido EET 95 X SCA 6 respondió significativamente al medio MS modificado y enriquecido con  $200 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  de glutamina; este comportamiento se mantuvo durante todo el periodo de observación (Cuadro 13).

En el híbrido POUND-7 X UF-613 hubo una mayor respuesta a los medios MS modificados y enriquecidos con caseína hidrolizada, registrándose la mayor longitud del epicotilo con  $200 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ .

#### 4.1.4. Número de hojas

Se determinó el número de hojas a partir de la segunda semana después de la siembra. En esta fecha, el híbrido 'POUND-7 X UF-613' registró el mayor número de hojas en el medio MS modificado y enriquecido con  $200 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  de CH

Cuadro 7. Promedio de las variables del porcentaje de sobrevivencia longitud hipocotilo-radicular, longitud del epicotilo, número y longitud de hojas y número de raíces en ejes embrionales de cacao del híbrido EET-95 X SCA-6 cultivados in vitro durante 14 días en 7 medios de cultivo.

Medio cultivo	Porcentaje de sobrevivencia	D\1	Longitud hipoc-raíz (cm)	D	Longitud epicotilo (cm)	D	Número hojas	D	Longitud hoja\2 (cm)	D	Número raíces laterales	D
MS	87,50	a	3,34	b	0,07	b	0,00	c	0,00	b	2,07	a
Sales MS\3	87,50	a	4,16	a	0,06	a	0,79	b	0,19	ab	4,50	a
MS + 200	87,50	a	4,31	ab	0,36	ab	1,59	a	0,31	a	3,00	a
MS + 400	87,50	a	4,34	ab	0,32	ab	1,36	ab	0,24	a	0,66	a
MS + 600	85,00	a	4,28	ab	0,30	ab	1,19	ab	0,22	a	1,83	a
MS\4	80,00	a	3,79	b	0,05	b	0,00	c	0,00	b	4,03	a
MS + AC	80,00	a	3,51	b	0,07	b	0,00	c	0,00	b	2,38	a

1. Prueba Duncan, en donde los valores promedios con la misma letra no difieren entre sí estadísticamente ( $P \leq 0.05$ )
2. Longitud del peciolo más la lámina foliar.
3. Las vitaminas, inositol y sacarosa modificados.
4. Se adicionó 1000 mg .l-1 de inositol.

Cuadro 8. Promedio de las variables del porcentaje de sobrevivencia longitud hipocotilo-radicular, longitud del epicotilo, número y longitud de hojas y número de raíces en ejes embrionales de cacao del híbrido POUND-7 X UF-613 cultivados in vitro durante 14 días en 7 medios de cultivo.

Medio cultivo	Porcentaje de sobrevivencia	D	Longitud hipoc-raíz (cm)	D	Longitud epicotilo (cm)	D\1	Numero hojas	D	Longitud hojas\2 (cm)	D	Numero raíces laterales	D
MS	80,00	a	4,40	c	0,00	c	0,28	b	0,19	b	4,40	c
Sales MS/3	62,5	b	5,00	bc	0,18	bc	1,20	ab	0,14	b	5,00	bc
MS + 200	60,00	b	5,63	ab	0,33	ab	1,88	a	0,24	b	5,63	ab
MS + 400	57,50	b	6,23	a	0,48	a	2,29	a	0,21	b	6,23	a
MS + 600	57,50	b	6,16	a	0,33	ab	1,38	ab	0,19	b	6,16	a
MS/4	82,50	a	4,55	c	0,19	bc	0,64	b	0,24	b	4,55	c
MS + AC	85,00	a	4,84	bc	0,27	b	1,26	ab	0,60	a	4,84	bc

1. Prueba Duncan, en donde los valores promedios con la misma letra no difieren entre sí estadísticamente ( $P \leq 0.05$ )
2. Longitud del peciolo más la lámina foliar.
3. Las vitaminas, inositol y sacarosa modificados.
4. Se adicionó 1000 mg.l-1 de inositol.

Cuadro 9. Promedio de las variables del porcentaje de sobrevivencia, longitud hipocotilo-radicular, longitud del epicotilo, número y longitud de hojas y número de raíces en ejes embrionales de cacao del híbrido EET-95 X SCA-6 cultivados *in vitro* durante 21 días en 7 medios de cultivo.

Medio cultivo	Porcentaje de sobrevivencia	D\i	Longitud hipoc-raíz (cm)	D	Longitud epicotilo (cm)	D	Número hoja\2 (cm)	D	Longitud hoja (cm)	D	Número raíces laterales	D
MS	85,00	a	3,59	b	0,09	b	0,26	b	0,21	c	2,79	a
Sales MS/3	87,50	a	4,40	a	0,71	a	1,89	a	1,08	ab	5,74	a
MS + 200	82,50	a	4,52	a	0,58	a	1,77	a	1,51	a	4,57	a
MS + 400	85,00	a	4,54	a	0,49	ab	1,62	a	0,69	bc	3,18	a
MS + 600	72,50	a	4,49	a	0,09	ab	1,71	a	1,01	ab	4,76	a
MS/4	80,00	a	4,14	ab	0,08	b	0,39	b	0,13	c	4,70	a
MS + AC	82,50	a	3,63	b	0,10	b	0,31	b	0,20	c	2,75	a

1. Prueba Duncan, en donde los valores promedios con la misma letra no difieren entre sí estadísticamente ( $P \leq 0.05$ )
2. Longitud del peciolo más la lámina foliar.
3. Las vitaminas, inositol y sacarosa modificados
4. Se adicionó 100 mg.l-1 de inositol.

Cuadro 10. Promedio de las variables del porcentaje de sobrevivencia, longitud hipocotilo-radicular, longitud del epicotilo, número y longitud de hojas y número de raíces en ejes embrionales de cacao del híbrido POUND-7 X UF-613 cultivados *in vitro* durante 21 días en 7 medios de cultivo.

Medio cultivo	Porcentaje de sobrevivencia	D\i	Longitud hipoc-raíz (cm)	D	Longitud epicotilo (cm)	D	Número hojas	D	Longitud hojas (cm)	D	Número raíces laterales	D
MS	80,00	a	4,54	c	0,18	b	0,18	d	0,10	b	5,24	a
Sales MS/3	62,50	b	5,27	bc	0,33	b	1,50	c	0,61	ab	4,45	ab
MS + 200	60,00	b	5,83	ab	0,41	ab	1,88	bc	0,52	ab	2,84	ab
MS + 400	55,00	b	6,48	a	1,22	a	2,46	ab	0,61	ab	3,11	ab
MS + 600	55,00	b	6,03	ab	0,46	ab	1,90	bc	0,91	a	0,50	b
MS/4	80,00	a	5,29	bc	0,26	b	1,31	c	0,41	ab	2,22	ab
MS + AC	85,00	a	5,02	c	0,43	ab	2,76	a	0,92	a	5,62	a

1. Prueba Duncan, en donde los valores promedios con la misma letra no difieren entre sí estadísticamente ( $P \leq 0.05$ ).
2. Longitud del peciolo más la lámina foliar.
3. Las vitaminas, inositol y sacarosa modificados
4. Se adicionó 100 mg.l-1 de inositol.

(Cuadro 8) a pesar de que no se registró diferencias significativas en los medios que contenían 400 y 600  $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$  de CH.

En el híbrido 'EET-95 X SCA-6' se obtuvo un mayor número de hojas con el medio MS modificado y enriquecido con 200  $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$  de glutamina, sin que se registraran diferencias significativas entre este medio y aquellos con 400 y 600  $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$  (Cuadro 7).

#### 4.1.5. Longitud de las hojas

La primera evaluación de las hojas se efectuó a los 14 días registrándose la mayor longitud en el medio enriquecido con 200  $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$  de CH; estos valores se mantuvieron durante los 35 días (Cuadro 13). La respuesta obtenida en el híbrido 'EET-95 X SCA-6' fue significativa en los diferentes medios estudiados. A pesar de que al inicio se obtuvo la mayor longitud en el medio MS con agua de coco (10 %), la evaluación realizada a los 35 días mostró las mayores longitudes en los medios enriquecidos con glutamina en las concentraciones de 200 a 600  $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$  sin mostrar diferencias estadísticas.

#### 4.1.6. Número de raíces laterales.

El análisis de varianza realizado a los 35 días por efecto del medio sobre el número de raíces mostró diferencias significativas y se obtuvo una mayor respuesta

Cuadro 11.. Promedio de las variables porcentaje de sobrevivencia, longitud hipocotilo-radicular, longitud del epicotilo número y longitud de hojas y número de raíces laterales en ejes embrionales de cacao del híbrido EET-95 X SCA-6 cultivados in vitro durante 28 días, en 7 medios diferentes.

Medio cultivo	Porcentaje sobrevivencia	D\1	Longitud hipoc-raiz (cm)	D	Longitud epicótilo (cm)	D	Número hoja	D	Longitud hoja \2 (cm)	D	Número raíces laterales	D
Glutamina (mg)												
MS	85,00	a	3,74	b	0,09	b	0,37	d	0,44	c	2,79	a
Sales MS/3	75,00	a	4,68	a	0,71	a	2,60	a	1,85	ab	5,74	a
MS + 200	80,00	a	4,82	a	0,58	a	2,41	ab	2,38	a	4,57	a
MS + 400	80,00	a	4,73	a	0,49	ab	2,08	b	1,57	b	3,18	a
MS + 600	70,00	a	4,77	a	0,54	ab	2,29	ab	1,63	b	4,76	a
MS/4	80,00	a	4,92	a	0,08	b	0,97	c	0,30	c	4,77	a
MS + AC	82,50	a	3,90	b	0,10	b	0,65	cd	0,36	c	2,75	a

1. Prueba Duncan, en donde los valores promedios con la misma letra no difieren estadísticamente entre sí ( $P \leq 0.05$ ).
2. Longitud del peciolo más la lámina foliar.
3. Las vitaminas, inositol y sacarosa modificados
4. Se adicionó 1000 mg.l-1 de inositol.

Cuadro 12.. Promedio de las variables porcentaje de sobrevivencia, longitud hipocotilo-radicular, longitud del epicotilo número y longitud de hojas y número de raíces en ejes embrionales de cacao del híbrido POUND-7 X UF-613 cultivados in vitro durante 28 días, en 7 medios de cultivo.

Medio cultivo	Porcentaje sobrevivencia	D	Longitud hipoc-raiz (cm)	D	Longitud epicotilo (cm)	D	Número hojas	D	Longitud hojas (cm)	D	Número raíces laterales	D
Caseína (mg)												
MS	72,50	a	4,83	c	0,44	b	0,99	d	0,54	c	6,35	ab
Sales MS/3	62,50	b	5,48	bc	0,59	b	2,05	c	1,86	b	9,60	a
MS + 200	60,00	b	6,11	ab	0,68	ab	2,45	bc	2,25	a	5,55	ab
MS + 400	52,50	b	6,78	a	1,66	a	3,38	ab	2,43	a	3,08	b
MS + 600	55,00	b	6,25	ab	0,94	ab	2,53	bc	1,18	bc	2,50	b
MS/4	80,00	a	5,57	bc	0,48	b	2,13	c	0,56	c	3,11	b
MS + AC	85,00	a	5,54	bc	1,42	ab	4,00	a	1,20	bc	7,00	ab

1. Prueba Duncan, en donde los valores promedios con la misma letra no difieren estadísticamente ( $P \leq 0.05$ )
2. Longitud del peciolo más la lámina foliar.
3. Las vitaminas, inositol y sacarosa modificados
4. Se adicionó 1000 mg.l-1 de inositol.

Cuadro 13. Promedio de las variables porcentaje de sobrevivencia, longitud hipocotilo-radicular, longitud del epicotilo, número y longitud de hojas y número de raíces en ejes embrionales de cacao del híbrido EET-95 X SCA-6 cultivados *in vitro* durante 35 días, en 7 medios de cultivo.

Medio de cultivo	Porcentaje de sobrevivencia	D\1	Longitud hipoc-raíz (cm)	D	Longitud epicotilo (cm)	D	Número de hoja	D	Longitud hoja\2 (cm)	D	Número raíces laterales	D
Glutamina (mg)												
MS	85,00	a	3,88	c	0,25	b	0,57	c	0,62	c	4,43	ab
Sales MS/3	75,00	a	4,84	ab	1,33	a	2,60	ab	2,33	b	7,28	ab
MS + 200	77,50	a	5,10	a	1,62	a	3,21	a	2,79	a	9,78	a
MS + 400	77,50	a	5,01	a	1,28	a	2,28	b	1,95	b	7,85	ab
MS + 600	67,50	a	4,97	a	1,47	a	2,57	ab	2,16	b	8,22	ab
MS/4	77,50	a	5,27	a	0,20	b	0,88	c	0,48	c	6,76	ab
MS + AC	77,50	a	4,43	b	0,30	b	0,86	c	0,64	c	4,12	b

1. Prueba Duncan en donde los valores con la misma letra no difieren estadísticamente entre sí ( $P \leq 0.05$ )
2. Longitud del peciolo más la lámina foliar.
3. Las vitaminas, inositol y sacarosa modificados.
4. Se adicionó 1000 mg.l<sup>-1</sup> de inositol.

Cuadro 14. Promedio de las variables porcentaje de sobrevivencia, longitud hipocotilo-radicular, longitud del epicotilo, longitud y número de hojas y número de raíces en ejes embrionales de cacao del híbrido POUND-7 X UF 613 cultivados *in vitro* durante 35 días, en 7 medios de cultivo.

Medio de cultivo	Porcentaje de sobrevivencia	D\1	Longitud hipoc-raíz (cm)	D	Longitud epicotilo (cm)	D	Número de hojas	D	Longitud hojas\2 (cm)	D	Número raíces	D
Caseína (mg)												
MS	72,50	ab	5,18	c	0,68	c	1,36	d	0,68	c	6,65	ab
Sales MS/3	60,00	bc	5,68	bc	1,18	bc	2,89	c	2,36	b	11,55	a
MS + 200	60,00	bc	6,58	ab	1,29	bca	3,05	c	2,55	ab	8,36	ab
MS + 400	52,50	c	7,21	a	2,27	a	4,23	ab	3,16	a	5,67	b
MS + 600	55,00	c	6,58	ab	1,04	bc	3,34	bc	2,65	ab	6,04	ab
MS/4	80,00	a	5,99	bc	0,77	bc	2,82	c	0,71	c	4,09	b
MS + AC	82,50	a	5,94	bc	1,74	ab	4,54	a	1,37	c	7,68	ab

1. Prueba Duncan en donde los valores promedios con la misma letra no difieren estadísticamente entre sí ( $P \leq 0,05$ ).
2. Longitud del peciolo más la lámina foliar.
3. Las vitaminas, inositol y sacarosa modificados.
4. Se adicionó 1000 mg.l<sup>-1</sup> de inositol.



con el medio MS modificado más  $200 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  de CH en el híbrido 'EET-95 X SCA-6'. El híbrido 'POUND-7 X UF-613' mostró una mayor respuesta al medio MS modificado, pero no se observó diferencias significativas entre éste y los medios que contenían glutamina.

#### 4.2 Parámetros morfológicos en ejes embrionales de cacao del híbrido 'POUND 7-X UF-613 y EET-95 X SCA-6' en un medio MS modificado y suplementado con $200 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de glutamina y $200 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de CH durante 35 días.

Los embriones normales desprovistos de cotiledones, cuyas estructuras se aproximan a los embriones anómalos de las semillas aplanadas, mostraron un mejor crecimiento en un medio MS modificado y enriquecido con  $200 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  de glutamina y  $200 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  de CH. A continuación se describen los principales parámetros morfológicos.

El primer cambio morfológico observado fue el alargamiento del eje hipocotilo-radicular que mostró en el híbrido EET-95 X-SCA, un longitud de 3.83 cm en la primera semana; en forma similar, la cuantificación de este parámetro en el híbrido POUND-7 UF-613 registró 3.94 cm. La evaluación final a los 35 días, registró una longitud de 5.10 cm para el primer híbrido y 6.58 cm para el segundo (fig 2 y 3).

