



UNIVERSIDAD DE GRANMA
FACULTAD DE CIENCIAS AGRÍCOLAS



CENTRO DE ESTUDIOS DE BIOTECNOLOGÍA VEGETAL

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI

LA MANÁ-COTOPAXI-ECUADOR

**TESIS DE GRADO PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE INGENIERO
AGRÓNOMO**

TEMA:



**FORMACION DE CALLOS Y ESTABLECIMIENTO DE SUSPENSIONES
CELULARES EN EL CULTIVO DE CACAO (*THEOBROMA CACAO L.*)**

AUTOR:

PEDRO DE SANTIAGO CABRERA ESCOBAR

TUTOR

MSc. ANGEL LUIS ESPINOSA REYES

COTUTOR:

Dr. JUAN JOSE SILVA PUPO

2011

“AÑO 53 DE LA REVOLUCIÓN”



UNIVERSIDAD DE GRANMA
FACULTAD DE CIENCIAS AGRÍCOLAS



CENTRO DE ESTUDIOS DE BIOTECNOLOGÍA VEGETAL

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI

LA MANÁ-COTOPAXI-ECUADOR

TESIS DE GRADO PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE INGENIERO
AGRÓNOMO

TEMA:

FORMACION DE CALLOS Y ESTABLECIMIENTO DE SUSPENSIONES
CELULARES EN EL CULTIVO DE CACAO (*THEOBROMA CACAO L.*)

AUTOR:

PEDRO DE SANTIAGO CABRERA ESCOBAR

TUTOR

MSc. ANGEL LUIS ESPINOSA REYES

COTUTOR:

Dr. JUAN JOSE SILVA PUPO

2011

“AÑO 53 DE LA REVOLUCIÓN”

PENSAMIENTO



UNIDAD SIGNIFICA COMPARTIR EL COMBATE, LOS RIESGOS, LOS SACRIFICIOS, LOS OBJETIVOS, IDEAS, CONCEPTOS Y ESTRATEGIAS A LOS QUE SE LLEGA MEDIANTE DEBATES Y ANÁLISIS.

Fidel Castro.

DEDICATORIA

Este presente trabajo está dedicado para toda mi familia en especial para mi padre “Manuel Cabrera” que fue un hombre ejemplar y dio la vida por el trabajo honrado para así poder llevar el pan a casa diariamente y compartir con su familia, yo sé que desde el cielo está dándome la fuerza y bendiciéndome para que todo me salga bien como él lo desea, ya que siempre me guio por el buen camino y me dio excelentes ejemplos para seguir siempre adelante con una buena profesión para desempeñarla con responsabilidad y dedicación así como él lo hizo.

A mi madre “Consuelo Escobar” que me trajo al mundo y ahora como padre y madre nos está sacando adelante y así juntos superando la perdida de mi padre por eso me está dando el apoyo que necesito para así salir adelante y cumplir con el anhelo de ella que es verle a su hijo como todo un profesional a carta cabal.

A mi hermana “Diana” que con amor y esmero está pendiente de mí deseándome que todo me salga súper bien y ya que es mi única hermana quiero darle el mejor ejemplo de superación y satisfacción de haber cumplido con la meta.

A mi novia “Anita” que estando cerca y a la distancia me está motivando con el amor y confianza que me tiene, dando buenos consejos que me guían por el buen camino de Dios y me da la inspiración de cumplir con el objetivo propuesto y así poder compartir una vida de pareja junto a ella porque la Amo y está presente en mi corazón.

A todos mis Tíos: Piedad, Antonio, Inés, Mariana, Enriqueta, Marcelo y Hugo que están en las buenas y en las malas animándome y brindándome el apoyo que se necesita cuando se encuentra cerca y lejos de la familia que siempre se encuentra unida por el cariño que se encuentra presente en cada uno de ellos.

A mis primos y amigos que me demostraron siempre el respeto y bondad para compartir los buenos y malos momentos que se dieron en el pasar de los días.

Para la familia de mi novia que me demostró el aprecio al integrarme a ellos.

Pedro de Santiago Cabrera. Escobar

AGRADECIMIENTO

En primer lugar paso a agradecer a Dios por darme la vida y las ganas de seguir viviendo por brindarme siempre la bendición su sabiduría y dicha de verme triunfar y permitirme cada día ser mejor.

A mi padre “Manuel Cabrera” que siempre me enseñó el camino del bien y desde el cielo está apoyándome y deseándome éxitos.

Por consiguiente a mi madre querida “Consuelo Escobar” que sin ella no sería factible llegar a concluir con la meta y el objetivo de tener una profesión, ya que es la persona que más amo, es ese ser que está siempre presente y pendiente de lo que hago en el trajinar de la vida, le agradezco con todo el amor del mundo.

A mi hermana “Diana Cabrera” y mi novia “Anita García” son las dos mujeres que más amo, son el eje fundamental para mi superación y dedicación, les agradezco de todo corazón por compartir un momento de su tiempo para dialogar, escucharme y compartir ideas positivas que se llegue al cumplimiento de las mismas y mejorar la calidad de vida de la familia Cabrera Escobar gracias a esta excelente profesión.

A todos mis tíos de que son como mis papas quienes forman parte de la familia Cabrera Zambrano y a mis tíos que conforman la familia Escobar.

A la familia de mi novia que de una u otra forma supieron darme su apoyo moral y económico con mucho cariño.

A mi tutor MSc. “Ángel Espinoza” por dirigirme con esmero y dedicación hacia el camino de la superación de una forma desinteresada para realizar el trabajo de tesis.

A mi cotutor Dr. Juan Silva por diseñar el modelo de investigación y compartir su experiencia y conocimiento para el desarrollo de la tesis.

A la ayudante de laboratorio Leidy Arceo que estuvo pendiente y ayudándome de una forma u otra en la realización de la tesis.

Para la Universidad Técnica de Cotopaxi y sus docentes que me vieron crecer en sabiduría y albergarme en sus aulas aprendiendo y conociendo las ciencias del saber, también a la Universidad de Granma que me recibió para culminar mi estudio.

Pedro de Santiago Cabrera Escobar

RESUMEN

RESUMEN

Esta investigación se realizó en el Centro de Estudios de Biotecnología Vegetal de la Facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad de Granma Cuba, en el periodo comprendido de marzo a agosto del 2011, con el objetivo de evaluar el efecto de altas concentraciones de 2,4-D en la formación de callos en cacao (*Theobroma cacao* L.) y el establecimiento de suspensiones celulares en este cultivo. Se utilizaron como explantes, pétalos y estaminoides del clon CCN-51 cultivados en medios de cultivo con diferentes concentraciones de 2,4-D (0,0; 2,0; 5,0; 10,0 y 20,0 mg.l⁻¹) y en segundo experimento se establecieron suspensiones celulares a partir de callos obtenidos de estaminoides de los clones CCN-51 y del Híbrido EICB-234. Se obtuvo la formación de callos en todas las concentraciones evaluadas. Los pétalos mostraron una mejor respuesta a las altas concentraciones de 2,4-D, con valores de 100% de explantes con callos formados. Se logró el establecimiento de suspensiones celulares en ambos clones de cacao, el crecimiento de las suspensiones celulares, evidenciado por el incremento de la masa fresca y seca de la suspensión, estuvo relacionado con la composición del medio de cultivo utilizado y el genotipo, su crecimiento fue constante pero lento. Se observó que estaban constituidas por células individuales, esféricas, de citoplasma denso y agregados celulares con características embriogénicas.

ABSTRACT

ABSTRACT

This investigation was carried out in the Studies Plant Biotechnology Center of Granma University, Cuba, in the period of march to august of the 2011, with the objective of evaluate the effect of high concentrations of 2,4-D in the formation of in cocoa (*Theobroma cocoa* L.) clone, and the establishment of cellular suspensions in this crops. Explant of Petals and estaminoides of the clone CCN-51 cultivated in culture medium with different concentrations of 2,4-D (0,0; 2,0; 5,0; 10,0 and 20,0 mg.l⁻¹) were used. In second experiment cellular suspensions were establishment from callus obtained of estaminoides of the clones CCN-51 and of the Hybrid EICB-234. The formation of callus was obtained in all the evaluated concentrations. The petals showed a better answer at the high concentrations of 2,4-D, with values of 100% explantes with formed callus. The establishment of cellular suspensions was achieved in both clones of cocoa, the growth of the cellular suspensions, evidenced by the increase of the fresh and dry mass of the suspension, was related with the composition of the culture medium used and the genotip, its growth was constant but slow. It was observed that the cellular suspensions were constituted by individual, spherical cells, of dense cytoplasm and cellular attachés with embryogenics characteristic.