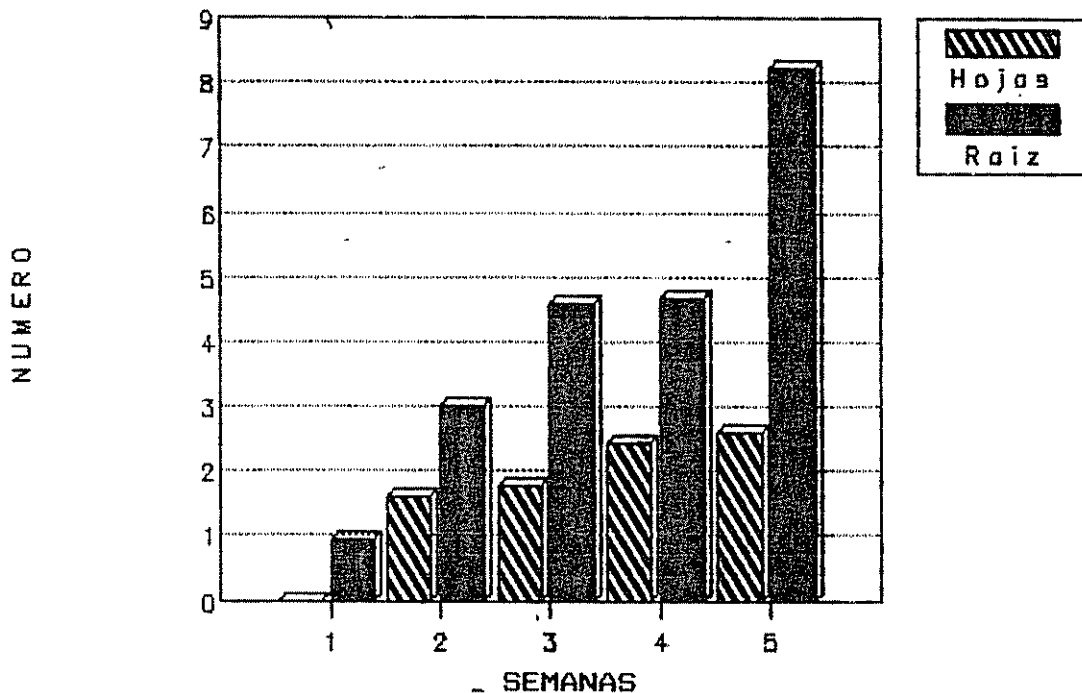


Figura 1. Número de hojas y raíces secundarias en ejes embrionales del híbrido EET-95 X SCA-6 en un medio enriquecido con  $200 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  de CH y  $200 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  de glutamina

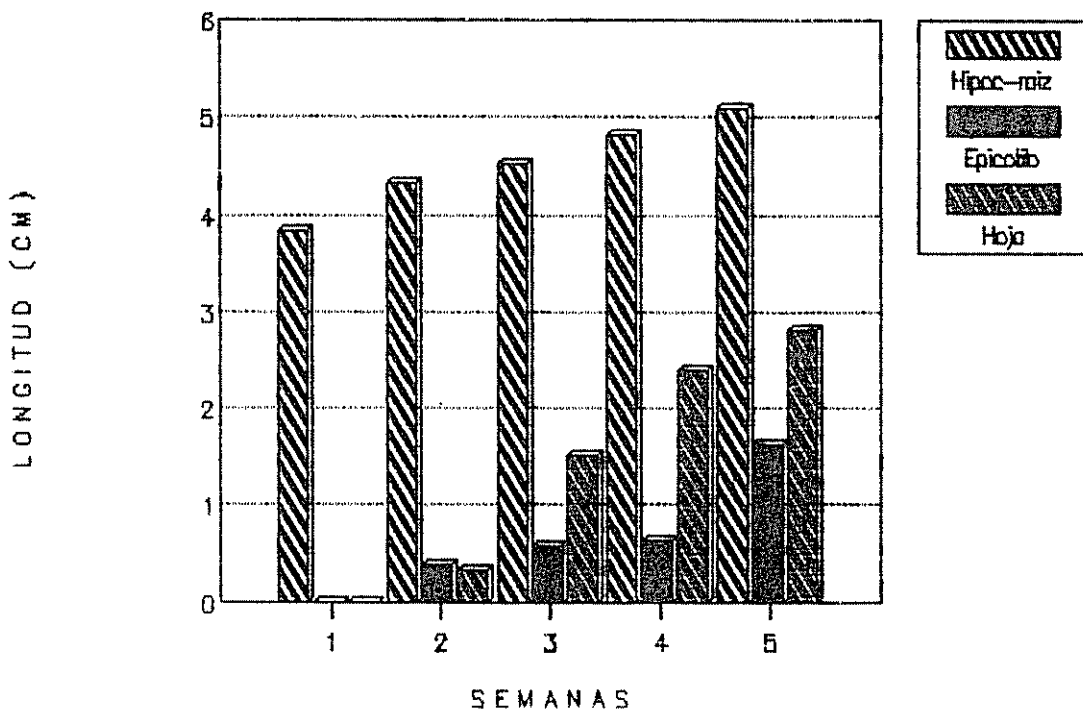


Figura 2. Longitud del eje hipocotilo-radicular y hojas (peciolo más lamina foliar) en ejes embrionales de cacao del híbrido EET-95 X SCA-6, cultivados *in vitro* en un medio enriquecido con  $200 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  de CH y  $200 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  de glutamina durante 5 semanas

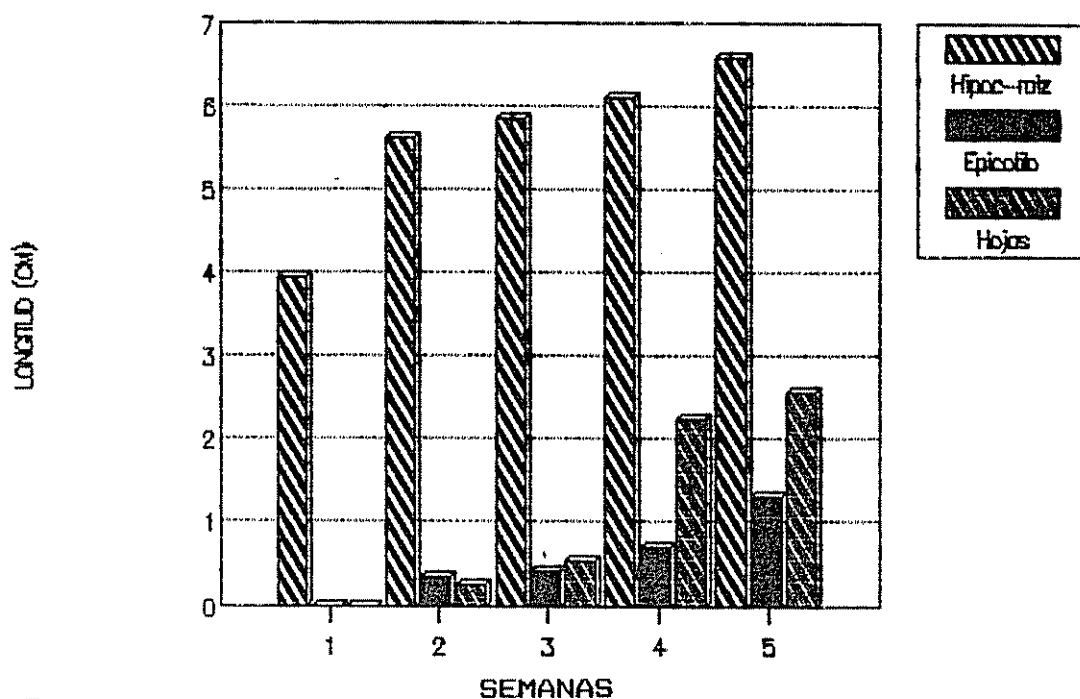


Figura 3. Longitud del eje hipocotilo-radicular, epicotilo y hojas en ejes embriónales de cacao del híbrido POUND-7 X UF-613 cultivados *in vitro* en un medio MS modificado y enriquecido con  $200 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  de CH y  $200 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  de glutamina durante 5 semanas.

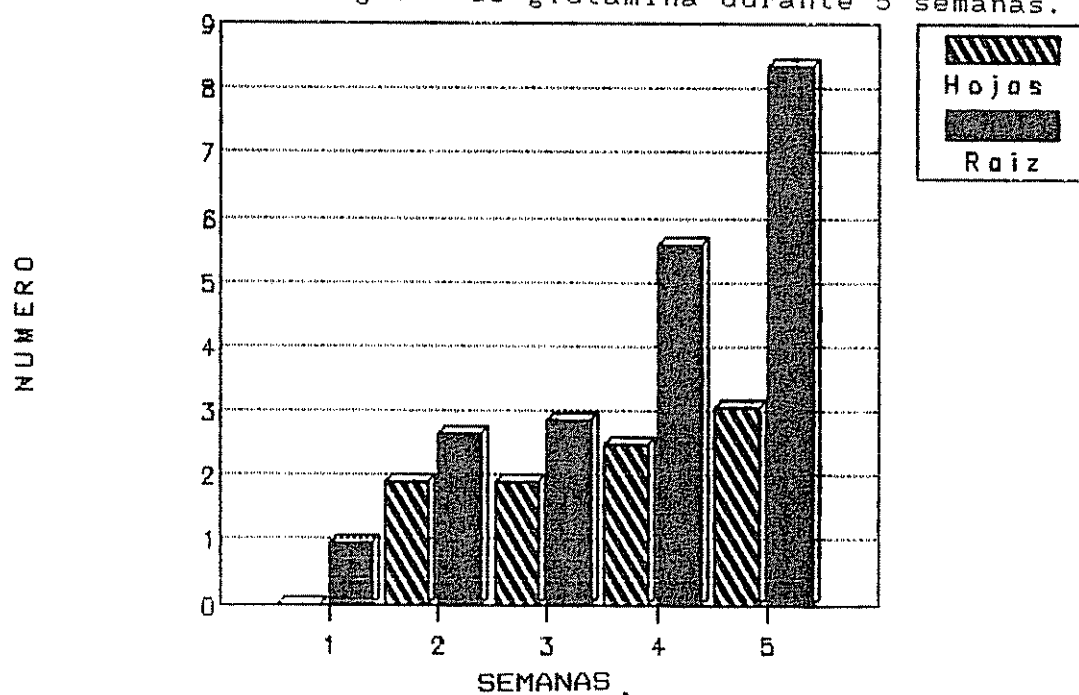


Figura 4. Número de hojas y raíces laterales en ejes embriónales de cacao del híbrido POUND-7 X UF-613, enriquecidos con  $200 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  de CH y  $200 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  de glutamina durante 5 semanas.

Las figuras 2 y 3 muestran el crecimiento del epicótilo durante 35 días. Su desarrollo se determinó a partir de la segunda semana y fue muy lento. A partir de esta fecha se registraron longitudes promedio de 0,31 y 0,33 cm para uno y otro híbrido, estos valores aumentaron a 1,62 y 1,29 cm en la quinta semana.

El número y longitud de hojas también se cuantificó a partir de la segunda semana después de la siembra y se obtuvo un número promedio de 1,59 hojas y una longitud de 0.31 cm en el híbrido 'EET-95 X SCA-6'. En la quinta semana de desarrollo se registró 3,21 hojas de 2,79 cm de longitud (Fig 1 y 2 ).

Una respuesta similar se obtuvo en el híbrido 'POUND-7 X SCA-6' debido a que en la segunda semana se obtuvo 1,88 hojas promedio con una longitud de 0,21 cm. A los 35 días aumentó a 3,05 hojas y una longitud de 2,55 cm a los 35 días (Fig 4).

La respuesta del sistema radical fue lenta y el número de raíces a los 7 días, es similar en los dos híbridos (0,93 para 'EET-95 X SCA-6' y 0,94 para 'POUND-7 X UF-613' y el incremento que se observa a los 35 días es de 9,78 para el primero y 8,36, para el segundo .

#### 4.3 Comportamiento de embriones provenientes de semillas aplanadas en cruces intraespecíficos y transplante a invernadero..

El cuadro 15 contiene los resultados obtenidos en el cultivo de embriones, provenientes de semillas aplanadas, cultivados en un medio MS enriquecido con glutamina ( $200 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ ) y CH ( $200 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ ). Este medio permitió un rescate de embriones con un buen desarrollo y sin formación de callo. Las plántulas obtenidas mostraron las siguientes variaciones.

- a. La mayoría formó plántulas de apariencia normal.
- b. Algunas desarrollaron protofilas anómalas, con borde aserrado, de forma lanceolada o lámina foliar con áreas cloróticas.
- c. Algunos híbridos presentaron regeneración y originaron embriones somáticos y organogénesis directa partir de hipocotilos y cotiledones

El porcentaje de plántulas desarrolladas a partir de embriones provenientes de semillas aplanadas fue muy variable en los híbridos estudiados (Cuadro 15). Los valores fluctuaron de 16 y 87 %.

Las plántulas haploides se verificaron inicialmente por características morfológicas y finalmente mediante el conteo de cromosomas en hojas jóvenes. Esto permitió determinar un

Cuadro 15. Porcentaje de almendras aplanadas vanas, con embrión y plantas desarrolladas de diferentes híbridos de cacao.

HIBRIDO	Almendras aplanadas		Total	% de almendras		Nº embriones sebrados	Plantas desarrolladas	
	con embrión	Vanas		vanas	con embrión		Nº	%
CATONGO X POUND7	12	26	38	68,00	32,00	12	3	25,00
EET 62 X SCA 6*	83	113	196	58,00	42,00	83	55	66,00
EET-48 X SCA-6**	27	35	62	18,00	82,00	27	6	22,00
ET-48 X SCA-6**	20	12	32	38,00	63,00	20	8	40,00
EET62 X SCA12	11	22	33	67,00	33,00	11	9	81,00
EET96 X SCA12	25	2	7	29,00	71,00	25	16	64,00
EET95 X SCA6	31	45	76	59,00	41,00	31	10	32,00
IMC67 X UF654**	27	39	66	59,00	41,00	27	11	41,00
IMC67 X SCA12	15	29	44	66,00	34,00	15	8	53,00
IMC 67 X UF 613	7	17	24	14,00	86,00	7	5	71,00
POUND7 X UF667	28	62	90	69,00	31,00	28	23	82,00
POUND 7 X UF 613 *	19	40	59	68,00	32,00	19	12	63,00
POUND7 X UF668	36	80	116	69,00	31,00	36	8	22,00
POUND12 X CATONGO	34	19	53	36,00	64,00	34	19	56,00
POUND 12 X UF667	12	25	37	68,00	32,00	12	5	42,00
SPA 9 X UF 613	30	40	70	57,00	43,00	30	22	73,00
UF 12 X POUND 7	2	1	3	33,00	67,00	2	1	50,00
UF 12 X IMC 67	8	9	17	52,00	48,00	8	3	37,50
UF 667 X SCA 6	13	7	20	35,00	65,00	13	5	38,00
UF 29 X UF 667	9	21	30	70,00	30,00	9	3	33,00
UF 29 X CC 18	18	15	33	46,00	55,00	18	3	17,00
UF 29 X POUND 7	5	3	8	38,00	63,00	5	6	83,00
UF 29 X CATONGO	3	7	10	70,00	30,00	3	6	50,00
UF 29 X UF 613	3	1	4	25,00	75,00	3	2	67,00
UF 613 X IMC 67 *	4	5	9	55,00	45,00	4	2	50,00
UF 613 X POUND 7	35	52	73	71,00	29,00	35	29	83,0
UF 613 X IMC67**	30	20	39	51,00	49,00	30	26	87,00
UF 613 X POUND 12	48	50	98	51,00	49,00	48	25	52,00
UF 613 X SPA 9	50	56	106	53,00	47,00	50	24	48,00
UF 654 X POUND 7	7	8	15	53,00	47,00	7	3	43,00
UF 676 X IMC 67	22	30	52	58,00	42,00	22	8	37,00
UF 667 X IMC 67	28	36	64	56,00	44,00	28	10	36,00
UF 667 X IMC 69	3	5	8	63,00	38,00	3	1	33,00
UF 667 X SCA 12	23	29	52	56,00	44,00	23	19	83,00
UF-668 X IMC 67**	20	8	16	50,00	50,00	20	12	60,00
UF 668 X POUND 12	7	4	11	37,00	64,00	7	3	43,00
TOTAL	755	973	1671			755	411	

\* Híbridos que presentaron regeneración en cotiledones e hipocotilo.

\*\* Híbrido en que se determinó la haploidia

#### 1.70 % de plantas haploides

Se presentó organogénesis y embriogénesis somática en los híbridos POUND-7 X UF-613, UF-613 X IMC-67 , EET-62 X SCA-6. Los brotes obtenidos en el hipocotilo de embriones de semillas aplanadas del híbrido UF-613 X IMC-67 se observaron en el microscópico electrónico de rastreo lo que permitió apreciar los primordios foliares en cuya superficie es visible un gran número de tricomas (Figura 8). Además se presentaron vástagos con una estructura hipocotilar diferenciada, y estructuras foliares entre cotiledones y megafilas (Figura 9)

El transplante de las plántulas al invernadero se realizó a los 5-6 meses posteriores a la germinación. Dos meses después se determinó la pérdidas de un 7 % de plántas.

#### 4.4. Morfología de los tipos básicos de embriones provenientes de semillas aplanadas de cacao.

UF-613 X IMC-67. Embriones de hipocotilo bien desarrollado y la radícula inconspicua. Cotiledones foliosos, espatulados Venación acródroma basal (Figura 5C).

IMC-67 X UF-654. Tipo con hipocotilo grueso, carnoso; , cuello de la raíz de apariencia normal y radícula alargada y angosta. Un cotiledón globular, carnoso y peciolado; epicotilo no visible (Figura 6A).

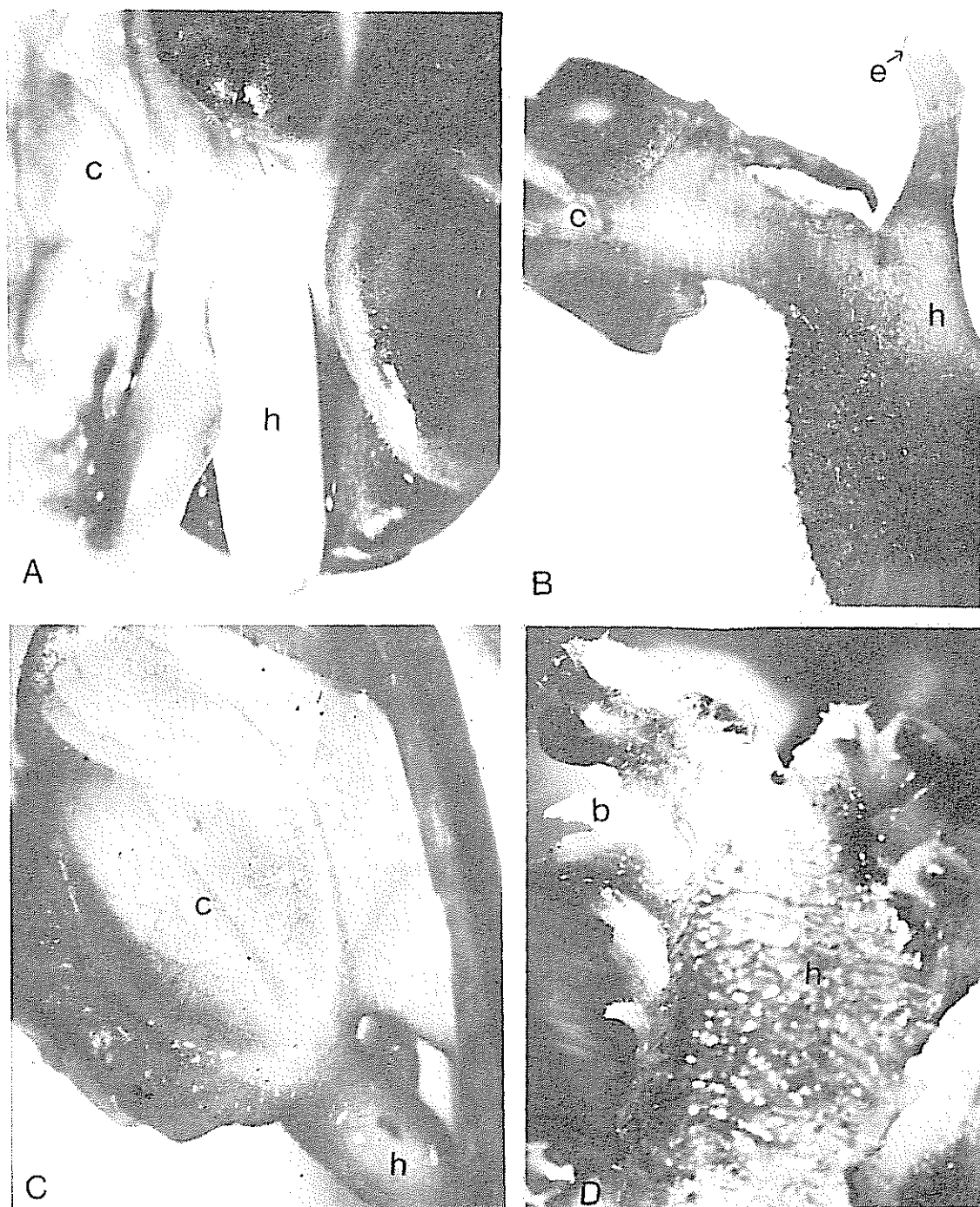


Figura 5. Morfología típica de los embriones provenientes de semillas aplanadas de cacao. A. Embrión proveniente de una semilla normal con remoción parcial del cotiledón (c) para exponer el hipocotilo (h). D. Organogénesis observada en el híbrido IMC-67 X UF 654. Los brotes (b) se originan del hipocotilo.



EET-95 X SCA-6 : Embriones de epicotilo anómalo curvado. No se observa cotiledones; la radícula es angosta y alargada (Figura 7H).

EET-95 X SCA-6 : Formas hipocotilares anómalas, comprimidas lateralmente ; cuello de la raíz engrosado La radícula poco desarrollada. Cotiledón cárnoso , anómalo, peciolado. Peciolo comprimido lateralmente. No hay evidencia de epicotilo.

EET-95 X SCA-6: Semillas con dos embriones fusionados ontogénicamente en el cuello de la raíz. Radícula inconspicua, epicotilo bien formado, cotiledones foliosos con 5 venas mayores longitudinales (Figura 9E).

EET-95 X SCA-6: Radícula, cuello de la raíz e hipocotilo normales. Este tipo muestra tendencia a la formación de láminas con venación estriada. Cotiledones ligeramente carnosos y epicotilo normal . Las protofilas son de forma escuamiformes.

EET-62 X SCA-6: Embriones con hipocotilo normal y radícula larga y frágil. Nudo cotiledonar observable pero sin desarrollo. Protofila basal y hojas superiores con lámina de borde sinuado lobado. La venación acrodroma, perfecta basal. Después de formar la protofila el ápice se divide

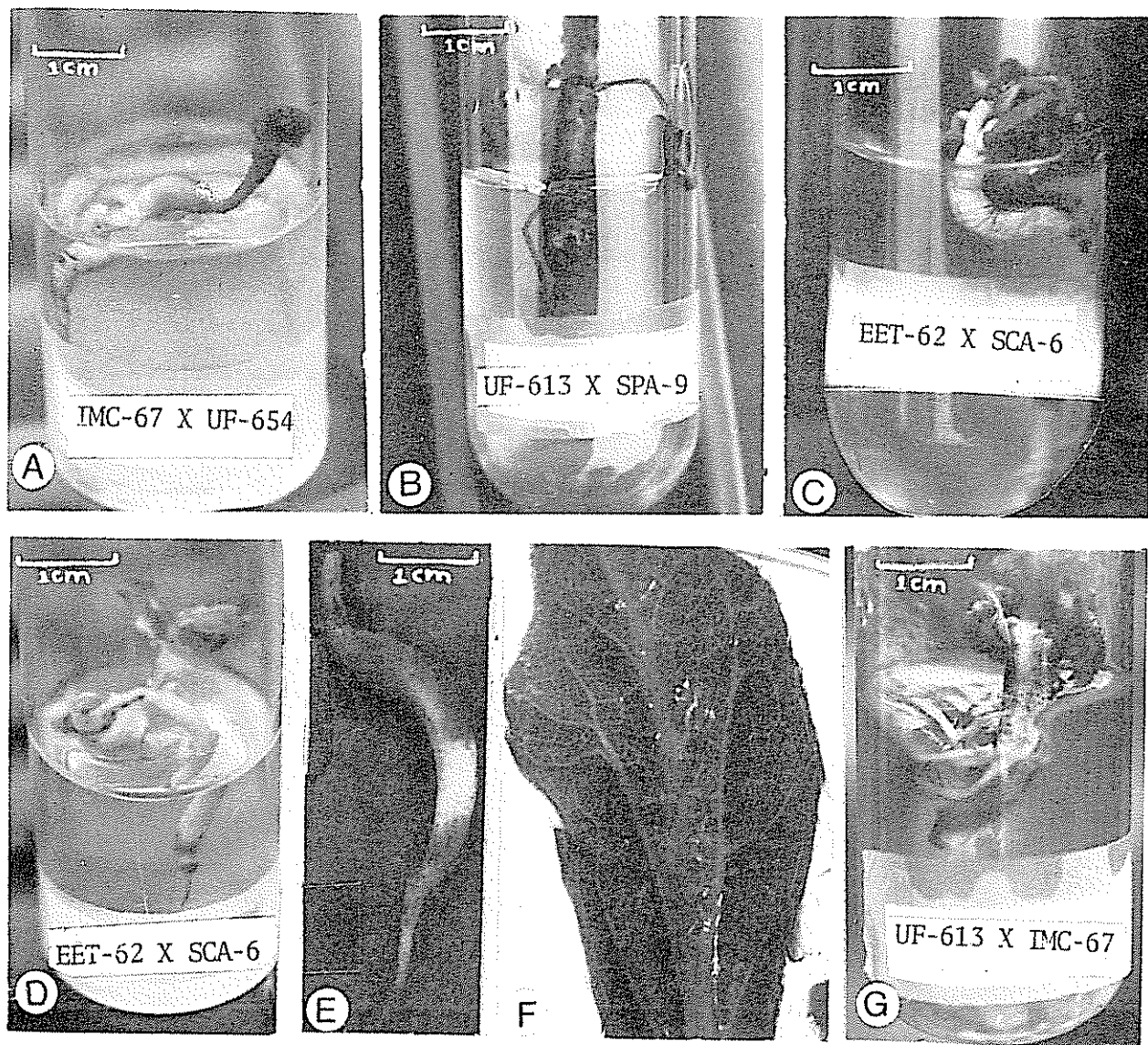


Figura 6. Morfología típica de los embriones provenientes de semillas aplanadas de cacao.

simpodialmente y da origen a dos tallos . En cada rama, la forma foliar se normaliza después del tercer nudo en sentido acrópeta.

POUND-7 X UF-667: Poliembrionía. Fusión longitudinal de epicotilos adyacentes, cuellos radiculares y zona proximal de las radículas. Nudo cotiledonar sin cotiledones visibles. Hojas lanceoladas , asimétricas de borde sinuado . Venación reticulada actinódroma. Apice del vástago con numerosas escamas (Figura 7A).

EET-48 X SCA-6 Hipocotilo normal. Ramificación simpodial del epicotilo en plántula y brinzal. Hojas pequeñas normales aunque con áreas cloróticas intervenales (areolas) (Figura 7 E).

UF-613 X SPA-9: Embrión mal formado con radícula vestigial. Epicotilo corto , grueso, mal formado. Hojas vestigiales, escumiformes ofromas reducidas, lanceoladas o lineares . Vena media inconspicua. El apice del vástago se atrofia. Se pierde la dominancia apical y se inicia el desarrollo de una yema lateral poco vigorosa (Figura 6 B).

EET-667 X SCA-6 : Radícula pequeña e hipocotilo normal; cotiledones irregulares, mal formados. Protofila de lámina foliar irregular , asimétrica, aserrada en el semilímbo. Venación camptódroma (Figura 6F).

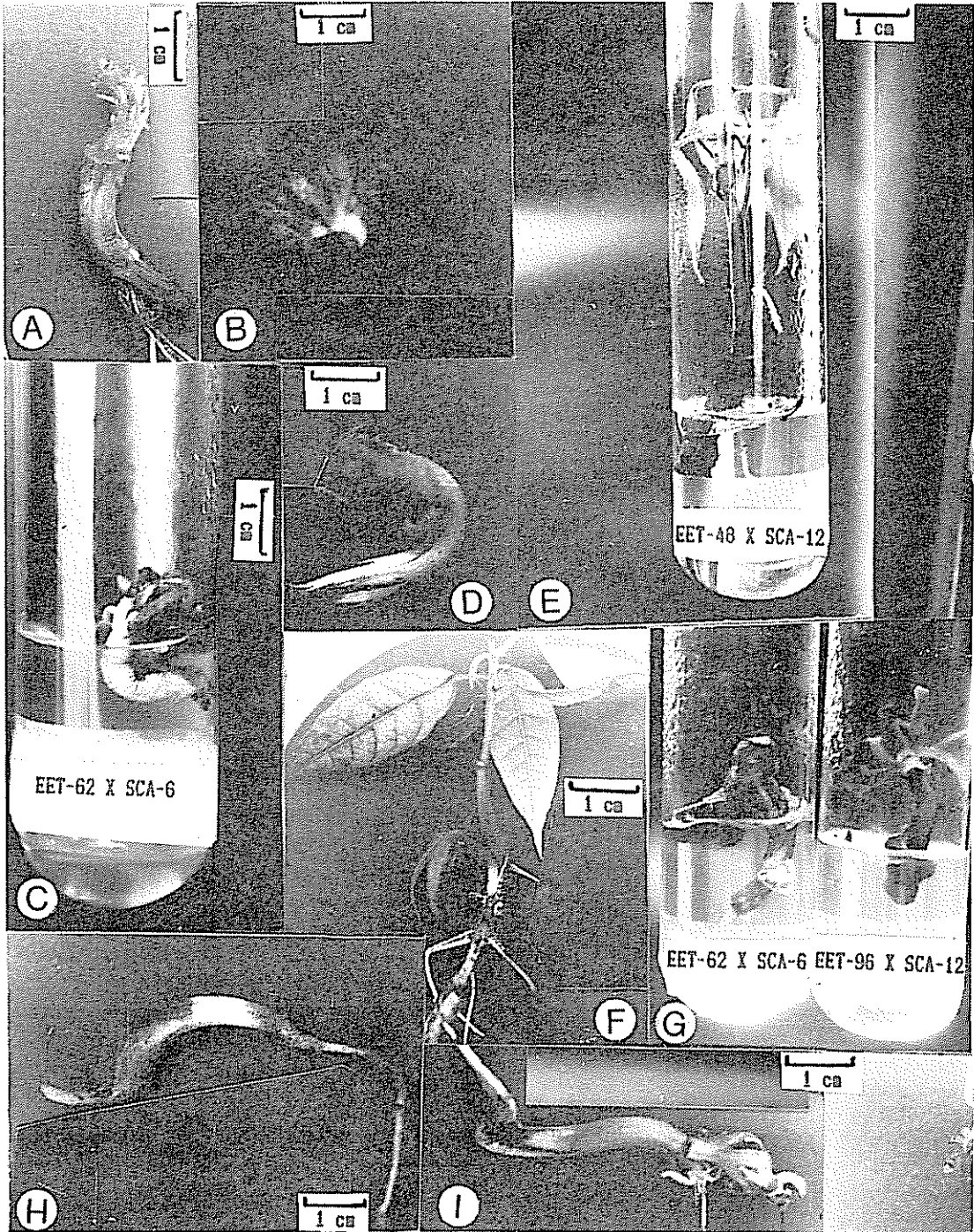


Figura 7. Morfología típica de los embriones provenientes de semillas aplanadas de cacao.

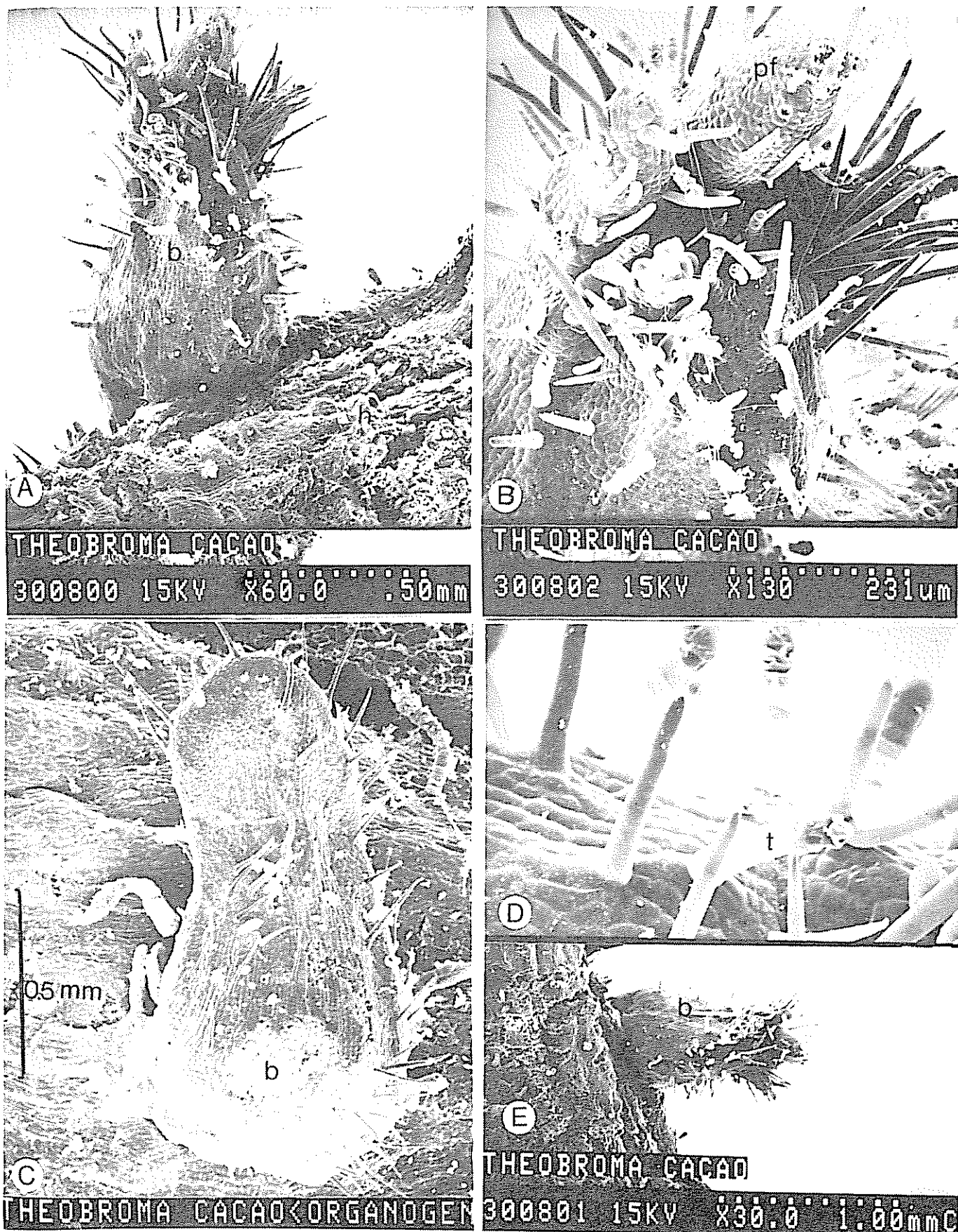


Fig 8. Organogénesis en hipocótilos de embriones provenientes de semillas aplanadas de cacao. A. Vista lateral de un brote (b) desarrollado en el hipocótilo (h). B. Detalle de primordios foliares del brote. C. Brote del hipocótilo en el híbrido EET-95 X SCA-6. D. Detalle de la estructura epidérmica de la superficie abaxial del primordio foliar. E. Brote.

EET-62 X SCA-6. Raíz inconspicua, de forma normal. Hipocotilo dorsiventral. Cotiledón rudimentario; epicotilo no observable .

IMC- 67 X UF-654. Embrión anormal , espatulado, de radícula atrofiada. Hipocotilo rudimentario. Cotiledones fusionados a los largo de la superficie adaxial. Epicotilo no visible y su emergencia es obliterada por la concrecencia cotiledonar (Figura 7D).

EET- 62 X SCA- 6. Embrión amorfo (forma teratologica). Radícula no visible. Epicotilo y cotiledones deformes. Hipocotilo dorsiventral, ondulado, con incipiente torque vertical (Figura 7C).

EET-62 X SCA-6 Radícula débil y angosta, epicotilo corto y dorsiventral. Cotiledones foliosos, incumbentes (Figura 6A).

UF-613 X POUND-13 . Hipocotilo engrosado y dorsiventral. Nudo cotiledonar dividido en dos uno contiene el epicotilo con la base engrosada (Figura 5B)

UF-613 X IMC-67. Hipocotilo engrosado , cotiledones carnosos , anómalo. Epicotilo no observable. Organogénesis directa tanto en cotiledones como en el hipocotilo (Figura 6G).