INDEX

INDICE

1.	Introducción.	1
2.	Capítulo II: Revisión bibliográfica.	4
2.1.	Generalidades del cultivo	4
2.1.1.	El cultivo del cacao. Origen y distribución geográfica.	4
2.1.2.	Taxonomía y características botánicas.	5
2.1.3.	Características del árbol del cacao.	7
2.1.4.	Plagas y enfermedades.	9
2.1.5.	Métodos de propagación.	9
2.1.5.1	Propagación sexual	9
2.1.5.2	Propagación asexual	10
2.1.6.	Cultivo de tejidos vegetales.	11
2.1.6.1.	Métodos de Regeneración.	12
2.1.7.	Medios de cultivo y hormonas de crecimiento	15
2.1.8.	Organogénesis.	15
2.1.9.	Embriogénesis somática.	16
2.1.9.1.	Callogénesis.	17
2.1.9.2	Diferenciación de embriones somáticos.	17
2.1.9.3	Multiplicación de células y embriones somáticos.	18
2.1.9.4.	Maduración de los embriones somáticos.	19
2.1.9.5.	Conversión en plántulas de embriones somáticos.	20
2.2.	Suspensiones celulares.	21
2.3.	Cultivo <i>in vitro</i> de cacao. Micropropagación.	23

3.	Capítulo III. Materiales y Métodos.	23
3.1.	Condiciones generales del trabajo.	23
3.2.	Experimento I. Efecto de altas concentraciones de 2,4-D en la formación de callos en cacao (<i>Theobroma Cacao</i> L.)	23
3.3.	Experimento 2. Establecimiento de suspensiones celulares en el cultivo de cacao (<i>Theobroma Cacao</i> L.)	25
4.	Capítulo IV. Resultados y Discusión.	28
4.1.	Experimento I. Efecto de altas concentraciones de 2,4-D en la formación de callos en cacao (<i>Theobroma Cacao</i> L.)	28
4.2.	Experimento 2. Establecimiento de suspensiones celulares en el cultivo de cacao (<i>Theobroma Cacao</i> L.)	37
5.	Capítulo V. Conclusiones.	43
6.	Capítulo VI. Recomendaciones.	44
7.	Capítulo VII. Bibliografía.	45

INTRODUCCION

I.-INTRODUCCIÓN

El cacao, (*Theobroma cacao* L.), es un árbol tropical originario del Amazonas y cultivado ampliamente a escala mundial. Es un cultivo de gran importancia a nivel mundial, al constituir la tercera mercancía agrícola exportada en el mundo después del café y del azúcar. En la actualidad existe una extensión de 854,2327 hectáreas y la producción total es de 422,3603 toneladas, con un rendimiento promedio de 4,944 kg/ha (FAO, 2009).

En Cuba las principales áreas de cultivo están en las provincias de Guantánamo, Santiago de Cuba, Granma y Holguín, con un área total de 5,089 hectáreas, con una producción de 1,387 toneladas y un rendimiento promedio de 2,725 kg/ha, inferior en un 50% a la media mundial (FAO, 2009). Entre las causas de los bajos rendimientos en Cuba se encuentran la carencia de material de propagación y clones altamente productivos, la despoblación y el manejo inadecuado de la poda y la sombra (Martínez, 2005).

Al comienzo de los años 90, Ecuador era uno de los líderes en el mundo en producción y procesamiento de cacao de buena calidad. (ICCO, 1995). Las cifras así lo demuestran: las exportaciones de cacao en grano, en 1996, fueron de 69 mil toneladas métricas, con un ingreso de \$ 91,73 millones. Ecuador tiene 85% de cacao fino y de aroma y 15% de cacao ordinario. (INEC, 1996)

Las empresas chocolateras del mundo están preocupadas por la política cacaotera del Ecuador. El país es calificado como el primero en calidad, aroma y sabor. La superficie cultivada de cacao es de 398,104 hectáreas, con una producción anual de 120,582 toneladas y un rendimiento de 3,028 t/ha, lo que significa 35,40 quintales de cacao por hectárea, al año (FAO, 2009).

El cacao de Ecuador es reconocido como uno de los mejores del mundo porque tiene un fino aroma frutal y floral. La variedad "Nacional" es una variedad de cacao criollo, endémica de Ecuador y que por muchos años ha sido cultivado por los pueblos indígenas y más recientemente por los colonos en un sistema de sombra con árboles nativos. En Ecuador la producción de

cacao está creciendo y las cooperativas están empezando a sembrarlo en mayor cantidad (MAGAP, 2010)

El chocolate, derivado del cacao, es uno de los alimentos más completos que existe y constituye un artículo común en muchos países por su contenido en grasas y proteínas, además de presentar un elevado valor alimentario en relación con su volumen y peso (Gostch, 1997).

La propagación del cacao puede realizarse a través de semillas, de injerto y de estacas enraizadas. (Irizarri y Rivera, 1999) expresaron que la utilización de semillas como método de propagación causó variabilidad genética entre las plantas obtenidas, manifestándose una elevada proporción de árboles de bajo rendimiento. Los sistemas de propagación vegetativa por injerto y estacas enraizadas están limitados por los bajos coeficientes de multiplicación, incompatibilidad del injerto con el patrón y el débil sistema radical de las estacas (Figueira y Janick, 1995; Traore y col, 2003).

La alta variabilidad genética observada en las plantas propagadas sexualmente, el alto costo y baja eficiencia de la propagación asexual, han obligado a los mejoradores y agricultores buscar otras alternativas de multiplicación de esta especie, además que permita mantener la estabilidad genética del cultivo y la calidad de su fruto. Las técnicas de cultivo de tejidos contribuyen a mejorar el sistema de multiplicación de la especie, ya que es capaz de mantener la uniformidad genética de genotipos deseables. La embriogénesis somática (ES) es un sistema que permite obtener clones con una arquitectura dimórfica normal y un sistema radical de gran anclaje, además de los otros potenciales que esta técnica presenta para el mejoramiento genético, intercambio y conservación de material (Maximova y col, 2002).

La ES en cacao ha sido trabajada desde la década de los 70; sin embargo, los resultados no fueron muy satisfactorios. Se han utilizados diferentes tipos de explantes (florales y foliares), genotipos y mezclas de medios de cultivo a fin de lograr regenerar clones que mantuvieran sus características genéticas en el tiempo (Esan, 1977; Aguilar y col, 1992; López-Báez y col, 1993; Alemanno y col, 1997; López-Báez y col, 2000). Recientemente, (Li y col, 1998)

desarrollaron un método eficiente de producción de ES a partir de explantes florales y combinaciones de Thidiazuron (TDZ) y 2,4-D (ácido diclorofenoxiacético).

El empleo de suspensiones celulares constituye una de las vías que proporciona una mayor cantidad de material para la siembra en un menor tiempo, la regeneración de plantas a partir de suspensiones celulares embriogénicas en agitadores orbitales, ha sido obtenida por varios autores en diferentes cultivos (Zamarripa y col, 1990; Petiard y col, 1992; Montes y col, 1995; Jiménez y col, 1995; Van Boxtel y Berthouly, 1996; Etienne y col, 1997; Cevallos, 2000)

En el cultivo del cacao se reportan pocos estudios relacionados con el establecimiento de suspensiones celulares.

Problema:

Pocos estudios relacionados con el efecto de altas concentraciones de 2,4-D en la formación de callos y el establecimiento de suspensiones celulares a partir de callos del cacao (*Theobroma cacao* L).

Hipótesis:

Es posible el empleo de altas concentraciones de 2,4-D para la formación de callos y el establecimiento de suspensiones celulares en el cultivo del cacao. (*Theobroma cacao* L).

Objetivo General:

- Evaluar la formación de callos y el establecimiento de suspensiones celulares en (*Theobroma cacao* L.) a partir de pétalos y estaminoides.

Objetivos Específicos:

- Evaluar el efecto de altas concentraciones de 2,4-D en la formación de callos de cacao utilizando explantes de pétalos y estaminoides.
- Establecer suspensiones celulares a partir de callos de estaminoides en clones de (*Theobroma cacao* L.).

*REVISIÓN
BIBLIOGRÁFICA*

II.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1.- GENERALIDADES DEL CULTIVO

2.1.1.- Origen y Distribución

El árbol de cacao es originario de la Amazonía, y más tarde se extendió a América Central, en especial México. Las culturas nativas de esta región, por ejemplo los olmec y los mayas, ya lo conocían y lo utilizaban, y lo consideraban como "el alimento de los dioses". En particular, los granos de cacao eran utilizados como moneda por los aztecas quienes también lo disfrutaban como bebida. Cristóbal Colón descubrió el cacao en América, pero el cacao en grano no fue bien acogido en aquel momento en Europa.

El árbol de cacao (*Theobroma cacao* L.) es normalmente un árbol pequeño, entre 4 y 8 m de alto, aunque si recibe sombra de árboles grandes, puede alcanzar hasta los 10 m de alto. El tallo es recto, la madera de color claro, casi blanco, y la corteza es delgada, de color café. El fruto (la nuez de cacao) puede alcanzar una longitud de 15-25 cm. Cada fruto contiene entre 30 y 40 semillas, que una vez secas y fermentadas se convierten en cacao en grano. Las semillas son de color marrón-rojizo en el exterior y están cubiertas de una pulpa blanca y dulce. Para obtener una producción ideal, los árboles de cacao necesitan una precipitación anual entre 1150 y 2500 mm y temperaturas entre 21°C y 32°C.

En Cuba las áreas destinadas a la producción de cacao se encuentran fundamentalmente en las provincias orientales: Guantánamo, Santiago de Cuba, Granma y Holguín (Márquez, 2003).

Su producción es inferior a un 50% a la media mundial. Las causas de estos bajos rendimientos se le atribuyen a la carencia de material de propagación, manejo inadecuado de plantación y afectación por plagas y enfermedades (Menéndez, 2002).

Actualmente en el municipio de Guantánamo, es el mayor productor de la isla, seguido por el Tercer Frente de la provincia, Santiago de Cuba, Cuba ocupa el lugar 14 en el mundo por su volumen de producción y los ingresos por la

exportación de este producto ascienden a siete millones de dólares anuales (Menéndez, 2002).

2.1.2.- Clasificación taxonómica:

Según C. Lineo que clasifíco así:

Reino: Plantae
Subreino: Tracheobionta
División: Magnoliophyta
Clase: Magnoliopsida
Subclase: Dilleniidae
Orden: Malvales
Familia: Malvaceae
Subfamilia: Byttnerioideae
Tribu: Treobromeae
Género: Theobroma
Especie: T. cacao
Nombre binomial: Theobroma cacao.