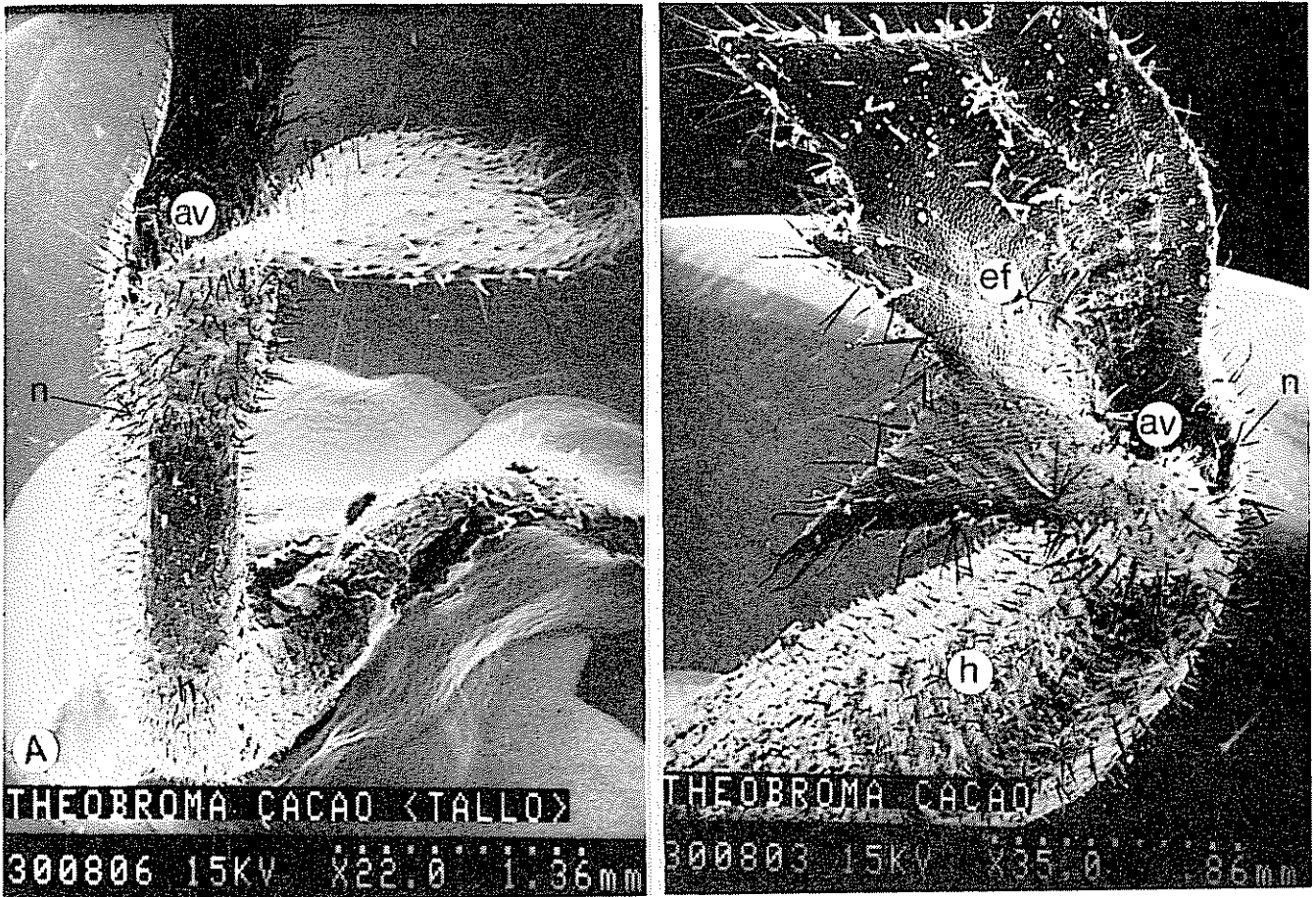


Figura 9. Vástagos obtenidos por organogénesis en el híbrido UF-613 X IMC-67. h. estructura hipocotilar. n. nudo hipocotilar. a.v. ápice del vástago. ef. estructura foliar entre cotiledones y megafilas.

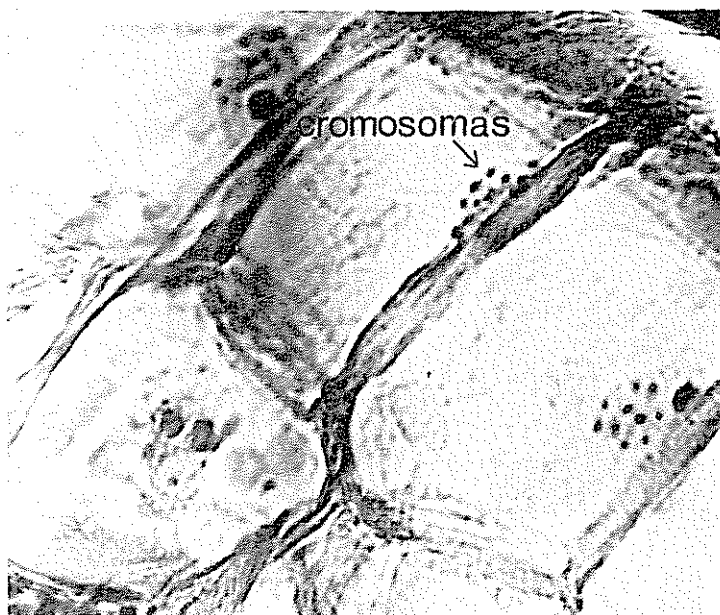


Figura 10. Cromosomas observados en el ápice de una planta de cacao haploide, proveniente de una semilla aplanada. Au 2000 X



Figura 11. Diferentes características de los embriones de cacao provenientes de semillas aplanadas.



UF-667 X SCA-12. Cotiledones carnosos.y anómalo. Hipocotilo inconspicuo ,engrosado . Epicotilo no observable (Figura 7B).

Además de los tipos descritos, es posible observar variaciones de las formas básicas en los diferentes híbridos.

#### 4.5 Efecto de ANA + BA y 2,4-D sobre la inducción de callo a partir de cotiledones de cacao.

El callo blanco amarillento obtenido a partir de cotiledones del híbrido POUND 7 X CATONGO continúa su crecimiento al ser transferido a un medio fresco, excepto en el tratamiento sin reguladores. La cuantificación del área de callo y su análisis estadístico, mostró diferencias altamente significativas en los diferentes tratamientos, durante cuatro semanas (Cuadro 16). El mayor crecimiento de callo se obtuvo, para todos los tratamientos, 2 ó 3 semanas después de efectuarse la transferencia a medio fresco, el área mayor se formó al aplicar 2,4-D ( $1 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ ) Se observó un nuevo crecimiento de callo blanco, alrededor del callo blanco amarillento inicial (Fig 12). El nuevo callo presentó una estructura más compacta que el producido con los tratamientos suplementados con ANA y BA.

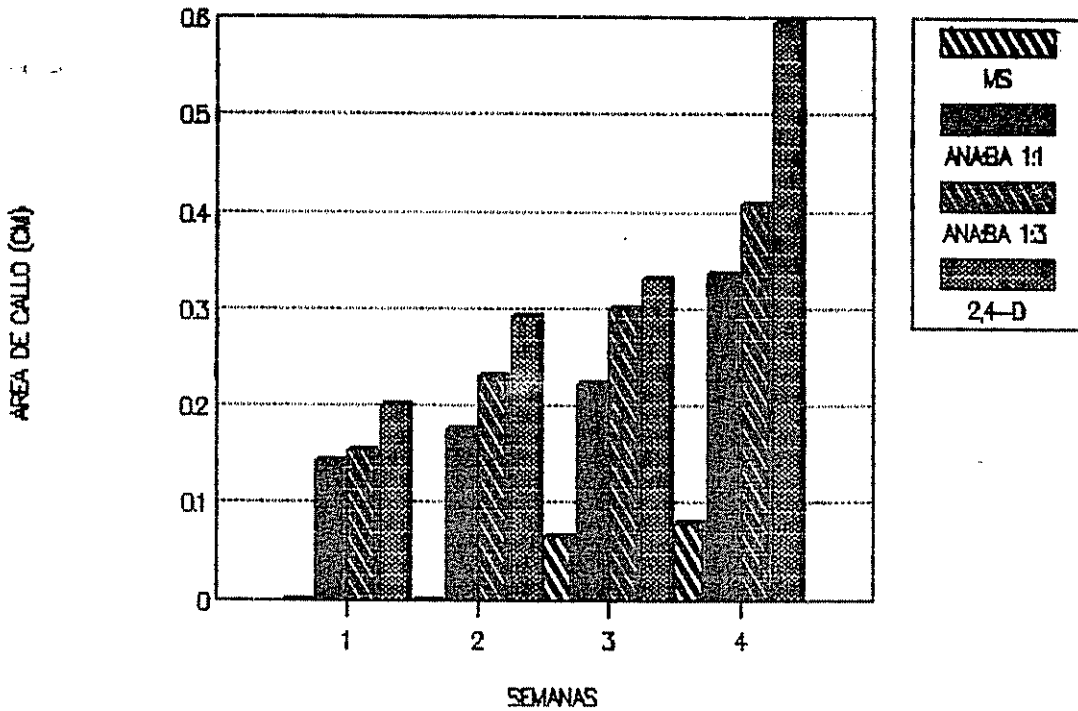


Figura 12. Iniciación del callo a partir de cotiledones de cacao del híbrido POUND-7 X CATONGO en un medio MS con ANA + BA y 2,4-D.

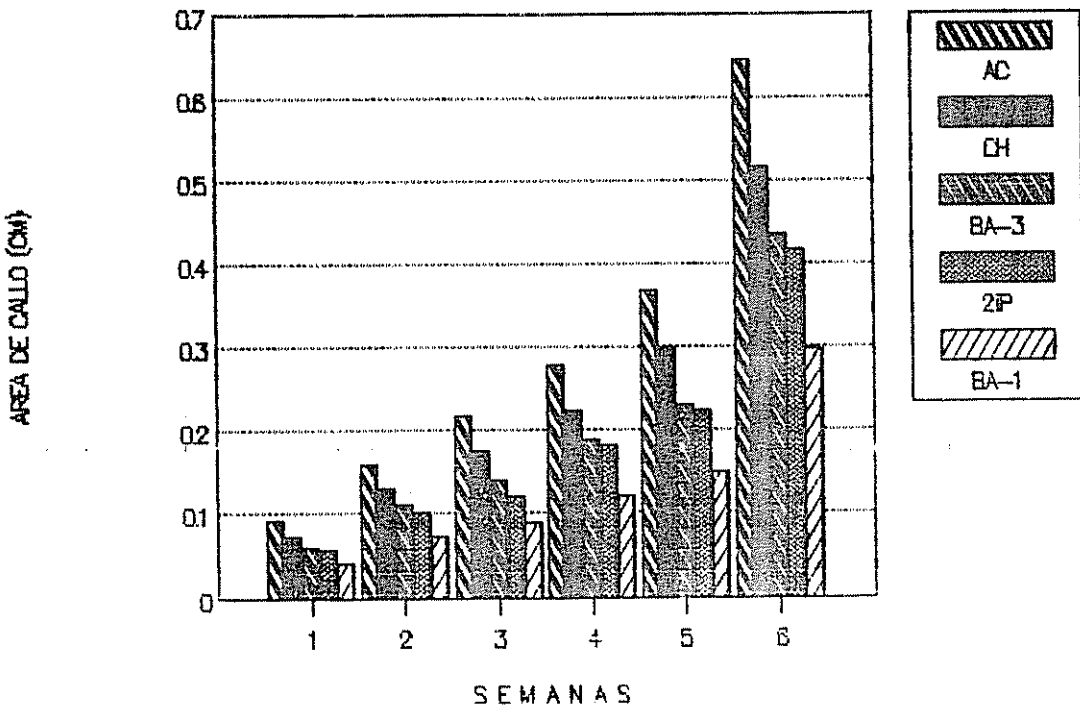


Figura 13. Desarrollo del callo a partir de cotiledones de cacao del híbrido POUND-7 x CATONGO en un medio MS más agua de coco , CH, BA y 2iP.

Con el tratamiento de ANA ( $1 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ ) + BA ( $3 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ ) se obtuvo callos de consistencia friable, blanco amarillentos y en algunos cotiledones se formaron estructuras globulares 2 semanas después de la transferencia. Estas estructuras no parecen originarse del callo sino del cotiledón.

El callo respondió en forma diferente al agregar ANA ( $1 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ ) y  $3 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  de BA, obteniéndose un callo de consistencia friable que en algunos casos generó raíces.

#### 4.6 Efecto de CH sobre el desarrollo de callo en un medio basal MS suplementado con agua de coco (10 %), BA y 2iP.

La transferencia del callo a diferentes medios de cultivo fresco conteniendo CH ( $2 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ ), agua de coco (10%), BA (1 y 3 mg) y 2iP ( $1 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ ) promovió su crecimiento (Fig 13). El análisis estadístico del área del callo producto de estos tratamientos mostró diferencias altamente significativas durante 6 semanas. (Cuadro 16 A)

El mayor crecimiento de callo se obtuvo con agua de coco y medio basal MS conteniendo solo CH. Los callos transferidos a éstos dos medios fueron inducidos con 2,4-D. Los callos obtenidos con agua de coco (10 %) fueron en su mayoría de consistencia friable, blanco amarillentos y a veces, formaron raíces.

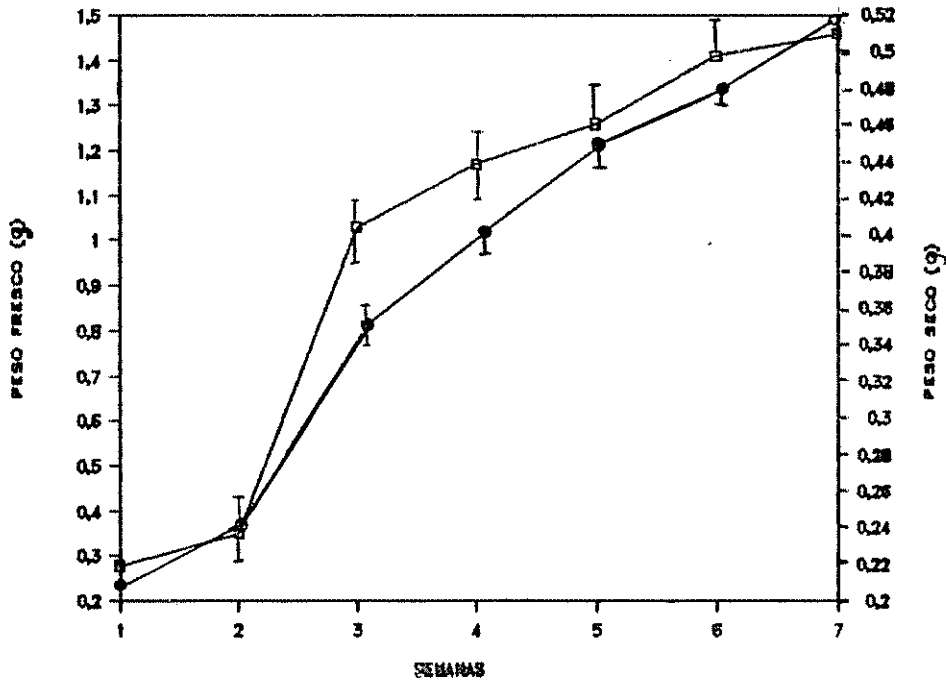


Figura 14. Acumulación de peso fresco (○) y peso seco (●) en callos de cotiledones de cacao en un medio MS con 2,4-D ( $1 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ ) con 2,4-D ( $1 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ ) durante 6 semanas.

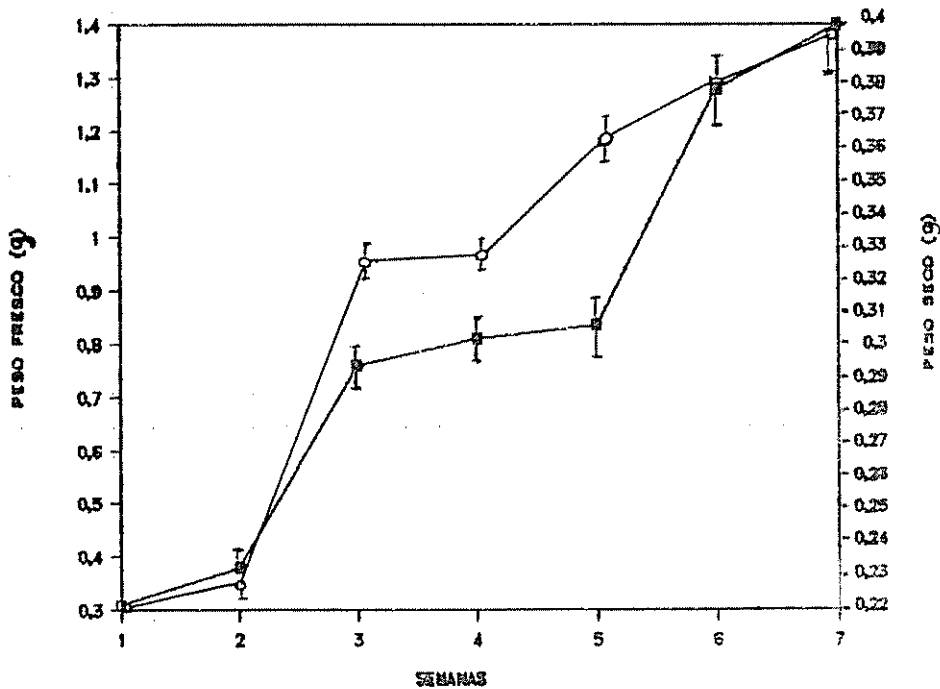


Figura 15. Acumulación de peso fresco (○) y peso seco (●) en callos de cotiledones de cacao en un medio MS con 2,4-D ( $1 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ ) y CH ( $200 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ ).

Cuadro 16. Promedio del área de callo a partir de cotiledones de semillas aplanadas del híbrido POUND 12 X CATONGO en un medio basal MS bajo la influencia de ANA:BA y 2,4-D durante 4 semanas de desarrollo.

Tratamiento	1ª semana		2ª semana		3ª semana		4ª semana	
	Area (cm)	D/1	Area (cm)	D	Area (cm)	D	Area (cm)	D
MS	0,000	c	0,000	d	0,064	c	0,078	d
ANA-BA/2	0,142	b	0,176	c	0,222	b	0,336	c
ANA-BA/3	0,152	b	0,230	b	0,300	a	0,406	b
2,4-D/4	0,200	a	0,290	a	0,330	a	0,594	a

1. Prueba de Duncan en donde los promedios con la misma letra no difieren estadísticamente entre sí ( $P \leq 0,05$ )
2. Dosis de BA 1 mg/l. Dosis de ANA 1 mg/l.
3. Dosis de ANA 1 mg/l. Dosis de BA 3 mg/l.
4. Dosis de 2,4-D 1 mg/l.

Cuadro 17. Promedio del área del callo a partir de cotiledones del híbrido POUND 12 X CATONGO en un medio basal MS bajo la influencia de AC, BA y 2iP durante 6 semanas.

Tratamiento	1ª semana	D/1	2ª semana	D	3ª semana	D	4ª semana	D	5ª semana	D	6ª semana	D
AC/2	0,0905	a	0,1580	a	0,2165	a	0,2775	a	0,3688	a	0,6463	a
CH/3	0,0723	b	0,1293	ab	0,1760	b	0,2233	b	0,2975	b	0,5175	b
BA/4	0,0613	c	0,1100	bc	0,1395	c	0,1875	bc	0,2300	c	0,4370	c
2iP/5	0,0573	d	0,1030	bc	0,1220	dc	0,1813	c	0,2245	c	0,4175	c
BA/6	0,0398	e	0,0710	c	0,0880	d	0,1208	d	0,1503	d	0,2988	d

1. Prueba Duncan en donde los promedios con la misma letra no difieren estadísticamente entre sí ( $P \leq 0,05$ )
2. Agua de coco al 10 %
3. Caseína hidrolizada 2 mg/l.
4. Benzil adenina 3 mg/l.
5. Isopentenil adenina 1 mg/l.
6. Benzil adenina 1 mg/l.

En presencia de CH, el nuevo callo formado fue cremoso y compacto.

El callo obtenido con medios suplementados con  $1 \text{ mg l}^{-1}$  de BA mostró menor desarrollo que el obtenido en un medio cuya dosis fue de  $3 \text{ mg.l}^{-1}$ . En ambos tratamientos se obtuvo un callo cremoso y friable. Además, con la dosis de BA ( $3 \text{ mg.l}^{-1}$ ) se observaron estructuras de forma globular en algunos callos.

#### 4.7 Cinética de crecimiento del callo a partir de cotiledones de cacao.

##### 4.7.1 Iniciación del crecimiento y desarrollo del callo.

El callo iniciado a partir de cotiledones se mantuvo durante las 7 semanas de incubación, en un medio MS suplementado con 2,4-D, caseína hidrolizada y agua de coco. El callo formado fue blanco cremoso, distribuido en agregados de consistencia friable, excepto los callos obtenidos con los tratamientos que contenían 2,4-D más CH, que son de apariencia más compacta.

En la primera semana de iniciación del callo el peso fresco y seco no mostró diferencias significativas entre los diferentes medios (Cuadro 13A y 14A), sin embargo, a partir de la segunda semana los callos desarrollados en los medios MS suplementados con 2,4-D y

Cuadro 18. Peso fresco promedio de callos a partir de cotiledonos de cacao del híbrido POUND 7 X CATONGO en un medio basal MS con 2,4-D, CH y AC durante 7 semanas de desarrollo.

Tratamiento	1ª semana	D/1	2ª semana	D	3ª semana	D	4ª semana	D	5ª semana	D	6ª semana	D	7ª semana	D
2,4-D	0,278	b	0,350	a	1,030	a	1,172	a	1,250	a	1,42	a	1,46	a
2,4-D+CH	0,398	a	0,379	b	0,760	b	0,810	b	0,836	b	1,43	b	1,43	a
2,4-D+AC	0,282	c	0,320	c	0,585	c	0,600	c	0,618	c	0,669	c	0,669	b
2,4-D+CH+ AC	0,281	d	0,281	d	0,490	c	0,500	d	0,520	c	0,61	c	0,610	b

1. Prueba Duncan en donde los promedios con la misma letra no difieren estadísticamente entre sí ( $P \leq 0,05$ )

Cuadro 19. Peso seco promedio de callos a inducidos de cotiledonos de cacao del híbrido POUND 7 X CATONGO en un medio basal MS con 2,4-D, CH y AC durante 7 semanas de desarrollo.

Tratamiento	1ª semana	D/1	2ª semana	D	3ª semana	D	4ª semana	D	5ª semana	D	6ª semana	D	7ª semana	D
2,4-D	0,2083	ab	0,2403	a	0,349	a	0,400	a	0,450	a	0,480	a	0,520	a
2,4-D+CH	0,220	a	0,225	ab	0,325	ab	0,327	b	0,363	b	0,380	b	0,400	b
2,4-D+AC	0,2192	a	0,220	b	0,315	bc	0,337	b	0,350	b	0,370	bc	0,400	b
2,4-D+CH+ AC	0,190	b	0,200	c	0,291	c	0,321	b	0,341	b	0,350	c	0,38	b

1. Prueba Duncan en donde los promedios con la misma letra no difieren estadísticamente entre sí ( $P \leq 0,05$ )

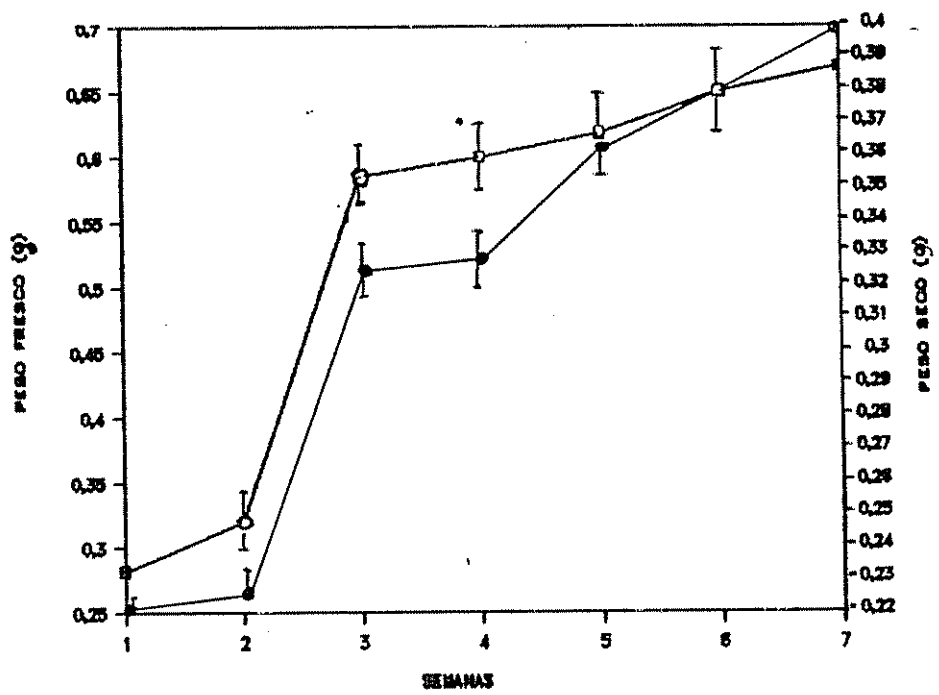


Figura 16. Acumulación de peso fresco (o) y peso seco (●) en callos de cotiledones de cacao en un medio MS con 2,4-D (1 mg.l<sup>-1</sup>) + AC (10 %) durante 7 semanas.

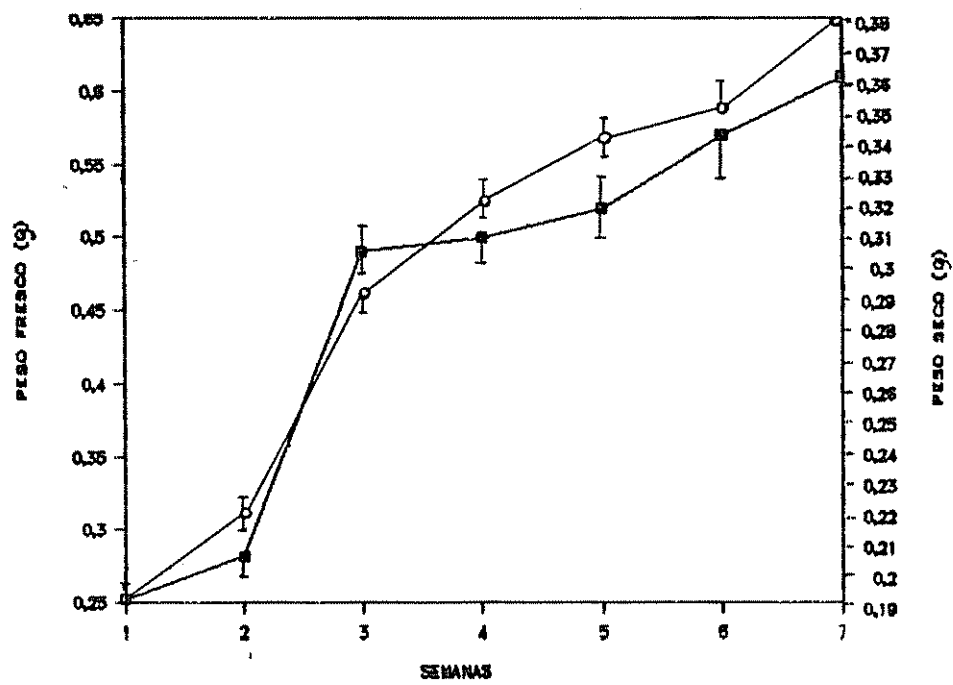


Figura 17. Acumulación del peso fresco (o) y peso seco (●) en callos de cotiledones de cacao en un medio MS con 2,4-D (1 mg.l<sup>-1</sup>) y AC (10 %) durante 7 semanas.



2,4-D + CH mostraron un mayor vigor, que se manifestó hasta la séptima semana. Los pesos frescos fueron 1.46 y 1,43 g respectivamente (cuadro 18). Desde la quinta hasta la séptima semana el incremento del callo fue menor y a partir de esta última semana se observó un ennegrecimiento del mismo (Fig 14 a 16). Los callos que crecieron en los medios suplementados con 2,4-D + AC y 2,4-D + AC + CH mostraron un menor vigor, que se determinó con el peso fresco promedios de 0.67 y 0,61. Resultaron estadísticamente diferentes cuando se compararon con los obtenidos en los tratamientos con 2,4-D + AC y 2,4-D + AC + CH (cuadro 17).

#### 4.8 Cultivos en suspensión.

Las secciones de callo friable transferidas al medio MS líquido suplementado con 2,4-D, enriquecido con CH y AC, y distribuidos en diferentes tratamientos, en agitación continua, provocó la disociación del callo iniciándose la suspensión celular. Esta suspensión, cuyo crecimiento se determinó a partir de la segunda transferencia, se desarrolló rápidamente después de la segunda semana y alcanzó un máximo crecimiento durante la tercera semana en los 4 tratamientos evaluados (Fig 18 a 21). El análisis de varianza mostró diferencias altamente significativas en el peso fresco de la suspensión, en cada una de las evaluaciones realizadas excepto en la sexta semana. (Cuadro

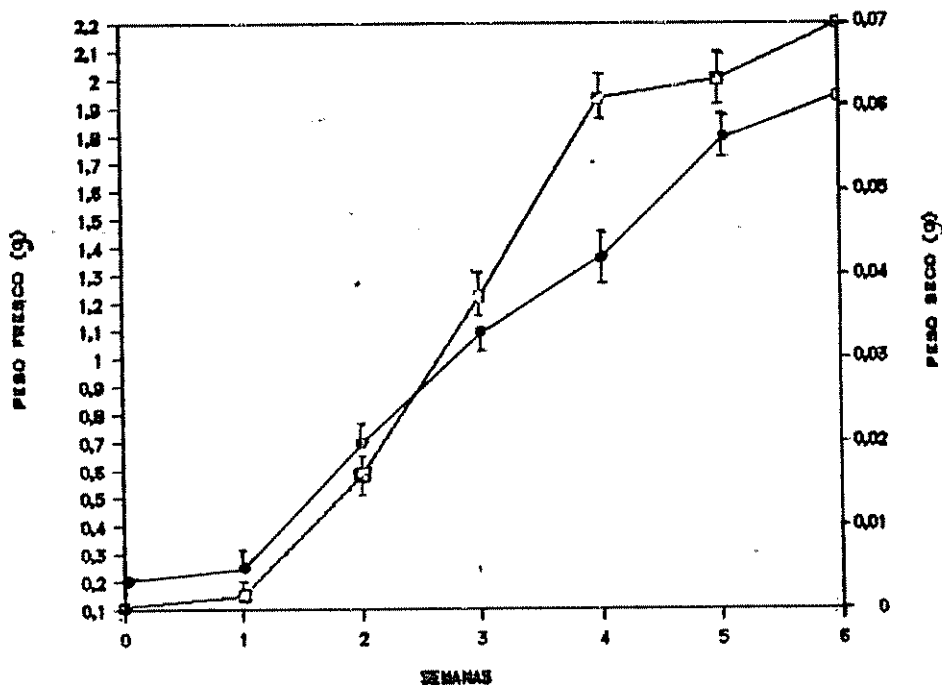


Figura 18. Incremento del peso fresco (□) y peso seco (●) de cultivos en suspensión a partir de cotiledones de cacao en un medio MS suplementado con 2,4-D (1 mg.l-1)

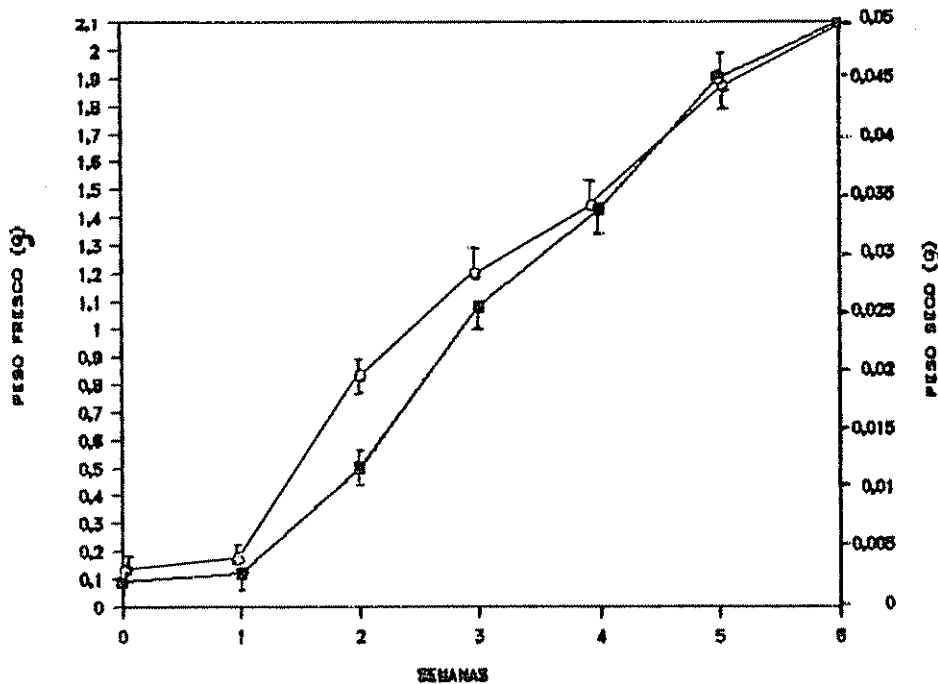


Figura 19. Incremento del peso fresco (□) y peso seco (●) de cultivos en suspensión a partir de cotiledones de cacao en un medio MS con CH y suplementado con 2,4-D.

Cuadro 20. Peso fresco promedio de una suspensión celular a partir de cotiledones del híbrido POUND 7 X CATONGO en un medio basal MS con 2,4-D, CH y AC durante 6 semanas.

Tratamiento	0 semana	D/1 1ª semana	D 2ª semana	D 3ª semana	D 4ª semana	D 5ª semana	D 6ª semana	D						
2,4-D	0,109	a	0,150	a	0,58	a	1,22	a	1,93	a	2,00	a	2,20	a
2,4-D+CH	0,090	b	0,120	b	0,50	b	1,08	a	1,43	b	1,90	a	2,10	a
2,4-D+AC	0,070	c	0,100	b	0,40	c	1,00	a	1,30	b	1,60	b	1,80	b
2,4-D+CH+ AC	0,063	c	0,064	c	0,35	c	0,70	b	1,27	b	1,50	c	1,60	b

1. Prueba Duncan en donde los promedios con la misma letra no difieren estadísticamente entre sí ( $P \leq 0,05$ )

Cuadro 21. Peso fresco promedio de una suspensión celular a partir de cotiledones del híbrido POUND 7 X CATONGO en un medio basal MS con 2,4-D, CH y AC durante 6 semanas.

Tratamiento	0 semana	D/1 1ª semana	D 2ª semana	D 3ª semana	D 4ª semana	D 5ª semana	D 6ª semana	D						
2,4-D	0,0032	a	0,0050	a	0,0233	a	0,033	a	0,042	a	0,056	a	0,061	a
2,4-D+CH	0,0032	a	0,0040	a	0,0200	b	0,029	b	0,035	b	0,045	b	0,050	b
2,4-D+AC	0,0030	a	0,0040	a	0,0200	b	0,025	c	0,031	c	0,040	c	0,044	c
2,4-D+CH+ AC	0,0030	a	0,0040	a	0,0200	b	0,024	c	0,030	c	0,039	c	0,041	c

1. Prueba Duncan en donde los promedios con la misma letra no difieren estadísticamente entre sí ( $P \leq 0,05$ )

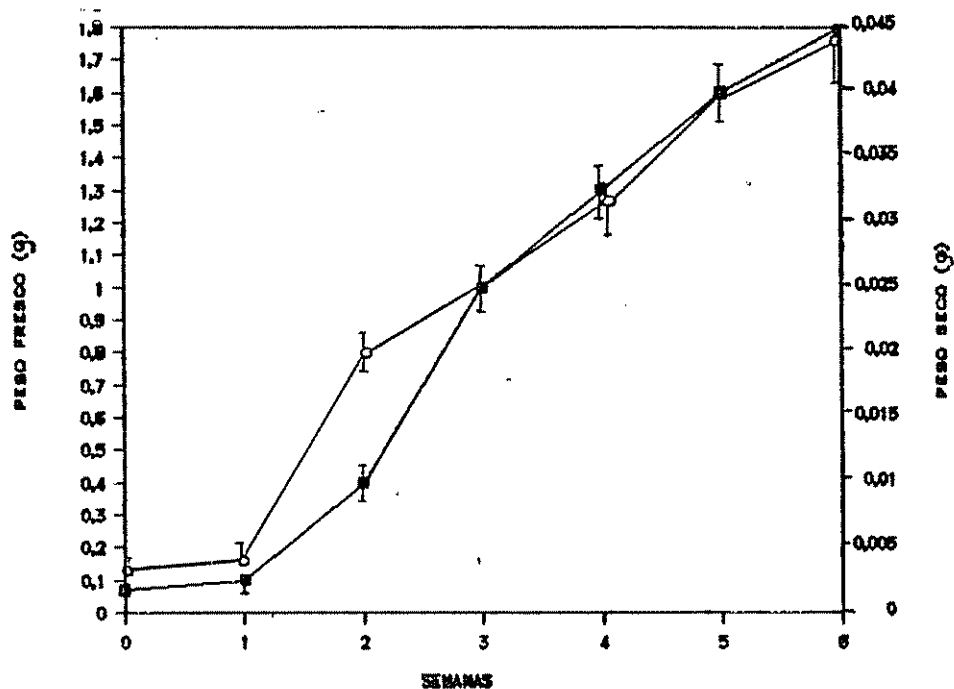


Figura 20. Incremento del peso fresco (□) y peso seco (●) de cultivos en suspensión a partir de cotiledones de cacao en un medio MS con AC y suplementado con 2,4-D.