<http://es.wikipedia.org/wiki/Gl%C3%BAcido>, (10-05-11).

El cacao es una especie perenne, alógama, diploide ($2n= 20$), caracterizada por la presencia de ciertas poblaciones de un sistema auto e interincompatible entre el polen y el ovario (López-Báez 1994) y tiene un genoma pequeño de 2.01×10^8 bp. (Couch y col, 1993), (Silva, 2006)

Existen tres variedades de árboles de cacao. La más conocida es la variedad Forastero, que representa el 90% del cacao producido en el mundo. Se encuentra en África del Oeste y Brasil. El segundo grupo es el Criollo, que produce "cacao fino y de aroma", cultivado principalmente en el Caribe, Ecuador, Nueva Guinea, las Antillas, Sri Lanka, Timor Oriental y Java. Por último, existe la variedad Trinitario, que es un cruce entre el Criollo y el Forastero (Urquhart, 1963; Braudeau, 1970; Nosti, 1970; Engels, 1979; Castilla, 1981; Bekele, 1994).

Forasteros: El grupo de los forasteros comprende a los cacaos de Brasil y África Occidental, que proporcionan el 80% de la producción mundial. También

se llaman amazónicos, porque están distribuidos en forma natural, en la cuenca de ese río y sus afluentes. Se reconoce como centro de origen de este complejo genético el área localizada entre los ríos Napo, Putumayo y Caquetá, en América del Sur. Los estaminoides son pigmentados de violeta, las mazorcas son amarillas cuando maduran, con surcos y rugosidad poco conspicuos, lisos y de extremo redondeado. La cáscara de la mazorca es relativamente gruesa con mesocarpo fuertemente lignificado. Los granos son más o menos aplastados con cotiledones frescos de color púrpura oscura. Las semillas requieren de 4 a 6 días para la fermentación. (Según Engels y col, 1979) los cacaos tipo forasteros están divididos en cuatro subgrupos: Angoleta, Cundeamor, Amelonado y Calabacillo.

Los arboles de este grupo están considerados como los más vigorosos, de alto rendimiento, con semillas planas y púrpuras (Figueira y col, 1997). Los clones Forasteros en especial los tipos Bajo amazónicos son empleados en el 95% de la producción comercial de chocolate (Hancock y Fowler, 1994).

Criollos: El término criollo (indígena), originariamente fue atribuido por los conquistadores españoles, al cacao cultivado por ese entonces en Venezuela. Actualmente se ubican en este grupo todos los cacaos que muestran las mismas características de los antiguos criollos venezolanos, principalmente los tipos con cotiledones blancos que se cultivan en América Central, México, Colombia y parte de Venezuela. Tienen flores con estaminoides de color rosado pálido, mazorcas de color rojo o amarillo en estado de madurez, con diez surcos profundos, muy rugosos y punteados. Las semillas requieren de un corto período de tiempo para fermentar de 2-3 días, se les denomina comercialmente como "cacao fino". (Sondahl, 1990), señaló que cultivares de cacao tipo criollo tienen como inconveniente que presentan bajos rendimientos y son altamente susceptibles a enfermedades e insectos.

Trinitarios: Los Trinitarios son el resultado del cruce entre Criollos y Forasteros (Presilla, 2001). Después de muchos años de cruzamientos, éstos son comúnmente identificados por la localización geográfica (Figueira y col, 1997), existiendo una representación completa de variabilidad entre Forasteros y Criollos, de ahí que las características genéticas y de calidad sean intermedias

entre ellos. Los Trinitarios ocupan entre un 10 y un 15% de la producción mundial (Hancock y Fowler, 1994).

A la luz de las técnicas de biología molecular, tales como la determinación del ADN y su hibridación (Figueira y col, 1994), propusieron una nueva clasificación para el cacao teniendo en cuenta esos resultados.

2.1.3.- Características del árbol del cacao.

El árbol de cacao es de tamaño mediano, aunque puede alcanzar alturas hasta de 20 m cuando crece libremente bajo sombra intensa (Enríquez, 1985).

Sistema radical: El sistema es característico de las plantas dicotiledóneas, en el que se distingue la raíz principal, las raíces laterales (primarias y secundarias) y los pelos absorbentes (Castilla, 1981). La raíz principal puede profundizar de 30 a 40 cm en 4 ó 5 meses y de 70 a 80 cm en un período que oscila entre 5 y 6 años. Las raíces laterales solo se desarrollan en los primeros 20 cm alcanzando la máxima profusión en un suelo con espesa cobertura orgánico-vegetal.

Tallos y ramas: El tallo de la planta es inicialmente recto, muestra una corteza liza de color verde oscuro, el que cambia alrededor de los 18 meses de edad. Durante el engrosado toma un color pardo rojizo, y a medida que envejece se hace más oscuro e irregular, marcado por cicatrices producidas por la caída de hojas, mazorcas cosechadas y vástagos cortados. Todas las yemas axilares del eje ortotrópico dan retoños ortótropos. (Nosti, 1970).

El número de ramas de la corona generalmente es de cinco, pero puede variar el porte, a causa de traumatismos, cortes de chupones mal llevados, daños de insectos y podas a muy corta edad. El porte de las ramas y ramificaciones secundarias es subhorizontal en sentido oblicuo o transversal a la dirección gravitacional (plagiotropía). Su crecimiento es indefinido pero se manifiesta de forma discontinua, de manera general las brotaciones se producen de 4 a 5 veces al año.

Hojas: Las hojas del cacao son pigmentadas y su color varía según los clones (Urquhart, 1963) presentan dos estípulas en su base, y los pecíolos alcanzan una longitud de 7 a 9 cm las ubicadas en los ejes ortotrópicos y de 2

a 3 cm las localizadas en ramas plagiotrópicas, limbo entero, lanceolado, penninervio y puede alcanzar una longitud de 45 a 50 cm aproximadamente.

Flores: Pese a ser muy diminutas y delicadas poseen todas las envolturas y los órganos que caracterizan a una flor completa. Surge como inflorescencia en la corteza vieja del tronco y las ramas principales, así como en la parte deshojada de las ramificaciones secundarias. Florece a los 2 años de edad en variedades muy precoces, pero lo común, es que la primera floración ocurra en el tercer o cuarto año de vida. La flor del cacao es completa, hermafrodita, con cinco sépalos, cinco pétalos, diez estambres en dos grupos o verticilos de los cuales solo uno es fértil y un ovario supero de cinco carpelos fundidos (Dublin, 1984). Una planta adulta puede producir de 20, 000 a 100, 000 flores anualmente, pero solamente entre 1 y 5% de ellas se convierten en frutos.

Polinización: (Urquhart, 1963) expuso que el mecanismo de polinización de la flor del cacao, presenta características de mucho interés destacando la enorme pérdida de flores que se produce, pues un ligero examen muestra que de forma general solo un 5 % de los estigmas es polinizado. En estudios realizados se ha comprobado que en una floración abundante y bajo condiciones climatológicas favorables, solo fueron polinizadas un 12% de las flores. La flor del cacao no tiene néctar ni aroma que pueda atraer a los insectos, el polen resulta demasiado pegajoso como para ser una planta anemófila y la posición de las anteras dificulta la polinización. (Enríquez, 1985) expresó que muchos insectos actúan como agentes principales de polinización, especialmente una "mosquita" del género *Forcipomya*. Los demás agentes son de menor importancia.

Frutos: El fruto es una baya poliesperma indehisciente, que en nuestro idioma recibe el nombre de mazorca. Presenta un pericarpio carnoso compuesto por tres partes bien diferenciadas, el epicarpio carnoso y espeso, el mesocarpio delgado y duro y el endocarpio carnoso más o menos espeso. La baya puede tener de 20 a 50 semillas rodeada de una pulpa formada por el integumento externo del óvulo (Dublin, 1984).

Semilla: Vulgarmente se le conoce como haba, grano o almendra, alcanzan diferentes tamaños y formas de acuerdo con el clon. Dentro del fruto también difieren pues en los extremos son más pequeñas. Todo el volumen en el interior del tegumento está prácticamente ocupado por los cotiledones los que están fuertemente plegados, unidos en su base a una retícula y una gémula conocida como protuberancia celular rudimentaria (Dublin, 1984).

2.1.4.- Plagas y enfermedades.

El cacao es una de las plantas económicas que, al mismo tiempo que pueden sufrir daños considerables a causa de los insectos, también necesita de algunos de ellos en ciertos procesos reproductivos; por ello, un abuso en el uso indiscriminado de insecticidas puede conducir a posteriores fracasos económicos. Las plagas más importantes son: áfidos, ácaros, cápsidos, chinches y el barrenador del tallo (*Cerambycidae*) (Enriquez, 1985).

Entre las enfermedades más perniciosas se encuentran la escoba de bruja, enfermedad causada por *Crinipellis pernicioso*, la pudrición negra (*Phytophthora palmivora*), moniliasis (*Monilia roleri*) (Thévenin y Trocmé, 1996), muerte descendente (*Oncobasidium theobromae*) y antracnosis (*Collectotrichum gloesporioides*), todas ellas causadas por hongos. También se ha informado sobre una enfermedad causada por virus conocida como brote hinchado (*Cocoa swollen shoot virus*) (Sondalh, 1990).

En estudios efectuados en el macizo cacaotero de Baracoa se encontraron como principales enfermedades la pudrición negra (*Phytophthora palmivora*), la pudrición parda de la mazorca (*Botrydiplodia theobromae*), antracnosis en frutos y hojas causada por *Collectotrichum gloesporioides* Penz con un 50% de afectaciones en las hojas (Matos y col, 2002).