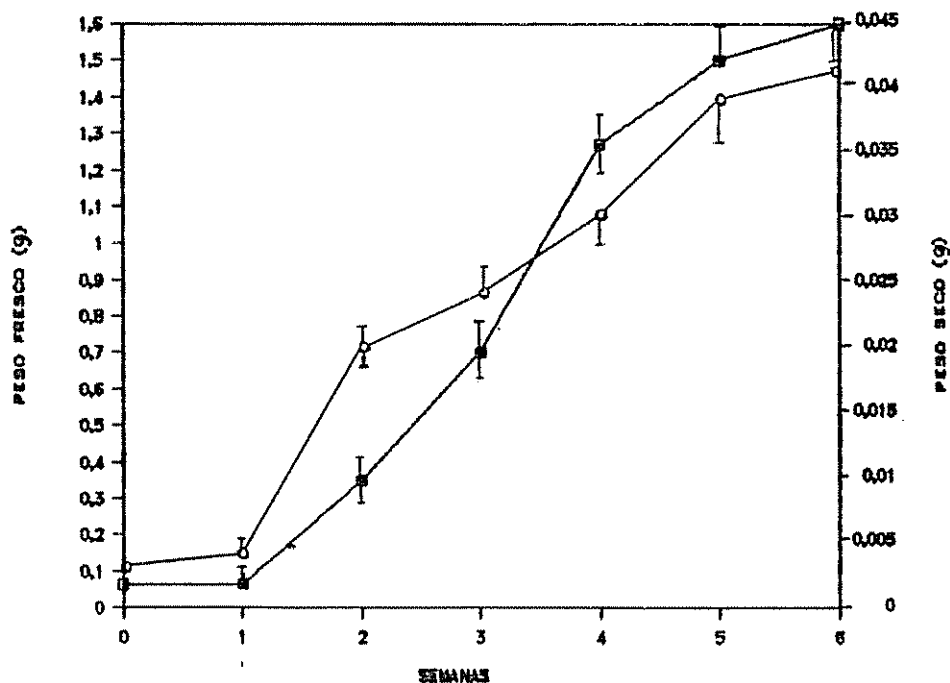


Figura 21. Incremento del peso fresco (□) y peso seco (●) de cultivos en suspensión a partir de cotiledones de cacao en un medio MS con AC enriquecido con CH y suplementado con 2,4-D.

15A ). Los mayores valores promedios de peso fresco se obtuvieron con 2,4-D ( 1 mg/l) y 2,4-D (1 mg/l) + CH ( 2000 mg/l). Estos tratamientos mostraron diferencias estadísticas respecto a los promedios de peso fresco obtenidos en los tratamientos con 2,4-D + AC y 2,4-D + CH + AC.

Las células crecieron rápidamente en el medio MS líquido, suplementado con 2,4-D, obteniéndose una suspensión densa, de color blanco amarillenta.

Las curvas de crecimiento para los cultivos en suspensión, obtenidos con los diferentes tratamientos se muestran en las figuras 18 a 21. La masa de células incrementó su peso de 109 mg (peso fresco) a 2200 mg, cuando el medio MS se suplementó con 1 mg/l de 2,4-D (Figura 18).

El incremento de peso fresco obtenido con el medio MS suplementado con 2,4-D ,y AC y enriquecido con CH a las 6 semanas fue de 25 veces no obstante fue el tratamiento con el que se obtuvo los valores menores de peso fresco.

## 5. DISCUSION

### 5.1 Sobrevivencia contaminación y oxidación

El factor fundamental en la sobrevivencia de los explantes fue la contaminación por microorganismos endógenos, principalmente bacterias. Esta fue mayor cuando a los ejes embrionales se les practicó algún corte durante la disección del mismo. Sweet y Bolston (1982) demostraron que los patógenos endógenos están presentes en la semilla y, en consecuencia en las plántulas obtenidas. Además señalaron que la presencia de estos contaminantes cambia con los lotes de semillas empleadas y con la duración del almacenamiento de éstas.

En forma adicional se presentó oxidación de los ejes embrionales; no obstante, ésta no afectó su sobrevivencia aunque en otras especies se determinó que la oxidación es un impedimento para la iniciación de un cultivo aséptico (Bonga 1982). La oxidación se presentó en aquellos ejes con remoción parcial de los cotiledones y debido a las enzimas polifenoloxidasas y tirosinasas que se liberan o se sintetizan en los tejidos en que se practica alguna herida. La acción enzimática sobre los polifenoles y la tirosina provoca su oxidación y produce quinonas fitotóxicas que, a su vez pueden polimerizarse y afectar las proteínas (Bonga 1982).

Mahbubul et al., (1977) informaron de la presencia en los cotiledones de cacao de altas concentraciones de fenoles totales particularmente leucocianidina y epicatequina.

## 5.2 Parámetros morfológicos en ejes embrionales de cacao del híbrido POUND 7 x UF 613 y EET 95 X SCA 6 en un medio MS enriquecido con glutamina y caseína hidrolizada

La primer respuesta morfogénica de los ejes embrionales provenientes de semillas normales de cacao se presentó con un alargamiento del eje hipocotilo-radicular y un crecimiento muy lento del epicotilo. Rangaswamy y Rangan (1963), estudiaron la respuesta de embriones de Cassytha filiformis, sin cotiledones y, encontraron una correlación directa entre la remoción parcial o total de los cotiledones y la inhibición de la morfogénesis del brote. La respuesta de los embriones desprovistos de cotiledones sugiere que las interacción nutricional-hormonal afecta el desarrollo normal de la planta. Khan et al., (1972) señalaron que la eliminación de los cotiledones puede afectar el embrión en varios aspectos específicos, interfiriendo en la síntesis de isoenzimas.

Aparentemente la glutamina y la caseína hidrolizada fueron factores importantes en la respuesta morfogénica obtenida en el cultivo in vitro de los ejes embrionales.

Debido al amplio significado de la glutamina en el metabolismo del nitrógeno en la planta, existen diferentes estudios sobre su utilización en los embriones. Un estudio comparativo realizado por Rijven (1955) sobre la utilización de glutamina y aspargina en embriones, en forma de torpedo, de 12 especies de plantas demostró sin excepción el gran efecto promotor del crecimiento que ejerce la glutamina, superior al de la aspargina.

La glutamina es una fuente de nitrógeno reducido y parece que funciona como agente de transporte y almacenamiento del nitrógeno (Muller y Krikorian, 1985).

El medio MS más glutamina incrementó el desarrollo de la radícula y del epicotilo. A nivel de organogénesis se ha demostrado que la adición de glutamina al medio aumenta marcadamente el desarrollo del brote en embriones de Ginkgo biloba (Ball 1959).

La mayor respuesta de los ejes embrionales se logró con el medio MS enriquecido con glutamina y caseína hidrolizada. En apariencia, se presentó un efecto sinérgico entre estos dos componentes ya que la respuesta de los ejes embrionales a éstos, en forma individual, fue menor (Cuadro 13 y 14). La caseína hidrolizada (CH) se utiliza para proporcionar al medio una mezcla natural de aminoácidos para la nutrición nitrogenada (Muller y Krikorian, 1985). Sin embargo, se considera que el efecto promotor del



crecimiento por parte de este componente también se debe a su alta presión osmótica, ya que los componentes usuales de una preparación comercial de CH son aminoácidos, cloruros y fosfatos inorgánicos. Los estudios realizados con estos componentes, ya sea en forma individual o en combinación de dos o tres de los componentes en el medio basal, mostró que la germinación es inhibida por completa en un medio que contiene una mezcla de aminoácidos y cloruro de sodio con o sin fosfatos. Esto demuestra que en este caso, la probable función de la CH no es solo nutricional, sino que puede afectar el equilibrio osmótico durante su crecimiento (Raghavan y Srivastava 1982).

¶

### **5.3 Rescate de embriones de semillas aplanadas de cacao.**

Los embriones provenientes de semillas aplanadas de cacao presentan deformaciones principalmente en los cotiledones, que limitan su germinación en condiciones de invernadero. El medio basal MS modificado y enriquecido con glutamina ( $200 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ) y CH ( $200 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ) permitió el desarrollo de estos embriones y su rescate. Esto permitió caracterizar diferentes tipos morfológicos que eventualmente podrían correlacionarse con los tipos de haploides existentes en cacao, mediante el conteo cromosómico o el uso de técnicas electroforéticas. Lanaud (1987) efectuó el rescate de embriones provenientes de semillas aplanadas de cacao en un medio con macroelementos MS diluido un 50 %,

microelementos de Heller, FeEDTA , vitaminas de Morel, glucosa al 2 % y BA<sup>-</sup> ( $10^{-7}$  mg·l<sup>-1</sup>), sin embargo el porcentaje de plántulas que sobrevivieron más de tres meses, después de transferido al invernadero (67 %), fue menor al obtenido en el presente estudio (93 %). El rescate se efectuó en el medio MS enriquecido con caseína hidrolizada y glutamina .

Las plántulas haploide se verificaron mediante el conteo de cromosomas en hojas jóvenes obteniendo un 1,70 del total de plantas desarrolladas a partir de embriones de semillas aplanadas. Los estudios de Dublin, 1978 muestran que el porcentaje de haploides espontáneos varía de una descendencia a la otra y en una misma descendencia la variación se presenta de un grupo de semillas a la otra. Sus resultados muestran porcentajes de 0.03 a 1.8 de haploidía. Los valores de 1.8 % de haploidía supera en 20 veces el observado a partir de semillas poliembriónicas (Dublin, 1978).

El empleo de un medio MS modificado y enriquecido con glutamina y caseína hidrolizada permitió la regeneración de plantas en los híbridos IMC 67 X UF 654 , POUND 7 UF 613 UF 613 X IMC 67 . La organogénesis se presentó tanto en el hipocotilo, como en el cotiledón.

Esta regeneración de plantas se obtuvo en un medio carente de reguladores de crecimiento, a diferencia de Lanaud (1987) quién informó sobre la regeneración de embriones somáticos a partir de hipocotilo y cotiledones de

semillás aplanadas en un medio MS modificado y suplementado con BA ( $10^{-7}$  mg·l<sup>-1</sup>).

La presencia de caseína hidrolizada y glutamina parecen ser factores importantes en la formación de embriones somáticos que se observó en embriones provenientes de semillas aplanadas de cacao. Novak (1985) obtuvo regeneración de estructuras embriogénicas a partir de cotiledones de semillas normales e inmaduras de cacao en un medio MS suplementado con 10 uM de ANA y 2 g·l<sup>-1</sup> de CH. El efecto de este último componente parece ser importante debido a que no se observaron embriones somáticos en un medio libre de CH.

#### 5.4 Efecto del ANA más BA y 2,4-D sobre la inducción del callo a partir de cotiledones de cacao.

Los reguladores de crecimiento ANA y BA en dosis de 1 mg·l<sup>-1</sup> y 3 mg·l<sup>-1</sup> respectivamente, ofrecen la posibilidad de producir plantas a partir de embriones somáticos sin pasar por una etapa previa de callo. Aunque con esta proporción ANA:BA se logró inducir callo, su desarrollo no superó al observado con 2,4-D. Skoog y Miller (1957) determinaron que el desarrollo organizado se presenta como resultado de las interacciones cuantitativas entre los reguladores de crecimiento, especialmente entre las auxinas y citocininas y, entre éstos y otros factores; sin embargo es necesario tener un balance cuantitativo de los diferentes

constituyentes químicos del medio que interactúan con el tejido para determinar el curso de su desarrollo tal y como señaló Thorpe (1978),

En cacao se demostró la iniciación de callo y la producción de embriones somáticos mediante su cultivo in vitro (Essan, 1977; Pence et al., 1979; Kononowicz et al., 1983; Adu-Ampomah, 1987). Estos resultados son confirmados con los obtenidos en el presente estudio, sin embargo la frecuencia de embriones somáticos obtenida a partir de cotiledones fue muy baja, probablemente por tratarse de embriones de semillas aplanadas maduras.

#### 5.5. Efecto del AC, CH, BA. 2iP sobre el desarrollo de callo a partir de cotiledones de semillas aplanadas de cacao

La eliminación de auxinas y la suplementación del medio con AC, CH, BA y 2iP promovieron el crecimiento de callo bastante friable. Este crecimiento de callo fue superior en el medio suplementado con AC (10 %). Además, este mismo tratamiento promovió la formación de callo en los embriones somáticos obtenidos con  $1 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  de ANA y  $3 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  de BA lo que impidió su desarrollo potencial. Este fenómeno de formación de callo en embriones somáticos también fue informado por Pence et al. (1979), Essan (1975) y Adu-Ampomah (1987) y, parece ser, uno de los problemas que se debe superar para la obtención de plantas de cacao vía

embriogénesis somática. Este problema se ha tratado de explicar mediante por la producción continua de un factor endógeno especialmente en el cotiledón del embrión somático, el cual promueve esta formación de callo que se incrementa si los embriones se cultivan en un medio con reguladores de crecimiento exógeno, los cuales son esenciales para promover la diferenciación (Novak 1985; Adu-Ampomah 1987). Los resultados obtenidos por Adu-Ampomah (1987) muestran que con el empleo de un medio líquido y la remoción de los cotiledones, se minimiza la formación de callo y los embriones somáticos pueden diferenciarse hasta el estado de planta en presencia de  $AG_3$ , ANA e IBA.

#### 5.6. Cinética de crecimiento de callos de cotiledones de cacao inducidos y desarrollados con 2,4-D, CH y AC.

El medio MS suplementado con 2,4-D ( $1 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ ) y enriquecido con CH y AC suministró los nutrientes necesarios para la iniciación y el desarrollo del callo a partir de cotiledones de semillas aplanadas de cacao en el híbrido POUND-7 X CATONGO. Los resultados obtenidos por Kononowicz *et al.*, (1984) indican que los callos embriogénicos obtenidos en dos clones de cacao BC-5 y BC-36 pueden ser forzados a producir un callo homogéneo con una combinación de agua de coco y  $1 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  de 2,4-D o, a producir una alta frecuencia de embriogénesis con solo 2,4-D a una concentración de  $10^{-3}$  a  $10^{-2} \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ .

La adición de agua coco ejerció un efecto positivo sobre el crecimiento del callo, aunque no superó el peso fresco y el peso seco obtenido con el medio enriquecido con CH (Fig. 16 y 17). El efecto del agua de coco posiblemente se deba a las sustancias promotoras de crecimiento (Steward y Caplin 1952; Lethan 1974)

### 5.7. Cultivos en suspensión celular

El cultivo de células de cacao en suspensión celular se logró con éxito a partir de callos de cotiledones provenientes de semillas aplanadas en un medio MS líquido suplementado con 2,4-D y 2,4-D + CH. Con la adición de agua de coco al 10 % al medio basal MS suplementado con 2,4-D, se obtuvieron valores de peso fresco y seco menores a los obtenidos en el medio suplementado con CH, sin embargo, siempre se observó un buen desarrollo de la suspensión celular con un incremento de 25 veces, en 6 semanas, con subcultivos realizados cada 14 días. Tsai y Kinsella (1981) establecieron el cultivo de suspensión celular en un medio líquido MS con un incremento en peso fresco y peso seco de 20 veces en 14 días, resultado que se compara favorablemente con el incremento de 6 a 8 obtenido por Hall y Collins, (1975).

No se observó organogénesis en el cultivo en suspensión. Esta respuesta negativa a la diferenciación fue informada por diferentes autores (Hall y Collins 1975; Pence

et al., (1979). Según Pence et al., (1979), la embriogénesis asexual se presenta solo en cotiledones inmaduros de cacao y en el presente estudio la suspensión celular se inició a partir de callo de cotiledones maduros de semillas aplanadas.

## 6. CONCLUSIONES

Bajo las condiciones experimentales en que se llevó a cabo el presente estudio se desprenden las siguientes conclusiones.

1. El medio basal de Murashige y Skoog modificado y enriquecido con caseína hidrolizada y glutamina permite el rescate in vitro de embriones provenientes de semillas aplanadas de cacao provenientes de diferente híbridos.
2. Se observó organogénesis y embriogénesis en cotiledones e hipocotilos de semillas aplanadas en un medio exento de reguladores de crecimiento, enriquecido con CH y glutamina.
3. La caracterización morfológica observada en las plántulas obtenidas de embriones de semillas aplanadas, permitió diferenciar, en forma preliminar, su nivel de ploidía.
4. La combinación de los reguladores de crecimiento ANA y BA en dosis de 1 y 3  $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$  respectivamente, permite obtener embriones somáticos sin pasar por una etapa previa de callo.
5. La inducción y desarrollo del callo se obtuvo con éxito suplementando el medio MS con 1  $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$  de 2,4-D.



6. El desarrollo de callos fue mayor en los medios suplementado con agua de coco ( 10 % ) y Caseína hidrolizada.

## 7. RECOMENDACIONES

Con base en los resultados obtenidos en el presente estudio se plantean las siguientes recomendaciones:

1. Continuar con los estudios que aseguren el desarrollo y la conservación del estado haploide.
2. Obtener perfiles electroforéticos de las plántulas haploides que permita determinar su origen.
3. Realizar estudios histológicos a fin de identificar la ontogenia de los brotes observados en embriones provenientes de semillas planas en el medio MS suplementado con CH y glutamina.
5. Efectuar estudios que permitan el desarrollo de embriones somáticos obtenidos en embriones de semillas planas, y determinar su nivel de ploidía.
4. Identificar los factores que determinan la capacidad organogénica tanto en callos en medios sólidos como en cultivos en suspensión.

## 8. BIBLIOGRAFIA

- ADU-AMPOMAH, F.; J.F. NOVAK; . AFZA R.; VAN DURREN. 1987. Embrioid and plant production from cultured cocoa explants. In International Cocoa Research Conference. (10, Santo Domingo R.D) 1987, Proceedings. Santo Domingo, República Dominicana. p. 129-136.
- \_\_\_\_\_. 1987 Determination of methodology to obtain shoot tip culture of cocoa. In : International Cocoa Research Conference (10, 1987, Santo Domingo R.D.). Proceeding. Santo Domingo, Republica Dominicana .p.129-142.
- ALVAREZ, M. N., ASCHER, P. D. ; DAVIS, D.W. 1981. Inter-specific hybridización in Euphaseolus through embryo-rescue. Hortscience (EEUU) 16(4):541-543.
- AMEFIA, K.; DJIEKPOR, E. K. ; PARTIOT M. 1984. Etude du polymorphisme enzymatique chez le cacaoyer. I Mise au point d'une methode d'extraction et mise en évidence d'un locus specifiant une esterasa. Cafe, Cacao, The (Francia) . 27(2):89-94.
- ATKINSON, M. D., WITHERS, L. A; SIMPSON, M.J. A 1986 Characterisation of cacao germplam using isoenzyme markers. 1. A preliminary survey of diversity using starch gel electrophoresis and standardisation of the procedure. Euphytica (Holanda) 35:741-750.
- ARCHIBALD, J. F. 1954. Culture in vitro of cambial tissue of cocoa. Nature (G.B). London 173:351-352
- BALL, E. 1959. Growth of the embryo of Gynko biloba under experimental conditions. 3. Growth rates of root upon media absorbed through the cotyledons. American Journal Botany (EE.UU.) 46:130-139.
- BEELEN, J. 1984. Introductory course on in vitro culture. Wageningen, Netherlands, Agricultural University Department of Tropical Crop Science, p 24.
- BHOYWANI, S.; RAZDAN, M.K. 1983. Zigotic embryo culture. In Bhojwani ; Razdan, M.K. Plant tissue culture theory and practice. Amsterdam, Elsevier p 199-235.
- BRAAK, J.P. ; KQOISTRA, E.A. 1975. A succesful cross between Phaseolus vulgaris L. and Phaseolus rutensis Jones with the aid of embryos culture. Euphytica (Holanda) 24(3):669-679.

- BURGHARDOVA, K; TUPY, D J.. 1980. Utilization of exogenous sugars by excised maize embryos in culture. *Biologia Plantarum* ( Checoslovaquia) 22(1):57-64.
- CAMPOS, F.F. ; MORGAN, D.T. 1960. Genetic control of haploid in Capsicum frutescens L. following crosses with untreated and X rayed pollen. *Cytologia* (Japón) 25:362-372.
- CHASE, S.S. 1969. Monoploids and monoploids-derivatives of maize (Zea mays L.) *Botanical Review* (EE.UU). 35:117-167.
- CLAUDE, B. 1978. Cultures de tissus et haploïdie, Tissue cultures and ploidy (of plant of reference to coffee, cacao and the plants. *Café, Cacao, Thé* (Francia) 22(1):74-79.
- COLLINS, G.B.; y LEGG, P.D 1974. The use of haploids in breeding allopolyploid species. In . Haploids in higher plants Advances and potential. Proceedings of the first international Symposium. Ed. by J.Kasha. University of Guelph. p 321-247.
- \_\_\_\_\_, G.B. ; GROVER , J.W. 1984. Culture of embryos In Cell culture and somatic cell genetic of plant; laboratory procedures and their applications. Ed. by I.K. Orlando, Fla., Academic Press, p 241-247.
- DIXON, R.A. 1985 . Isolation and maintenance of callus and cell suspension cultures. In Plant cell culture: a practical approach. Ed. by R.A. Dixon. Washington, D.C. s.p.
- DUBLIN, P. 1972. Polyembryonie et haploïdie chez Theobroma cacao L. *Café, Cacao Thé* (Francia) 16(4) p 295-231.
- \_\_\_\_\_. 1973 Les " Feves plates" une nouvelle source d'haploïdie chez le cacaoyer (Theobroma cacao L.) *Café, Cacao ,Thé* (Francia) 17(1): 25-36
- \_\_\_\_\_. 1973. Note sur l'utilisation un marqueur génétique dans les recherches d'haploïdie chez le cacaoyer (Theobroma cacao L.) *Café, Cacao, Thé* (Francia) 17(3): 205-209.
- \_\_\_\_\_. 1978. Haploïdes diploïdizes et obtention de génotypes homozygotes fertiles chez les cacaoyers cultivés (Theobroma cacao L.) *Café, Cacao, Thé.* (Francia) 22(4):275-284.

- \_\_\_\_\_. 1984. Cacao. In Handbook of plant cell culture. Vol. 3. Crop Science. Ed. P.V. Ammirato; D.A. Evans, W.R. Sharp, Y.Yamada. p 541-563.
- ESAN, E. B. 1975. Tissue culture studies on cacao (Theobroma cacao) A supplementation of current research Conference. 1st-9th September. Ibadan, Nigeria. 7p. Mimeographed .
- ESAN, E.B. 1982. Shoot regeneration from callus derived from embryo axis cultures of Theobroma cacao in vitro Turrialba (C.R)36(4):
- EVANS, A. M. 1962. Species hybridation in Trifolium. 1 Methods of overcoming species incompatibility. Euphitica(Holanda) 11(2):164-176.
- EVANS, D.A.; SHARP,W.R ; MEDINA-FILHO H.P. 1984. Somaclonal and gametoclinal variation. American Journal Botany (EE.UU.)7(16):759-774.
- GUHA, S ; ,MAHESHWARI S.C. 1964. In vitro production de embryos from anthers of Datura. Nature (G.B) 204:497.
- HALL, T.R.H.; COLLINS, H.A . 1975. Initiation and growth of tissue cultures of Theobroma cacao. Annals of Botany (G.B). 39(161) 555,570.
- HALPERIN,W. 1966 . Alternative morphogenetic events in cell suspensions. American Journal of Botany (EE.UU). 53, 443-453.
- HARLAND, S.C. 1955 . The use of haploids in cotton breeding . Indian Journal of Genetics (India) 15:15-17.
- HONMA, S. 1955 . A technique for artificial culturing of bean embryos. Proceeding of the American Society for horticultural Science (EE.UU) 65:405-408.
- IBAÑEZ, M.L. 1964. The cultivation of cacao embryos in sterile culture. Tropical Agriculture (Trinidad). 41(4):325-328.
- IYER, R.D. 1982. Embryo and tissue culture for crop improvement, especially of perennials, germoplasm conservation and exchange relevance to developing countries. In International Symposium of Tissue Culture of Economically Important Plant (1981, Singapore) Proceedings. Singapore, University of Singapore. p 219-230.
- JALAL M.A.F., COLLIN H.A.. 1977. Polyphenols of mature plant, seedling and tissue cultures of Theobroma cacao Phytochemistry(G.B.). 16:1377-1380.

- JONES, L. H. 1974 Factors influencing embryogenesis carrot culture (Daucus carota L.) Annals Botany (G.B.).38.1077-1088.
- KAMADA, H.; HARADA H. 1979. Studies on the organogenesis in carrot tissue culture 1 effects of growth regulators on somatic embryogenesis and root formation. Zeitschrift fuer Pflazenphysioll (Alemania) 91, 255-266.
- KATO, H; KATEUCHI, M. 1963. Morphogenesis in vitro starting from single cells of carrot root Plant and Cell Physiology (Japan) 4:242-245.
- KHAN, A.A.; GASPAR, T.; ROE, C.H.; BOUCHET, M.; DUBUCO, M.D. 1972. Syntesis of isoperoxidasas in lentil embryonic axis. Phytochemistry (G.B.) 11,2963-2969.
- KIMBER, G. ; RILEY, R. 1963. Haploid angiosperms. Botanical Review (EE.UU.) 29:480-531.
- KONONOWICZ; H.; KONONOWICZ, A. K.; JANICK, J; 1984. Sexual embryogenesis via callus of Theobroma cacao L. Zeitschrift fuer Pflazenphysiol (Alemania) 113: 347-358.
- \_\_\_\_\_ ; JANICK, J. 1984. Response of embriogenesis callus of Theobroma cacao L. to gibberellic acid and inhibitors of gibberellic acid syntesis. Zeitchrift fuer Pflazenphysiology (Alemania) 113:359-366.
- KASHA, K.J. ; KAO, K.N. 1970. High frequency haploid production in barley (Hordeum vulgare L.) Nature (G.B.) 225(5235):874-876.
- LACADENA, J.R. 1974. Spontaneous and induced parthenogenesis and androgenesis. In Haploids in higher plants: Advances and potential. Proceedings of the first International Symposium. Ed by K.J. Kasha 1974. University of Guelph.
- LANAUD, CL. 1987. Nouvelles donnees sur la biologie du cacaoyer (Theobroma cacao L.) These Docteur d'Etat. Universite de Paris Sud. p. irr.
- \_\_\_\_\_. 1987. Origine génétique des plantes a phenotype maternel issues de croisement intra ou interspecificques des fèves plates ou de graines polyembryonnées chez Theobroma cacao L. Café, Cacao, Thé (Francia) 31(1):3-14.

- \_\_\_\_\_. 1986. Utilisation des marqueurs enzymatiques pour l'étude génétique du cacaoyer: Theobroma cacao L.1. Contrôle génétique et "linkage" de neuf marqueur enzymatiques. Café, Cacao, Thé (France) 30(4)269-277.
- \_\_\_\_\_. 1986. Utilisation des marqueurs enzymatiques pour l'étude génétique du cacaoyer: Theobroma cacao L. 2. Etude du polymorphisme de six systèmes enzymatiques. Café, Cacao, Thé (France) 30(4)271-277.
- \_\_\_\_\_. ; SOUNIGO, O.; AMEFIA, K.; PAULIN D. LACHENAUP. 1986. Nouvelles données sur le fonctionnement du système d'incompatibilité du cacaoyer et ses conséquences pour la sélection. In Conférence Internationale sur les Recherches Cacaoyers. Saint Domingue Mayo 1987.
- \_\_\_\_\_.; SOUNIGO, O.; PAULIN, D.; GOUYON, P.H. 1986. Sélection sexuelle et autoincompatibilité chez le cacaoyer. En prensa.
- \_\_\_\_\_. 1986. Origin of haploids and semigamy in Theobroma cacao L. En prensa en la revista Euphytica. .
- \_\_\_\_\_. 1987. Origine génétique del plantes a phénotype maternel issues de croisement intra ou interespécifiques, de fèves plates ou de graines polyembryonnées chez Theobroma cacao L. Café, Cacao, Thé (France) 31(1):3-14.
- \_\_\_\_\_. 1987. Doubled haploids of cocoa (Theobroma cacao L.) 1. Observations of fertility. Plant Breeding (Alemania) 99:187-195.
- \_\_\_\_\_. 1987. Doubled haploids of cocoa (Theobroma cacao L.). 2. Observations of monogenic and polygenic characters. Plant Breeding (Alemania) 99: 196-202.
- LARKIN, P.J.; SCOWCROFT, W.R. 1981. Somaclonal variation - a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. Theoretical and Applied Genetics (Alemania) 60:197-214.
- LETHAM, D. S. 1974. Regulators of cell division in plant tissues. 20. The cytokinins of coconut milk. Physiologia Plantarum (Dinamarca) 32:66-70.
- LITZ, R. E. 1984. Papaya. ed Handbook of plant cell culture, Crop species. In Sharp, W.R. New York, Macmillan v.2, p 360.
- LÖFLAND, H. B. 1950. In vitro culture of the cotton embryo. Botanical Gazette (EE.UU.) 111(3):307-311.

- MAGOON, M. L.; KHANNA, K. R. 1963. Haploid. *Caryologia* (Italia). 16(1):191-235.
- MARTINSON, V. 1972. Poliembryony in Theobroma cacao L. *Annals of Botany* (G.B.) 36:947-951.
- MEYER, J. R ; JUSTUS, N. 1960. Potential value of doubled haploids cotton. *Genetics* (EE.UU) 45:999.
- MOK, D.W.S, MOK, M.C.; RABAKOARIHANTA, A. 1978. Interspecific hybridization of Phaseolus vulgaris with P. lanatus and P. acutifolius. *Theoretical and Applied Genetics* (EE.UU) 52(5): 209-215.
- MONNIER, M. 1976. Culture of zygotic embryo. In *Frontiers of plant tissue culture*. 1978. Ed by T.A. Thorpe Calgary, Canada, University of Calgary Press. pp 277-286.
- MULLER, L.; KRIKORIAN, A.D. 1985. Glosario de los términos más frecuentemente empleados en el cultivo de tejidos vegetales. Turrialba, C.R., CATIE. s.p
- MURASHIGE, T. ; SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and biossays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum* (Dinamarca) 15:437-497.
- MURASHIGE, T. 1974. Plant propagation through tissue culture. *Annual Review of Plant Physiology* (EE.UU) 23:136-166.
- NESSLER, C. L. 1982. Somatic embriogenesis in the opium poppy, Papaver somniferum *Physiologia Plantarum* (Dinamarca) 15:453-458.
- NARAYANASWAMI, S. ; NORTOG, K. 1964. Plant embryo culture. *Botanical Review* (EE.UU) 30(4):587-628.
- NORTOG ,K. 1977. Embryos culture as a tool in the study of comparative and developmental morphology. In , eds *Plant cell and tissue culture: principles and applications*. Ed by Sharp, W.R. Columbus Ohio State University Press. p 179-202.
- NOVAK, F.J.; DONINI, B ; OWUSU, G. 1985. Somatic embryogenesis and in vitro plant development of cocoa (Theobroma cacao L.) *Proceedings of an international symposium on nuclear techniques and in vitro culture for plant improvement*. Viena, Austria. 19-23 august. p 443-449.
- \_\_\_\_\_. 1976. *Experimental embryogenesis in vascular plants*. London, Academic Press. 603 p.



- ORCHARD, J.E., COLLINS, N.A. ; HARDWICK, K. 1979. Culture of shoot apices of Theobroma cacao. *Physiologia Plantarum* (Dinamarca) 42:207-210.
- PASSEY, A.J. ; JONES. O.P. 1983. Shoot proliferation and rooting in vitro of Theobroma cacao.L. Type Amelonado. *Journal of Horticultural Science* (G.B). 58:589-592.
- PENCE V.C.; HASEGAWA, P.M.; JANICK, J. 1979. Asexual embryogenesis in Theobroma cacao L. *Journal of American Society for Horticultural Science* (EE.UU) 104(2):145-148.
- PRIOR, C. 1977. Growth of Oncobasidium theobromae in dual culture culture with callus tissue of Theobroma cacao L. *J. Genetics. Microbiology* 99:219-222
- RAGHAVAN, V. ; TORREY, J.G. 1964. Effects of certain growth substances on the growth and morphogenesis of immature embryos of Capsella in culture. *Plant Physiology* (EE.UU) 39(4):691-699.
- \_\_\_\_\_. 1977 Applied aspects of embryo culture. In *Applied and fundamental aspect of plant cell, tissue, and organ culture*. Ed by Reinert, J. y Bajaj. Y.P.S. Berlin, Springer Verlag, 1977. p 375-397.
- RAGHAVAN , V. 1966. Nutrition, growth and morphogenesis of plant embryos. *Biological Reviews* (G.B.)41(1):1-58.
- RAGHAVAN, V.; TORREY, J.G. 1963 Growth and morphogenesis of globular and older embryos of Capsella in culture. *American Journal of Botany* (EE.UU) 50(6):540-551
- \_\_\_\_\_; SRIVASTAVA. 1982. Embryos culture. In *Experimental embryology of vascular plantas*. Ed by B.M. Johri. New York. Springer Berlag. p 195-230.
- RANGASWAMY, M.S.; RANGAN, T.S. 1963. *In vitro* culture of embryos of Cassya filiformis L. *Phytomorphology* (India) 13:445-449.
- RIJVEN, A.H.C. G. 1955. Glutamine and asparagine as nitrogen sources for the growth of plant embryos *in vitro* . A comparative study of 12 species . *Australian Journal Biological Sciences* (Austalia) 9:511-527.
- SAKAI, A. ; SUGAWARA. 1973. Survival of proplar callus at super-low temperature after cold acclimatization . *Plant and Cell Physiology* (Japón) 14: 1201-1204.
- SARKAR, K.R.; COE, E.H. 1966. A genetic analysis of the origin of maternal haploids in maize . *Genetics* (EE.UU) 54 :453-464.

- SKOOG, F.; MILLER C.O. 1957. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultured in vitro. Symposium Society Experimental Biology 11:118-131.
- SMITH, J.G. 1973. Embryos development in Phaseolus vulgaris. 2. Analysis of selected organic ions, ammonia, organic acids, amino acids, and sugars in the endosperm liquid. Plant Physiology (EE.UU.) 51(2):454-458.
- SMITHIES, O. 1955. Zone electrophorèse in starch gels. group variations in the serum protein of normal human adults. Biochemical Journal 61:629-641.
- STEWART, F.C.; CAPLIN, S.M. 1952. Investigation on growth and metabolism of plant, cell. 3. Evidence for growth inhibitors in certain mature tissues. Annals of Botany. (G.B) 16:478-484.
- SWEET, H.C.; BOLTON, W.E. 1979. The surface decontamination of seed to produce axenic seedlings. American Journal of Botany. (EEUU) 66(6):692-698.
- THORPE, T.A. 1978. Physiological and biochemical aspects of organogenesis in vitro. In Frontiers of plant tissue culture 1978. Ed by T.A. Thorpe. Calgary, Canada, University of Calgary Press. p 49-50.
- TSAI, C.H.; KINSELLA, J.E. 1981. Initiation and growth of callus and cell suspension of Theobroma cacao. Annals of Botany (G.B) 48, 549-557.
- THOMPSON, W.; COLLINS, G.B.; ISSAC, H.S.; HARDWICK, K. 1987. Isolation of protoplast from Theobroma cacao L. In International Cocoa Research Conference (1987, Santo Domingo, R.D). Proceedings. Santo Domingo. República Dominicana. p 623-626.
- TURCOTTE, E. L.; C.V. FAESTER. 1967. Semigamy in Pima cotton. Journal Heredity. 58:54-57.
- TURCOTTE, E.L. ; FAESTER, C.V. 1973. The origin of 2n and n sector of chimerical Pima cotton plant. Crop Science (EE.UU) 13:111-112.
- WANG, Y. C.; JANICK, J. 1984. Inducing precocious germination in asexual embryos of cacao. HortScience (EE.UU) 19(6):839-841.
- \_\_\_\_\_. 1985. Characterizing the germination inhibitor from asexual embryo leachate of Theobroma cacao. Journal of American Society for Horticultural Science (EE.UU) 110(1):113-117.

- WINTON, L. L.; STETTLER, R.F. 1974. Utilization of haploidy in tree breeding . In Haploides in higher plants. Advances and potential. Proceeding of the first International Symposium, june, 1974. Ed by K.J Kasha : Canada. University of Guelph. p 259-273.
- WITHERS, L.A. 1984. Gerpplasm conservation in vitro present state of research and its application. In Crop Genetic Resources Methods and Application. Ed by J.H. Holden; J.T. Williams Eds. London. Gerge Allen and Unwin. p 138-157.
- \_\_\_\_\_. 1980. Tissue culture storage for genetic conservation. Rome,. IBPGR.
- YEUNG, E.C.; THORPE, T.A. ; JENSEN C.J. 1981. In vitro fertilization and embryon culture. In Plant tissue culture. Methods and applications in Agriculture. Ed. by Thorpe, T.A. ed. New York, Academic Press. p 253 271.
- YIDANA, J.A.; WITHERS, L. ; IVINS, J.D. 1987. Development of a simple methods for collecting and propagating cocoa germplasm in vitro. Acta Horticulturæ (Holanda) 212:95-97.