2.1.5.- Métodos de propagación

En el caso del cacao existen diferentes métodos de propagación entre los más comunes son: sexual y asexual.

2.1.5.1.- Propagación sexual

El método más común para la propagación del cacao es por medio de semilla, este método no exige una inversión en propagadores ni adiestramiento como lo exigen los métodos de propagación asexual. (Cuba, MINAGRI; 1987)

Para evitar las desventajas que tienen las semillas, se aconseja utilizar la mezcla de híbridos que se producen en áreas especializadas. Aunque entre los híbridos existe cierto grado de variabilidad, no significa riesgo alguno para el agricultor porque esa variación está dentro de los límites de aceptación. (Hunter, 1990).

2.1.5.2.- Propagación asexual

La propagación vegetativa se puede lograr a través de estacas enraizadas, injertos y acodos.

Propagación por estacas: Es uno de los métodos más empleados que requiere sustratos de enraizamiento, hormonas, sistemas de riego y atenciones muy rigurosas.

Propagación por injerto: Este método proporciona plantas con un buen desarrollo del sistema radical, es un mecanismo de multiplicación de plantas madres, la madurez máxima de la planta se alcanza entre 8 y 10 años de injertado y comienza a producir a los 4 años. El microinjertado en plántula es una técnica en la cual el injerto o fragmento de tejido vegetal, en forma de parche, contiene una yema brotada o que ha iniciado su desarrollo, y el patrón o portainjerto es en este caso una plántula que tiene entre 12 y 15 días de edad. Los mejores resultados han sido obtenidos utilizando el injerto de parche lateral de 6 x 10 mm, conteniendo una yema brotada de 2 a 3 mm, este parche es colocado en el hipocótilo de la plántula. El éxito de esta vía de clonación oscila entre el 60 y 80% de prendimiento, el crecimiento de la yema injertada es muy rápido, después de 4 a 5 meses del injerto, las plantas alcanzan un desarrollo que permite su trasplante al campo (Yow y Lim, 1994; López-Báez y col, 1997; INIFAP, 2000).

Propagación asexual *in vitro*: Los estudios en cultivos de tejidos han sido motivados por la necesidad de obtener grandes cantidades de propágulos de

cultivares de alto rendimiento. Existen varias vías para realizar la propagación asexual *in vitro*; entre ellas está la multiplicación de brotes de yemas a partir de yemas terminales, axilares o laterales, la organogénesis directa, la organogénesis indirecta, la embriogénesis somática, el microinjerto y el rescate de embriones (Krikorian, 1991).

2.1.6.- Cultivo de tejidos vegetales.

Los orígenes del cultivo de tejidos se remontan a 1902 con los primeros intentos realizados por Haberlandt de cultivar células aisladas de plantas, quien postuló el principio de la totipotencia celular como base teórica sobre la que se sustenta el cultivo de tejidos (Pérez y Gómez, 1998).

El cultivo de tejidos como técnica consiste esencialmente en aislar una porción de la planta (explante) y proporcionarle artificialmente las condiciones físicas y químicas apropiadas para que las células expresen su potencial intrínseco o inducido. Es necesario además adoptar procedimientos de asepsia para mantener los cultivos libres de contaminación microbiana. (Mroginski y Roca, 1991).

La importancia del cultivo de tejidos vegetales está directamente relacionada con los campos de aplicación que tiene esta técnica. (Jiménez, 1998).

- Propagación masiva de plantas.
- Mejoramiento genético y selección *in vitro* para la obtención de somaclones tolerantes a factores bióticos y abióticos como salinidad, sequia, enfermedades y otros.
- Obtención de plantas libres de patógenos.
- Conservación de germoplasma a corto, mediano y largo plazo a través de la conservación por mínimo crecimiento y la crioconservación.
- Obtención de metabolitos secundarios.
- Empleo para evaluar el efecto fisiológico de diferentes sustancias.

2.1.6.1.- Métodos de Regeneración.

Dos principales métodos de regeneración *in vitro* han sido utilizados para la propagación: la organogénesis, que se basa en la abolición de la dominancia apical y la proliferación de yemas axilares o adventicias y la embriogénesis

somática que es la formación de embriones a partir de células somáticas (Vasil, 1994).

2.1.7.- Medios de cultivo y hormonas de crecimiento.

Para el cultivo de meristemos y ápices no existe un medio universal, sin embargo el medio basal propuesto por (Murashige y Skoog, 1962) con algunas modificaciones en sus ingredientes ha sido el más frecuentemente utilizado, reportándose su utilización en la mayoría de las especies propagadas *in vitro*.

Un balance apropiado entre auxinas y citoquininas en el medio de cultivo es necesario para la formación de plantas a partir de meristemos, ápices o yemas. Este balance está determinado por las concentraciones endógenas de auxinas y citoquininas presentes en el explante, las cuales dependen de la especie y del tipo de explante. Algunas especies son cultivadas sin adición de ningún regulador externo, probablemente debido a que existe suficiente cantidad endógena de hormonas. (Kantha, 1981)

Usualmente en los meristemos y ápices la citoquinina endógena es baja debido a que el principal sitio de síntesis son las raíces, por lo que la adición exógena de citoquininas en los medios de establecimiento es generalizada. Estas reportan que en el 85 % de los medios de establecimiento se utilizan citoquininas, las más empleadas han sido la 6 Benzilaminopurina (6 BAP) (68 %), la kinetina (23%) y el 2ip y zeatina (9%). Aunque existen especies que pueden ser establecidas sin citoquininas, al parecer porque hay suficiente cantidad endógena de este regulador del crecimiento en los explantes.

Algo contrario sucede con las auxinas, ya que las zonas de crecimiento activo, los ápices y meristemos que son empleados como material inicial para el cultivo *in vitro*, son áreas de síntesis de auxinas por lo que la concentración endógena de las mismas es alta en ellos. Normalmente cuando se emplean ápices no se adicionan auxinas al medio aunque estas pueden estimular el crecimiento, pero en los meristemos de 0,4 mm o menos y en yemas en reposo es frecuente que no exista suficiente auxina endógena, siendo necesaria su adición exógena en estos casos. El ANA ha sido empleado en el 51% de los medios, AIB en el 27%, AIA en el 22% y 2,4-D en el 6% de los casos.

Las giberelinas han sido adicionadas sólo en el 17 % de los casos, al parecer en la mayoría de los explantes se sintetiza suficiente cantidad de estas

hormonas. Para el establecimiento de ápices en caña de azúcar solo es necesaria la adición de 6 BAP (0,2 mg/l) como único estimulador del crecimiento, lográndose no solo una mayor regeneración de los ápices en comparación con otras combinaciones con AIA (1.3 mg/l) o AG3, sino que se observó además una mayor producción de brotes durante el primer subcultivo de multiplicación. (Jiménez, 1995).

Entre los reguladores usados en el cultivo *in vitro* se encuentran las auxinas, citoquininas, giberelinas, ácido abscísico, etileno, poliaminas, jasmonatos y otros compuestos, (Deklerk, 1999).

Auxinas: Formación de raíces adventicias en altas concentraciones y de brotes adventicios en bajas concentraciones, inducción de embriogénesis somática, división celular, formación y crecimiento de callos e inhibición de yemas axilares y el crecimiento de raíces. Entre las auxinas encontramos el ácido indolacético (AIA), ácido indolbutírico (AIB), ácido naftalenacético (ANA), ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D), (González y col, 2007).

Citoquininas o Citocininas: Los principales efectos son en la formación de brotes adventicios, inhibición de la formación de la raíz, división celular, formación y crecimiento de callos, estimulación de la ruptura de las yemas axilares e inhibición de la elongación del brote y la senescencia de las hojas, (Frank y Schmülling, 1999).

Las citocininas son derivados purínicos, en especial de la adenina, que se han reportado en pequeñas cantidades en el agua de coco, jugo de tomate, extractos de flores, tubérculos y nódulos radicales, en frutos y semillas inmaduras de maíz (zeatina) hidrolizadas de ARNt de plantas o microorganismos, (González y col, 2007).

Entre las citoquininas naturales tenemos la zeatina, isopentil-adenina (IPA), dimetilamino-purina, dihidroxizeatina, metilzeatina. Son citoquininas sintéticas la kinetina (6-furfunil aminopurina), el 6-bencilaminopurina (6-BAP). Además de esas citoquininas derivadas de las purinas, han sido descritas otras citoquininas no purínicas como el thidiazuron (TDZ) y el CPPU (N-2-cloro-4-piridil N-fenil urea). Estos compuestos tienen una actividad histoquímica muy alta y son muy eficientes en las plantas maderables, (González y col, 2007).

Giberelinas: Son una familia de compuestos que son sintetizadas en puntos de crecimiento como embriones, meristemas o tejidos en desarrollo, estas son transportadas por el xilema y el floema. Su acción va dirigida hacia el crecimiento de los entrenudos, inducen y aceleran la floración, como acción contraria debe señalarse la inhibición del crecimiento normal de las raíces y tallos en cultivo de callos, (Crozier, 1981).

Ácido Abscisico: Este compuesto inhibe el crecimiento vegetal y tienen efecto en la maduración de los embriones somáticos, facilitan la aclimatación y en la formación de bulbos y tubérculos y promueve el desarrollo de la dormancia, (González y col, 2007).

Carbohidratos: La principal fuente de carbohidratos en los medios de cultivo es la sacarosa con un rango de 2 al 4 %. También se emplea la glucosa y la maltosa. Los glúcidos pueden sufrir reacciones de esterificación, aminación, reducción, oxidación, lo cual otorga a cada una de las estructuras una propiedad específica, como puede ser de solubilidad.

<http://es.wikipedia.org/wiki/Gl%C3%BAcido> (10-05-11).

Vitaminas y Aminoácidos: Las más empleadas en el cultivo *in vitro* se destacan la tiamina, la piridoxina, mioinositol y la glicina.

http://www.infoagro.com/frutas/reguladores_crecimiento.htm (10-05-11).

Agentes Gelificantes: Para medios semisólidos, se emplea como agente gelificante más común, el agar. En la actualidad se emplea también con muy buena aceptación el phytigel, que requiere menor cantidad que el agar para la gelificación de los medios y con un precio menor. (Bhojwani y Razdan, 1996).

Sustancias Naturales: Entre las sustancias empleadas una de las más comunes es el agua de coco, también se emplean los jugos de frutas, extractos de levadura y leche de maíz.

Disponible en: http://www.infoagro.com/frutas/reguladores_crecimiento.htm

Revisado el: (05-05-11).

Antioxidantes: Las oxidaciones fenólicas pueden constituir un serio problema en el cultivo *in vitro*, para su control y eliminación de las afecciones se emplean los antioxidantes. Entre los más comunes se encuentran el ácido ascórbico y el ácido cítrico, la polivinilpirrolidona, el carbón activado y la cisteína. (Jiménez, 1998).

2.1.8.- Organogénesis:

El más común de los métodos y que es conocido popularmente como micropropagación, es la organogénesis, esta se refiere al proceso en el cual las células pueden ser inducidas para formar plantas completas. Se caracteriza por la formación de un primordio unipolar a partir de una yema con el subsecuente desarrollo de este en un brote vegetativo, existiendo siempre una conexión entre los nuevos brotes y el tejido paterno. Los brotes pueden formarse directamente del explante o indirecta a partir de callos (Jiménez, 1998). Este método a pesar de no ser el más rápido ha sido el más ampliamente utilizado para la propagación comercial. En la actualidad existe un mayor conocimiento de la biología de este proceso que de la embriogénesis somática y técnicamente es mucho más simple y no requiere de mano de obra altamente calificada.

2.1.9.- Embriogénesis somática

La embriogénesis somática *in vitro* como sistema de propagación de plantas presenta una serie de ventajas frente a otros sistemas, porque tiene capacidad de multiplicación aplicable industrialmente, permite obtener en un sólo proceso estructuras completas con ápice y raíz y pueden ser almacenadas en gran cantidad. Este es un proceso que permite la obtención de embriones a partir de tejidos somáticos sin la intervención de las células gaméticas, ese resultado se debe a la totipotencia de las células vegetales, que se puede definir como la aptitud de las células diferenciadas para conservar su potencial genético y expresarlo en ciertas condiciones. (Kohlenbach, 1985). La historia de la embriogénesis somática *in vitro* comenzó con observaciones realizadas en plántulas regeneradas desde cultivares de callos de zanahorias. (En 1951, Reinert) propuso que las plantas aparecidas de zanahoria procedían de

embriones bipolares, los cuales se derivan de células únicas. Estas conclusiones se basaron en el análisis histológico de callos.

Los embriones somáticos son estructuras bipolares con un eje radical-apical y no poseen conexión vascular con el tejido materno, estas estructuras bipolares son capaces de crecer y formar plantas normales. Este método es considerado como el más eficiente para la producción masiva de plantas *in vitro* (Gómez, 1998).

Patrones de desarrollo:

- La embriogénesis somática directa, donde el embrión se origina directamente del tejido del explante y está asociado, en su origen a células proembriogénicas determinadas.

- Embriogénesis somática indirecta, donde el embrión se origina de un tejido indiferenciado (callo) embriogénico y está asociado a células diferenciadas que requieren la redeterminación, la proliferación de un callo y la inducción de células embriogénicas determinadas (Sondal y col, 1985).

La embriogénesis somática es un proceso complejo, a partir del cual un explante colocado en condiciones adecuadas puede dar origen a un callo. De este a su vez se diferencian los embriones somáticos. Tanto los callos como los embriones somáticos pueden ser propagados o multiplicados. Muchos son los factores que inciden directamente en el proceso de la embriogénesis somática tales como el genotipo de la planta, el tipo y estado fisiológico del explante, los reguladores del crecimiento y las condiciones de cultivo (Gómez, 1998).

2.1.9.1.- Callogénesis

El callo es un crecimiento desorganizado de células obtenido a partir de un determinado tejido. La formación del callo comienza con el aislamiento de órganos o tejidos diferenciados, los cuales posteriormente se diferencian ante la presencia de auxina exógena en el medio de cultivo. En las células se

presenta una proliferación continua, acelerada y de apariencia desorganizada, dando origen a una masa amorfa de tejidos. (Gómez, 1998).

Otro factor muy importante en la callogénesis son los reguladores del crecimiento, existiendo la tendencia hacia el empleo de las combinaciones de auxinas y citoquininas con una relación favorable a las primeras o el uso único de éstas. La más usual es el 2,4-D, empleada en caña de azúcar por (Castillo, 2000) y en combinación con kinetina en café (Santana, 1993). También se han empleado otras auxinas como el dicamba y el picloran en la inducción de callos en piña (Daquinta, 1998).

2.1.9.2.- Diferenciación de embriones somáticos.

En esta etapa se forman los embriones somáticos a partir de los callos embriogénicos desarrollados en la fase anterior.

Una vía simple para promover la diferenciación de embriones es la transferencia de callos inducidos en medios con 2,4-D y citoquininas a un medio de cultivo libre de reguladores de crecimiento (McKerrie y Brown, 1996). También en esta fase suelen reducirse los niveles de auxinas en el medio de transferencia o por el contrario añadir citoquininas para inducir la formación de embriones somáticos. En esta fase se obtuvieron buenos resultados en el cultivo de café con el empleo de 6-BAP en dosis de 5 mg/l con la formación de 41,670 embriones por litro de medio líquido en agitador orbital (Jiménez, 1995). (Castillo y col, 1998) emplearon una potente citoquinina, el tidiazurón (TDZ), combinado con 2,4-D para la formación de embriones somáticos en caña de azúcar. Los mejores resultados se obtuvieron en la variante con 0,022 mg/l de TDZ y 0,25 mg/l de 2,4-D.

Durante esta etapa los embriones se diferencian en embriones globulares, acorazonados y posteriormente, elongan y pasan a la etapa de torpedo. Los embriones se observaron de color verde a partir de la masa de callos (McKersie y Brown, 1996).

2.1.9.3.- Multiplicación de células y embriones somáticos.

La multiplicación de células y embriones somáticos se puede efectuar en medios semisólidos, medios líquidos en agitadores orbitales y biorreactores con control automático de parámetros como la agitación y el oxígeno, así como el

empleo de los sistemas de inmersión temporal; constituyendo una de las ventajas principales de la embriogénesis somática con respecto a la micropropagación por brotes axilares o segmentos nodales.

La tendencia principal en esta etapa del proceso es el establecimiento de suspensiones celulares en medios líquidos y la posterior formación de embriones en esas condiciones. Resultados del establecimiento de suspensiones celulares se han obtenido en café (Jiménez y col, 1995; Cevallos, 2000). (De Feria, 2001) y (Barbón, 2002) emplearon biorreactores para producir embriones somáticos en este cultivo.

Otra vía para la multiplicación de embriones es a través de la embriogénesis adventicia o secundaria. La embriogénesis secundaria se puede obtener tanto en medios semisólidos, como en medios líquidos en agitación o en sistemas de inmersión temporal. Esta multiplicación, según (Michaux-Ferriere, 1987) obedece a la reactividad de la capa de células epidérmicas y de otras capas subyacentes de células en los embriones somáticos. La embriogénesis adventicia es considerada como una forma de apomixis, un fenómeno que permite la formación de embriones sin fecundación de un oosfero (Parrot, 2002).

2.1.9.4.- Maduración de los embriones somáticos.

Luego de la división celular y la histodiferenciación, el período de desarrollo del embrión en el cual las células se expanden y ocurre la acumulación de las reservas es considerada como la fase de maduración (Merkle y col, 1995). El análisis de las reservas acumuladas en el desarrollo de los embriones somáticos ha revelado similitudes y diferencias con relación a los embriones cigóticos, esas diferencias pueden ser atribuidas primariamente a las condiciones de maduración *in vitro*.

En la sincronización fisiológica de la embriogénesis, ha sido empleado primariamente un regulador del crecimiento, el ácido absícico (ABA), éste regula algunos sistemas de cultivo embriogénicos, incluyendo a las coníferas y la zanahoria. El modo de acción del ABA en el desarrollo de los embriones no está claro, pero puede interferir con las funciones normales de los reguladores de crecimiento endógenos, causando un cambio en las condiciones que favorecen la embriogénesis. Alternativamente el ABA puede causar un

decrecimiento del contenido de agua en la célula. El rol del ABA en la maduración del embrión parece estar relacionado con la habilidad para suprimir la germinación. El ABA permite el desarrollo del embrión, pero inhibe el desarrollo de la planta (Gray, 1989).

Label y Lelu, (1994) trabajando con híbridos del género *Larix* obtuvieron la maduración de los embriones somáticos cuando emplearon ABA en concentraciones de 20, 40 y 60 μM , los embriones presentaban una coloración amarilla. Esos embriones fueron considerados y definidos como de alta calidad. Capuana y Debergh, (1997) mejoraron la maduración de embriones de *Aesculum hippocastanum* cuando fueron previamente cultivados en medios enriquecidos con ABA 80 μM o con PEG 4 000 (50 g.l^{-1}), lográndose un incremento de la viabilidad, la elongación de los brotes y la conversión en plantas.