9. APENDICE

Cuadro 1A. Cuadrados medios, coeficientes de variación y significancia de las variables de crecimiento estudiadas en ejes embrionales de cacao del híbrido EET-95 X SCA-6 cultivados in vitro en 7 medios de cultivo durante 7 días.

Fuente de variación	Grados de libertad	Porcentaje de sobrevivencia	Longitud del hipoc-raiz	Número de raíces laterales
Tratamiento	6	111,90	0,319*	3,48
Error	21	89,68	0,117	2,16
CV		10,78	9,68	58

\* Diferencia significativa al 5 %

Cuadro 2A. Cuadrados medios, coeficientes de variación y significancia de las variables de crecimiento estudiadas en ejes embrionales de cacao del híbrido EET-95 X SCA-6 cultivados in vitro en 7 medios de cultivo durante 14 días.

Fuente de variación	Grados de libertad	Porcentaje de sobrevivencia	Longitud del hipoc-raíz	Longitud del epicotilo	Numero de hojas	Longitud de hojas	Número de raíces laterales
Tratamiento	6	50	0.68**	0.15**	1,95**	0,072**	5,94
Error	21	13,41	0.0840	1.6400	0,139	0,016	4,20
CV		13,63	7.33	41.09	53,22	70	75

\* Diferencia significativa al 5 %

\*\* Diferencia significativa al 1 %.

Cuadro 3A. Cuadrados medios, coeficientes de variación y significancia de las de crecimiento estudiadas en ejes embrionales de cacao del híbrido EET-95 X SCA-6 cultivados in vitro durante 21 días.

Fuente de variación	Grados de libertad	Porcentaje de sobrevivencia	Longitud del hipoc-raiz	Longitud del epicotilo	Numero de hojas	Longitud de hojas	Numero de raíces laterales
Tratamiento	6	95.24*	0.70*	0,293*	2,35*	1,140	5,44
Error	21	165,08	0,13	0,086	0,102	0,133	4,42
CV		15.64	8,45	79,21	28,21	50	51

\* Diferencia significativa al 5 %

\*\* Diferencia altamente significativa al 1 %.

Cuadro 4A. Cuadrados medios, coeficientes de crecimiento y significancia de las variables de crecimiento estudiadas en ejes embrionales de cacao del híbrido EET-95 X SCA-6 cultivados in vitro en 7 medios de cultivo durante 28 días.

Fuente de variación	Grados de libertad	Porcentaje de sobrevivencia	Longitud del hipoc-raiz	Longitud del epicotilo	Numero de hojas	Longitud de hojas	Número de raíces laterales
Tratamiento	6	96	0,91*	0,29**	3,449**	2,81**	5,44**
Error	21	160,71	0,12	0,086	0,078	0,13	4,42
CV		16,06	7,70	79	17,25	29,65	51,55

\* Diferencia significativa al 5 %

\*\* Diferencia significativa al 1 %.

Cuadro 5A. Cuadrados medios, coeficientes de variación y significancia de las variables de crecimiento, estudiadas en ejes embrionales de cacao del híbrido EET-95 X SCA-6 cultivados in vitro en 7 medios de cultivo durante 35 días.

Fuente de variación	Grados de libertad	Porcentaje de sobrevivencia	Longitud del hipoc-raiz	Longitud del epicotilo	Numero de hojas	Longitud de hojas	Numero de raices laterales
Tratamiento	6	105,95	0,91**	1,64**	4,43**	3,71**	16,63
Error	21	139,29	0,107	0,144	0,17	0,09	11,03
CV		15,36	6,85	41,09	22,35	18,77	47,99

\*\* Diferencia altamente significativa al 1 %.

Cuadro 6A. Cuadrados medios, coeficientes de variación y significancia de las variables estudiadas en ejes embrionales de cacao del híbrido POUND 7 X UF-613 cultivados in vitro durante 7 días.

Fuente de variación	Grados de libertad	Porcentaje de sobrevivencia	Longitud del hipoc-raiz	Numero de raices laterales
Tratamiento	6	690,47**	0,36**	1,69*
Error	21	42,86	0,317	0,78
CV		9,165	9,78	102,88

\* Diferencia significativa al 5 %

\*\* Diferencia altamente significativa al 1 %.

Cuadro 7A. Cuadrados medios, coeficientes de variación y significancia de las variables estudiadas en ejes embrionales del híbrido POUND-7 X UF-613 cultivadas in vitro en 7 medios de cultivo durante 14 días.

Fuente de variación	Grados de libertad	Porcentaje de sobrevivencia	Longitud del hipoc-raiz	Longitud del epicotilo	Número de hojas	Longitud de hojas	Numero de raices laterales
Tratamiento	6	630,96**	2,26**	0,09**	1,88*	0,094**	10,67
Error	18	56,35	0,27	0,016	0,57	0,014	6,49
CV		10,83	9,94	49,32	59,04	47,61	96,83

\* Diferencia significativa al 5 %

\*\* Diferencia significativa al 1 %.

Cuadro 8A. Cuadrados medios, coeficientes de variación y significancia de las variables estudiadas en ejes embrionales del híbrido POUND-7 X UF-613 cultivados in vitro en 7 medios de cultivo durante 21 días.

Fuente de variación	Grados de libertad	Porcentaje de sobrevivencia	Longitud del hipoc-raiz	Longitud del epicotilo	Número de hojas	Longitud de hojas	Numero de raices laterales
Tratamiento	6	672,62**	1,74**	0,474	2,85**	0,33	8,45
Error	21	82,14	0,252	0,292	0,1878	0,203	6,98
CV		13,28	9,14	115,63	25,25	77,37	72,96

\* Diferencia significativa al 5 %

\*\* Diferencia altamente significativa al 1 %.



Cuadro 9A. Cuadrados medios, coeficientes de variación y significancia de las variables de crecimiento estudiadas en ejes embrionales de cacao del híbrido POUND-7 X UF-613. cultivados in vitro durante 28 días.

Fuente de variación	Grados de libertad	Porcentaje de sobrevivencia	Longitud del hipoc-raiz	Longitud del epicotilo	Numero de hojas	Longitud de hojas	Numero de raices laterales
Tratamiento	6	683,33**	1,62**	0,92*	3,77**	2,34**	22,77
Error	21	86,51	0,32	0,37	0,375	0,20	13,35
CV		13,78	9,80	24,47	24,47	31,34	47,11

\* Diferencia significativa al 5 %

\*\* Diferencia significativa al 1 %.

Cuadro 10A. Cuadrados medios, coeficientes de variación y significancia de las variables estudiadas en ejes embrionales de cacao del híbrido POUND-7 X UF-613 cultivados in vitro durante 35 días.

Fuente de variación	Grados de libertad	Porcentaje de sobrevivencia	Longitud del hipoc-raiz	Longitud del epicotilo	Numero de hojas	Longitud de hojas	Numero de raices laterales
Tratamiento	6	590,4**	1,83**	1,25**	4,34**	3,97**	22,77
Error	21	80,95	0,45	0,39	0,49	0,21	13,35
CV		13,62	10,93	49,32	22,04	23,75	47,11

\*\* Diferencia altamente significativa al 1 %.

Cuadro 11A. Cuadrados medios, coeficientes de variación y significancia para el área del callo por efecto del medio basal MS con ANA + BA y 2,4-D.

Fuente de variación	Grados de libertad	Semanas			
		1a	2a	3a	4a
Trat/a	3	0,038**	0,081**	0,071**	0,227**
Error	16	0,001	0,001	0,0013	0,00039
CV		25,77	18,35	15,88	5,51

a. Efecto de ANA (1 mg/l) + BA (1 mg/l), ANA (1mg/l) + BA (3 mg/l), 2,4-D (1 mg/l).

\*\* Diferencia altamente significativa al 1 %.

Cuadro 12A. Cuadrados medios, coeficientes de variación y significancia para el área de call de cotiledones de semillas aplanadas de cacao por efecto de 5 tratamientos con reguladores de crecimiento durante 7 semanas de desarrollo.

Fuente de variación	Grados de libertad	Semanas						
		1a	2a	3a	4a	5a	6a	7a
Trat/a	4	0,0014**	0,00973**	0,0133**	0,00044*	0,06544**	0,0654**	1,301**
Error	12	0,000006	0,00050	0,000640	0,02727	0,00165	0,001650	0,018
CV		3,75	15,06	12,82	8,25	8,74	8,74	12,78

a. Efecto de BA (1 y 3 mg/l), 2ip (1 mg/l), CH (2g/l) y agua de coco (10 %).

\*\* Diferencias altamente significativas al 1 %.

Cuadro 13A. Cuadrados medios, coeficientes de variación y significancia para el peso fresco de callos en un medio basal MS suplementado con 2,4 -D, CH y AC.

Fuente de variación	Grados de libertad	Semanas						
		1ª	2ª	3ª	4ª	5ª	6ª	7ª
Trat/a	3	0,0099	0,011**	0,337**	0,529**	0,6606**	1,11**	1,301**
Error	12	0,0018	0,0005	0,00713	0,0041	0,041	0,011	0,018
CV		15,21	6,94	11,79	8,29	8,29	10,59	12,78

a. Efecto de 2,4-D (1mg/l), 2,4-D(1mg/l) + CH (2000 mg/l), 2,4-D (1 mg/l) + AC (10%), 2,4-D (1mg/l) + CH (1 mg/l) + CH + CA.

\*\* Diferencias altamente significativas al 1 % .

Cuadro 14A. Cuadrados medios, coeficientes de variación y significancia para el peso seco de callos en un medio basal MS suplementado con 2,4 -D, CH y AC.

Fuente de variación	Grados de libertad	Semanas						
		1ª	2ª	3ª	4ª	5ª	6ª	7ª
Trat/a	3	0,00117*	0,0016**	0,0035**	0,0091**	0,015**	0,019**	0,00056**
Error	12	0,000350	0,000150	0,000600	0,0012900	0,0006	0,00044	0,026000
CV		8,89	5,65	7,78	10,42	6,72	5,29	5,56

a. Efecto de 2,4-D (1mg/l), 2,4-D(1mg/l) + CH (2000 mg/l), 2,4-D (1 mg/l) + AC (10%), 2,4-D (1mg/l) + CH (1 mg/l) + CH + CA.

\* Diferencia significativa al 5 %.

\*\* Diferencias altamente significativas al 1 % .

Cuadro 15A. Cuadrados medios, coeficientes de variación y significancia del fresco de cultivos en suspensión celular en un medio MS suplementado con 2,4-D, AC y CH.

Fuente de variación	Grados de libertad	Semanas						
		0	1	2	3	4	5	6
Trat/a	3	0,0026**	0,0079**	0,064**	0,2877**	0,571**	0,340**	0,455
Error	15	0,00016	0,00043	0,0033	0,055600	0,1274	0,0247	0,036
CV	15	19	19	12,46	23,60	24,07	8,97	9,87

a. Efecto de 2,4-D (1mg/l), 2,4-D(1mg/l) + CH (2000 mg/l), 2,4-D (1 mg/l) + AC (10%), 2,4-D (1mg/l) + CH (1 mg/l) + CH + CA.

\*\* Diferencias altamente significativas al 1 % .

Cuadro 16A. Cuadrados medios, coeficientes de variación y significancia del peso seco de cultivos en suspensión celular de cacao en un medio con 2,4-D y CH.

Fuente de variación	Grados de libertad	Semanas						
		0	1	2	3	4	5	6
Trat/a	3	0,000000006	0,0000015	0,000017*	0,000104**	0,000104**	0,00017**	0,00046**
Error	15	0,000160000	0,00000073	0,0000027	0,000003	0,00000300	0,0000030	0,000043
CV		33,32	20,14	7,89	6,22	5,03	2,66	4,21

a. Efecto de 2,4-D (1mg/l), 2,4-D(1mg/l) + CH (2000 mg l), 2,4-D (1 mg/l) + AC (10%), 2,4-D (1mg/l) + CH (1 mg/l) + CH + CA.

\*\* Diferencias altamente significativas al 1 % .

Cuadro 19A Longitud promedio de hojas en embriones de cacao en diferentes híbridos provenientes de semillas aplanadas \*.

Híbrido	Longitud (cm) por semanas				
	1	2	3	4	5
UF 29 X UF 667	0,00	0,65	1,30	2,00	2,50
UF 667 X IMC67	0,00	2,25	2,80	3,20	3,70
EET 62 X SCA 6	0,00	2,00	2,50	3,00	3,40
UF 613 X SPA 9	0,00	0,00	0,50	1,20	1,80
UF 667 X SCA12	0,00	0,50	1,85	2,30	2,90
POUND 12 X CAT	0,00	0,70	0,90	1,40	2,10
CAT X POUND 7	0,00	0,40	0,70	1,25	2,00
POUND7 X UF667	0,00	0,40	0,65	1,25	1,90
UF 613X POUND7	0,00	0,00	0,60	1,30	2,20
EET 48 X SCA 6	0,00	0,40	0,70	1,25	2,10
UF 29 X POUND7	0,00	1,00	1,50	2,10	2,60
EET 62 X SCA 6	0,00	0,00	0,60	1,35	1,95
POUND7 X UF613	0,00	0,60	1,50	2,00	2,55

Cuadro 20A. Número promedio de hojas en embriones de cacao de diferentes híbridos provenientes de semillas aplanadas \*.

Híbrido	Semanas				
	1	2	3	4	5
UF 29 X UF 667	0,00	2,00	1,00	2,00	4,00
UF 667 X IMC67	0,00	2,00	4,00	4,00	4,00
EET 62 X SCA 6	2,00	2,00	2,00	2,00	2,33
UF 613 X SPA 9	0,00	0,00	1,33	2,00	2,00
UF 667 X SCA12	0,00	2,00	2,00	2,33	4,00
POUND 12 X CAT	0,00	1,40	1,40	2,00	2,00
CAT X POUND 7	0,00	2,00	2,00	2,33	4,00
POUND7 X UF667	0,00	0,00	0,00	2,00	4,00
UF 613X POUND7	0,00	0,00	1,00	1,33	2,00
EET 48 X SCA 6	0,00	1,00	1,00	2,00	4,00
UF 29 X POUND7	0,00	1,00	2,00	2,00	2,33
EET 62 X SCA 6	0,00	0,00	2,00	2,33	4,00
POUND7 X UF613	0,00	2,00	2,00	3,00	4,00

\* Promedio de 5 plántulas.

Cuadro 19A. Longitud promedio del epicotilo en embriones de cacao en diferentes híbridos provenientes de semillas aplanadas\*.

Híbrido	Longitud (cm) por semana				
	1	2	3	4	5
UF 29 X UF 667	0,00	0,30	0,50	0,90	1,40
UF 667 X IMC67	0,00	0,70	1,50	2,00	2,60
EET 62 X SCA 6	0,00	0,30	0,50	0,85	1,55
UF 613 X SPA 9	0,00	0,00	0,40	0,80	1,35
UF 667 X SCA12	0,00	0,30	0,50	1,00	1,55
POUND 12 X CAT	0,00	0,40	0,60	1,20	1,80
CAT X POUND 7	0,00	0,40	0,70	1,40	1,90
POUND7 X UF667	0,00	0,50	1,00	1,50	2,10
UF 613X POUND7	0,00	0,40	0,80	1,35	1,80
EET 48 X SCA 6	0,00	0,30	0,70	1,20	2,30
UF 29 X POUND7	0,00	0,45	0,90	1,60	2,20
EET 62 X SCA 6	0,00	0,50	0,90	1,40	1,90
POUND7 X UF613	0,00	0,40	1,00	1,30	2,10

Cuadro 20A. Número promedio de hojas en embriones de cacao de diferentes híbridos provenientes de semillas aplanadas\*.

Híbrido	Semanas				
	1	2	3	4	5
UF 29 X UF 667	0,00	2,00	1,00	2,00	4,00
UF 667 X IMC67	0,00	2,00	4,00	4,00	4,00
EET 62 X SCA 6	2,00	2,00	2,00	2,00	2,33
UF 613 X SPA 9	0,00	0,00	1,33	2,00	2,00
UF 667 X SCA12	0,00	2,00	2,00	2,33	4,00
POUND 12 X CA1	0,00	1,40	1,40	2,00	2,00
CAT X POUND 7	0,00	2,00	2,00	2,33	4,00
POUND7 X UF667	0,00	0,00	0,00	2,00	4,00
UF 613X POUND7	0,00	0,00	1,00	1,33	2,00
EET 48 X SCA 6	0,00	1,00	1,00	2,00	4,00
UF 29 X POUND7	0,00	1,00	2,00	2,00	2,33
EET 62 X SCA 6	0,00	0,00	2,00	2,33	4,00
POUND7 X UF613	0,00	2,00	2,00	3,00	4,00

\* Promedio de 5 plántulas.

Cuadro 21A. Longitud promedio de hojas en embriones de cacao en diferentes híbridos provenientes de semillas aplanadas.

Híbrido	Longitud (cm) por semanas				
	1	2	3	4	5
UF 29 X UF 667	0,00	0,65	1,30	2,00	2,50
UF 667 X IMC67	0,00	2,25	2,80	3,20	3,70
EET 62 X SCA 6	0,00	2,00	2,50	3,00	3,40
UF 613 X SPA 9	0,00	0,00	0,50	1,20	1,80
UF 667 X SCA12	0,00	0,50	1,85	2,30	2,90
POUND 12 X CAT	0,00	0,70	0,90	1,40	2,10
CAT X POUND 7	0,00	0,40	0,70	1,25	2,00
POUND7 X UF667	0,00	0,40	0,65	1,25	1,90
UF 613X POUND7	0,00	0,00	0,60	1,30	2,20
EET 48 X SCA 6	0,00	0,40	0,70	1,25	2,10
UF 29 X POUND7	0,00	1,00	1,50	2,10	2,60
EET 62 X SCA 6	0,00	0,00	0,60	1,35	1,95
POUND7 X UF613	0,00	0,60	1,50	2,00	2,55

\* Promedio de 5 plántulas.