2.1.9.5.- Conversión en plántulas de embriones somáticos.

La embriogénesis somática ha sido obtenida para un gran número de especies, incluyendo varias plantas forestales, la baja eficiencia de la germinación y conversión de plántulas es un problema principal, afectando mucho a los sistemas embriogénicos descritos (Tulecke, 1987).

Komatsude y col, (1992), consideraron la germinación de los embriones somáticos como la recuperación u obtención de plántulas a partir de éstos. El empleo del ácido giberélico en diferentes niveles favoreció la germinación de los embriones somáticos de soya, lográndose el desarrollo de brotes con un crecimiento vigoroso.

Label y Leln, (1994) obtuvieron la germinación de embriones somáticos maduros de híbridos del género *Lacix* luego de transferirlos a un medio MS sin reguladores del crecimiento. Se consideró que los embriones germinaron cuando emergió la radícula. Las raíces primarias se caracterizaron por presentar meristemas verdaderas o reales.

El porcentaje de germinación se incrementó cerca del 10% cuando los embriones maduros fueron pre tratado a 4°C en la oscuridad durante dos meses y por desecación a 25°C en la oscuridad por 3 ó 5 días bajo un aire húmedo condicionado por soluciones de sales saturadas nitrato de magnesio o sulfato de zinc (De-Deng y Cornú, 1992).

2.2.- Suspensiones celulares.

En las últimas décadas se ha desarrollado diferentes sistemas para los cultivos de protoplastos, células, tejidos y órganos vegetales; uno de ellos es el cultivo en suspensión (suspensiones celulares), el cual constituye una forma para mantener y propagar células vegetales.

Las suspensiones celulares consisten en células libres y agregados celulares distribuidos en un medio en movimiento. Estas suspensiones pueden ser permanentes, mediante el suministro continuo de nutrientes.

Disponible en: [http://es.wikipedia.org/wiki/Cultivo de tejidos](http://es.wikipedia.org/wiki/Cultivo_de_tejidos)».

Revisado el: (05-05-11).

Medios de cultivo.

Para el cultivo de suspensiones celulares de una gran variedad de plantas, el medio de cultivo más utilizado ha sido el desarrollado por (Murashige y Skoog, 1962) para el cultivo de tejidos de tabaco, así como también el medio B-5. También se han utilizado otros medios, pero su composición no difiere mucho de los citados. A menudo, los medios óptimos para la inducción y crecimiento de callos a partir de explantes primarios no son los mismos que para el establecimiento de suspensiones celulares; el nivel óptimo de auxinas y citocininas, puede ser diferente. En ocasiones las células en suspensión necesitan de suplementos orgánicos, aminoácidos, extracto de levadura y agua de coco; la auxina más utilizada es 2,4-D.

Iniciación de las suspensiones celulares.

Las suspensiones celulares se inician generalmente mediante la incubación de trozos de callos friables en medios líquidos que, están en movimiento continuo. Comúnmente se emplean Erlenmeyer, en los cuales se deposita el medio líquido con los trozos de callo dispersos en él, hasta llenar aproximadamente 1/5 de la capacidad de los frascos; estos se ponen luego a incubar en un agitador giratorio a 80-150 rpm, bajo luz continua y a 25 °C de temperatura. Mediante subcultivos semanales, las suspensiones celulares quedan establecidas después de varios días.

Durante los primeros subcultivos es recomendable usar una tasa de dilución baja (por ej. 1:1 a 1:4) utilizando cuatro partes de medio fresco por cada parte de suspensión celular. Posteriormente se puede utilizar una tasa de dilución más alta, según el objetivo para el cual se haya establecido la suspensión.

Disponible en: [http://es.wikipedia.org/wiki/Cultivo de tejidos](http://es.wikipedia.org/wiki/Cultivo_de_tejidos).

Revisado el: (05-05-11).

2.3.- Cultivo *in vitro* de cacao. Micropropagación.

Las primeras investigaciones del cultivo de tejidos en el cacao fueron hechos por Archibald (1954) citado por Pence (1989), cuando colocó fragmentos de tallo en el medio de Whitte desprovisto de todas los reguladores del crecimiento, y se obtuvieron callos que no regeneraron plantas.

Orchard y col. (1979) realizaron cultivos de ápices en el medio de Lismanier suplementado con diversos reguladores del crecimiento como kinetina, zeatina, ácido indolbutírico, AIA y ácido giberélico. Los ápices extirpados de plantas jóvenes de cacao del grupo amazónico se cultivaron en un medio sólido y en un medio líquido agitado; se obtuvo una turgencia de los meristemas cultivados, seguida en algunos casos de una elongación de las hojas.

La década de los 80 estuvo matizada por múltiples esfuerzos para la propagación *in vitro* por brotes axilares. Passey y Jones (1983) cultivaron ápices caulinares y nudos de 0.5-1 cm de longitud extraídos de brotes jóvenes en pleno crecimiento, y los colocaron en un medio MS suplementado con diversas combinaciones de citoquininas y de auxinas, obtuvieron algunos brotes con hojas de escaso desarrollo; a pesar de las frecuentes transferencias a un medio fresco, ninguno de estos brotes sobrevivió más de 12 meses. En un medio basal suplementado con giberelinas se logró la elongación de hojas y entrenudos, pero ni una continuo creciendo. Asimismo, se indujo el enraizamiento de explantes primarios y de brotes separados del explante de origen cultivándolos en un medio mineral de concentración débil, suplementado con IBA (2.5 μ M), ANA (2.5 μ M) y florigluciol (1 μ M). Sin embargo no pudo obtenerse un crecimiento regular de los brotes hasta un nivel satisfactorio de reproducción *in vitro* del cultivo.

Maxwell y Blake (1984) obtuvieron nudos de brotes jóvenes de plantas de cacao de 4 a 5 años de edad. Estos explantes se cultivaron en un medio basal

simple, suplementado con reguladores del crecimiento y produjeron una primera regeneración de brotes.

Janick y Whipkey (1985) lograron la inducción de brotes a partir del tejido nodal cotiledonal después de la decapitación del epicótilo o a través del suplemento del medio con BAP. Los brotes elongaban y desarrollaban hojas en presencia de los cotiledones, pero estos brotes fallaban al ser cultivados en condiciones normales de cultivo *in vitro*.

Los resultados obtenidos en el CIRAD por Dufour y Dublin (1985) brindaron nuevas orientaciones a las investigaciones sobre la multiplicación vegetativa *in vitro* del cacao. Los explantes primarios estaban formados por fragmentos de tallos ortotrópicos de 4 a 5 cm de longitud, que contaban con 1 ó 2 nudos. Estos explantes se extrajeron de plantas jóvenes de cacao de 8 ó 10 meses. Diferentes elementos fueron evaluados como el intercambio gaseoso, estructura del medio, carbón activado, macroelementos, citoquininas, auxinas y giberelinas, todo ello en la fase de multiplicación. En la fase de enraizamiento y transferencia al suelo, se ensayaron diferentes auxinas como IBA y AIA en medio MS diluidos a la mitad en medio sólido. Las mejores tasas de enraizamiento (50%) se obtuvieron con IBA 50 μ M. Los microesquejes enraizados que se obtuvieron se trasplantaron al sustrato del vivero y se colocaron en un recinto controlado con una humedad del 100%. Estos esquejes produjeron hojas rápidamente y se transformaron en plántulas de desarrollo normal.

MATERIALES

υ

MÉTODOS

III.- MATERIALES Y METODOS.

El presente trabajo se desarrolló en el Centro de Estudios de Biotecnología Vegetal (CEBVEG) perteneciente a la Facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad de Granma (Peralejo-Bayamo) en el periodo comprendido entre marzo y agosto del año 2011.

3.1.- Condiciones Generales De Trabajo.

El pesaje de los componentes de los medios de cultivo se realizó con una balanza analítica (modelo *Sartorius*) de 0,1 mg de precisión. El pH de los medios de cultivo se ajustó a 5,7 con hidróxido de sodio (NaOH) 1,0 mol.L⁻¹ y ácido clorhídrico (HCl) con la utilización de un pHmetro (modelo *Crison*).

Los medios de cultivo y el instrumental empleado fueron esterilizados en la autoclave vertical BK-75 a 121°C de temperatura y a 1,2 kg.cm⁻² de presión durante 20 minutos.

La manipulación del material vegetal en los experimentos se realizó en condiciones asépticas en la cabina de flujo laminar (modelo *Faster*). La desinfección de la cabina de flujo laminar se realizó con etanol al 70%. Durante la manipulación en condiciones asépticas, el instrumental se esterilizó en el *Steri* a 250°C de temperatura durante un minuto.

3.2.-EXPERIMENTO 1.- EFECTO DE ALTAS CONCENTRACIONES DE 2,4-D EN LA FORMACIÓN DE CALLOS EN CACAO (*THEOBROMA CACAO L.*)

Como material vegetal se utilizaron flores de cacao (*Theobroma cacao L.*) extraídas del tallo y ramas del clon (CCN-51) antes de la antesis, los cuales se recolectaron en horas de la mañana en el banco de germoplasma de Centro de Estudios de Biotecnología Vegetal, seleccionándose de acuerdo a su fitosanidad y perfecto estado nutricional (Figuras 1 y 2). Se trasladaron al laboratorio y se sumergieron en una disolución de agua con detergente durante 30 minutos en agitación constante, posteriormente se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril y se llevaron a condiciones asépticas (cabina de flujo laminar), en donde se le realizó una segunda desinfección añadiéndole una

disolución de hipoclorito de sodio (NaClO) al 1% durante 15 minutos; seguido por cuatro enjuagues con agua destilada estéril.



FIGURAS 1 y 2.- Árbol y flores de cacao (CCN-51).

Con la ayuda de un bisturí se separaron los pétalos y estaminoides de la flor, los cuales se cultivaron a razón de dos por frasco, (Figuras 3 y 4), sobre 10 ml del medio de cultivo basal, constituido por sales MS al 100%, vitaminas LB (10 mg.l⁻¹), sacarosa (30 g.l⁻¹), mioinositol (100 mg.l⁻¹), agua de coco (50 ml.l⁻¹), agar E (6 g.l⁻¹) y se evaluaron diferentes concentraciones de 2,4-D conformando los siguientes tratamientos:

Tratamiento 1.- Sin 2,4-D.

Tratamiento 2.- 2,0 mg.l⁻¹ de 2,4-D.

Tratamiento 3.- 5,0 mg.l⁻¹ de 2,4-D.

Tratamiento 4.- 10,0 mg.l⁻¹ de 2,4-D.

Tratamiento 5.- 20,0 mg.l⁻¹ de 2,4-D.



FIGURA 3.- Estaminoides



FIGURA 4.- Pétalos

Se incubaron en condiciones de oscuridad a una temperatura de 18°C y una humedad relativa entre 60 y 63%.

A los 7, 14, 21 y 28 días se evaluaron las variables siguientes:

- Inicio de la formación de los callos (días y zona del explante)
- Formación de callos (%)
- Explantes necrosados (%)
- Color de los callos.

3.3.-EXPERIMENTO 2.- ESTABLECIMIENTO DE SUSPENSIONES CELULARES EN EL CULTIVO DE CACAO (*THEOBROMA CACAO* L.).

Para el inicio de las suspensiones celulares se utilizaron callos de los clones (Hibrido EICB-234) y (CCN-51) obtenidos de estaminoides (Figuras 5 y 6), utilizando un medio de cultivo constituido por sales MS (1962) al 100 %, vitaminas LB (10,0 mg.l⁻¹), glicina (3,0 mg.l⁻¹), mioinositol (100,0 mg.l⁻¹), agua de coco (100 ml.l⁻¹), sacarosa (40,0 g.l⁻¹), 2,4-D (9,04 µM), kinetina (1,17 µM), glucosa (1,0 g.l⁻¹).

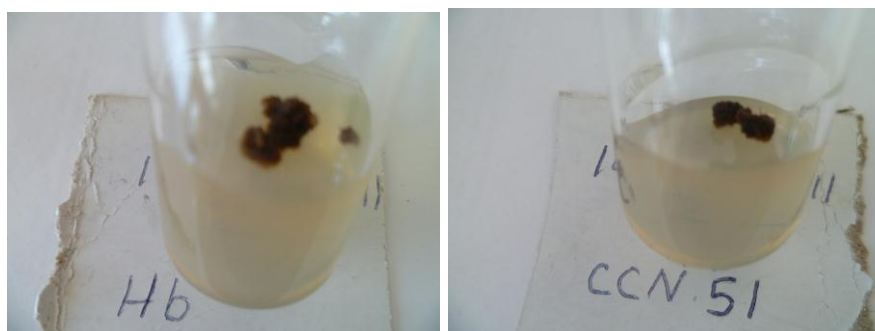


FIGURA 5.- Callos del Hibrido EICB-234. FIGURA 6.- Callos del CCN-51

Se tomaron porciones de alrededor de 1g de los callos, los cuales se añadieron a erlenmeyer de 50 ml que contenían 10 ml de medio de cultivo, conformando los tratamientos que a continuación se describen:

Tratamiento 1.- Medio de Inducción de Callos (MIC-E): Constituido por sales MS (1962) al 100 %, vitaminas LB (10,0 mg.l⁻¹), glicina (3,0 mg.l⁻¹), mioinositol

(100,0 mg.l⁻¹), agua de coco (100 ml.l⁻¹), sacarosa (40,0 g.l⁻¹), 2,4-D (9,04 µM), kinetina (1,17 µM). El pH se ajustó a 5,7 (Silva, 2006).

Tratamiento 2.- Medio de Maduración (MMAD): Contiene sales Ms al 100 %, vitaminas LB (10,0 mg.l⁻¹), mioinositol (100,0 mg.l⁻¹), glucosa (1,0 g.l⁻¹), sacarosa (60,0 g.l⁻¹). Se ajustó el pH a 5,7 (Silva, 2006).

Se colocaron en una zaranda orbital (Modelo *Gerhardt*) a 110 rpm durante siete días para lograr la disgregación de los callos. Se utilizaron 10 erlenmeyer por cada tratamiento.

Transcurrido siete días y en la cabina de flujo laminar (modelo *Faster*), el contenido de los erlenmeyer se filtró utilizando gasas estériles de 1500 µm (Gonzales y col, 2010). El filtrado obtenido se transfirió a 10 ml de medio de cultivo fresco (igual composición que el medio de cultivo del que proviene) y se colocaron nuevamente en zaranda orbital a 110 rpm, durante la evaluación no se realizó cambios del medio de cultivo.

A los 7, 14, 21 y 28 días se realizaron las siguientes evaluaciones:

- Disgregación de los callos (si o no). Se realizó por observación del porcentaje de disgregación de los callos a los siete días de agitación en zaranda orbital.
- Color del medio de cultivo. Se determinó visualmente el color de la suspensión transcurridos los primeros siete días de establecidos los callos.
- Masa fresca de la suspensión (g.ml⁻¹): Se extrajo con pipeta automática (modelo *biohit proline* 100-1000 µl), 1,0 ml de la suspensión y se colocó en un vial previamente pesado y luego se pesó utilizando una balanza analítica (Quiala y col, 2002). La masa fresca se determinó por la expresión:

Masa fresca: *masa del vial con 1ml de suspensión – masa del vial solo*

- Masa seca de la suspensión (g.ml⁻¹). Se extrajo con pipeta automática (modelo *biohit* 100-1000 µl) 1,0 ml de la suspensión y se filtró con papel

de filtro seco y previamente pesado. Posteriormente el papel de filtro se secó en horno microondas durante 5 minutos hasta peso constante, se enfrió en una desecadora y se pesó en una balanza analítica (Quiala y col, 2002). La masa seca se determinó por la expresión:

Masa seca: masa del papel de filtro con el filtrado seco – masa del papel de filtro seco.

- Se realizaron observaciones en el microscopio de las características de las células en la suspensión. Para ello se tomó una gota de suspensiones celulares de cada tratamiento, y se colocó sobre un porta objetos desinfectado, se tiñó con azul de safranina, se colocó un cubreobjetos y se realizaron las observaciones con un microscopio (*modelo Motic*) utilizando los lentes de aumento a 40 y 100 X.
- Color de la suspensión. Se determinó visualmente el color de la suspensión.
- Presencia de estructuras tipo areniscas.

Análisis Estadístico.

Para el análisis estadístico se empleó el programa Statistic versión 6.0 (1998) sobre Windows. Los datos expresados en por ciento, fueron analizados empleando la prueba de comparación de proporciones para $p \leq 0,05$. El resto de los datos se procesaron mediante análisis de varianza factorial, cuando existieron diferencias significativas, se aplicó la prueba de comparación múltiple de Tukey HSD, para $p \leq 0,05$.

RESULTADOS

∩

DISCUSION

IV.- RESULTADOS Y DISCUSION

4.1.-EXPERIMENTO 1.- EFECTO DE ALTAS CONCENTRACIONES DE 2,4-D EN LA FORMACIÓN DE CALLOS EN CACAO (*THEOBROMA CACAO L.*).

La desinfección es un paso importante en el establecimiento de los cultivos *in vitro* de plantas, particularmente cuando los explantes proceden de condiciones de campo. En la figura 7 se muestran los resultados de la desinfección, los porcentajes de pétalos y estaminoides asépticos del clon CCN-51 obtenidos pueden considerarse adecuados para el cultivo, con valores de 85 y 90 % respectivamente, sin diferencias significativas.

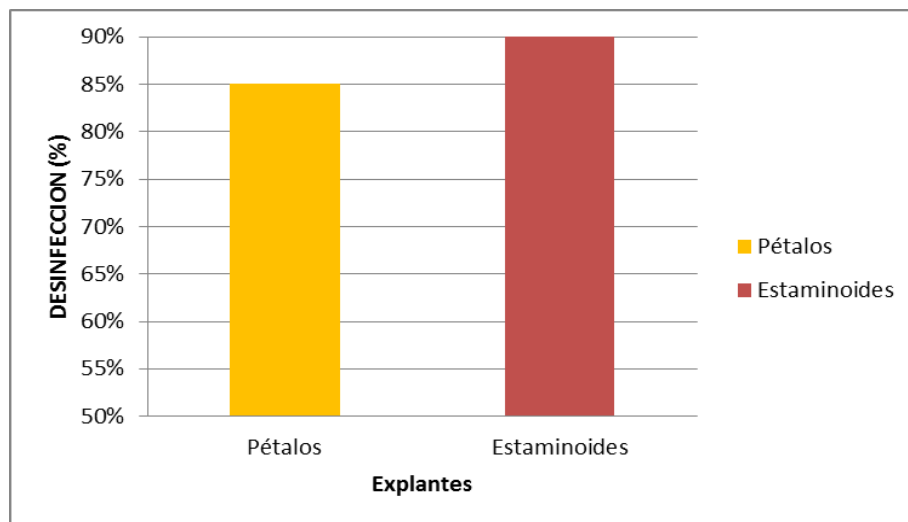


Figura 7.- Desinfección de explantes de pétalos y estaminoides.

Los resultados obtenidos confirman lo referido por Bhojwani y Razdan (1996) quienes señalaron que el hipoclorito de sodio es uno de los agentes desinfectantes más efectivos para la eliminación de los microorganismos en los tejidos vegetales.

Los porcentajes de desinfección que se obtuvieron fueron satisfactorios, si se tiene en consideración que se emplearon botones florales antes de la antesis tomados de las ramas y tallo de plantas que están en condiciones de campo, donde los tejidos vegetales presentan mayor contaminación por la existencia de microorganismos e insectos presentes en el ambiente y los trasladados por la actividad del hombre (Alvarado, 1998).

En estudios realizados por López Báez y col, (1993), emplearon concentraciones inferiores de hipoclorito de sodio (0.8%), para la desinfección de explantes foliares de cacao. Estos autores obtuvieron menores valores de contaminación microbiana que los alcanzados en la presente investigación, pero utilizando explantes florales procedentes de condiciones de invernadero.

La formación de callos, ha sido considerada como un mecanismo de defensa para evitar la penetración de agentes extraños, al producirse cortes en los tejidos de las plantas.

En el cacao los pétalos están constituidos por dos estructuras, el limbo (parte superior) y la coagulla (parte basal o inferior). A los siete días posteriores al establecimiento de los explantes, se observó en los explantes de pétalos, un cambio de color marrón claro a café. En los tratamientos donde se utilizó 5,0 mg.l⁻¹ y 10,0 mg.l⁻¹ de 2,4-D se hizo evidente una hinchazón de los bordes y la parte media del limbo, evidencias iniciales de la formación de callos (Figura 8 A y B). En los demás tratamientos no se notó alguna otra diferencia.

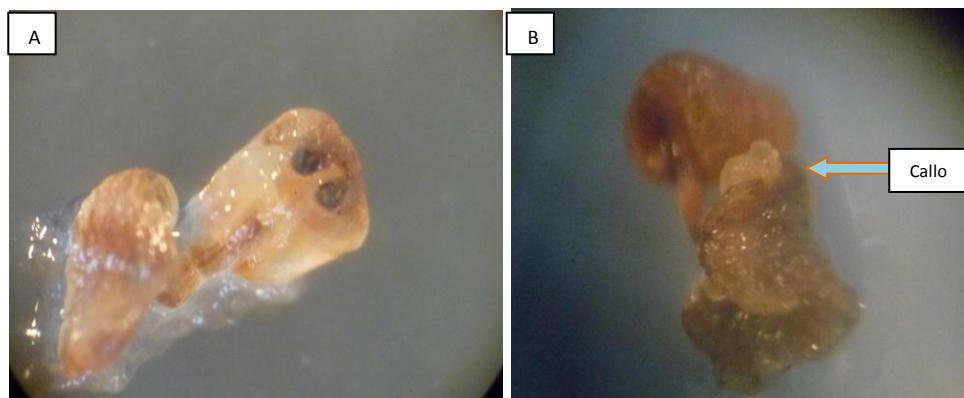


Figura 8.- Inicio de la formación de callos en pétalos del clon CCN-51 en medio de cultivo con 2,4-D. A color marrón claro. B color café.

A los 14 días se observó el inicio de la formación de callos en el resto de los tratamientos en los cuales se utilizó el 2,4-D. En todos los explantes se observó una coloración café claro, y se hizo evidente el engrosamiento de los bordes y la parte media del limbo, que comenzaban a manifestarse como pequeñas protuberancias de color blanco (Figura 9)

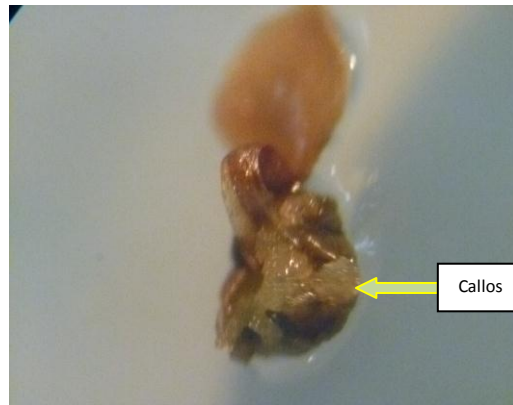


Figura 9.- Masa de callos en formación a los 14 días.

A los 20 días los callos manifestaban un color marrón, comenzando a formar una masa homogénea de color café claro. La formación de la masa callosa se inició por la parte superior (limbo) en la mayoría de los tratamientos evaluados, en algunos casos se presencié la formación de callos por la parte inferior (coagulla), en otras por las dos partes. Las nuevas estructuras callosas formadas manifestaban un color blanquecino (Figura 10).

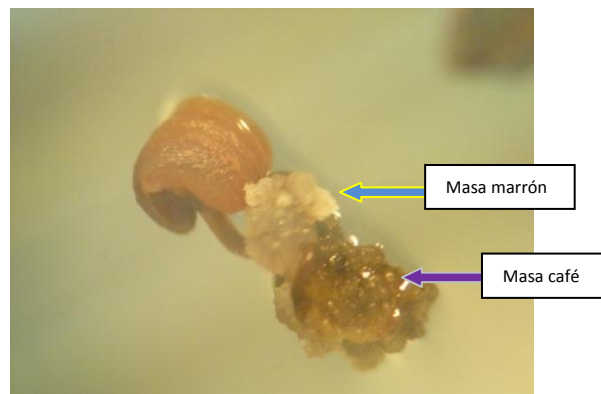


Figura 10.- Masa de callos de color marrón y café claro.

A los 30 días los callos se encontraban formando una masa amorfa, provocado por la acumulación de callos en un mismo sitio, el color que presentaban era marrón y en unos casos el color café claro. (Figura 11)

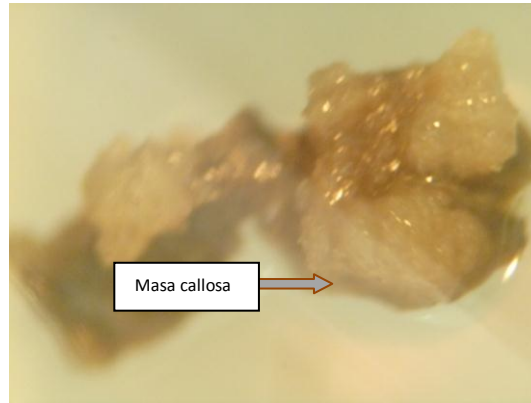


Figura 11.- A los 30 días la masa de callos en las dos partes del pétalo.

Como se puede observar en la figura 12, la formación de callos se produce en todos los tratamientos en los cuales se utilizó 2,4-D. Los mayores valores de formación de callos se obtuvieron en el tratamiento en el que se utiliza 5,0 mg.l⁻¹ de 2,4-D, en el cual a los 10 días ya se obtienen valores de 100 % de explantes con callos. El incremento de la concentración de 2,4-D por encima de 5,0 mg.l⁻¹ parece influir de manera negativa en la formación de callos, pues se observa una tendencia general a disminuir el número de explantes con callos en estos tratamientos.

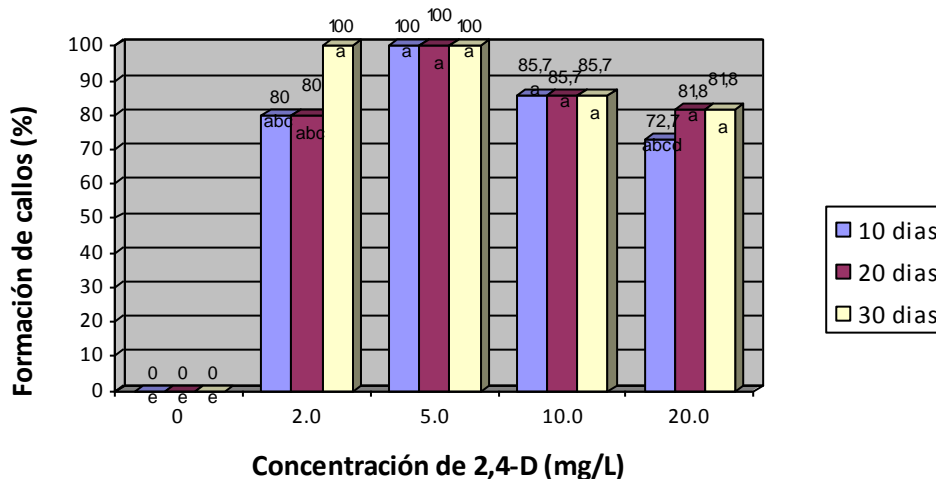


Figura 12. Formación de callos en explantes de pétalos en diferentes concentraciones de 2,4-D

De manera general, la formación de callos mostró valores elevados en todos los tratamientos en los cuales se utiliza el 2,4-D, con una tendencia a disminuir a medida que se aumenta esta concentración por encima de los 5,0 mg.l⁻¹.

Estos resultados corroboran la acción del 2,4-D en la desdiferenciación de los tejidos y la formación de callos.

Gómez (1998), manifestó que en los tejidos u órganos vegetales diferenciados y en presencia de una auxina y/o citoquinina en el medio de cultivo, se logra un proceso de desdiferenciación, mediante lo cual las células proliferan continuamente y de forma desorganizada en el explante apareciendo una masa amorfa significativa.

El abundante crecimiento de los callos puede deberse a que en condiciones de oscuridad no ocurre el efecto degradativo que provoca la luz sobre las auxinas, principalmente el 2,4-D y el AIA por un proceso oxidativo (Jiménez, 1998)

En la micropropagación por cultivos de tejidos, las auxinas ANA y 2,4-D se utilizan para inducir la formación de raíces en los callos no diferenciados, así como para estimular la división de células (Wikipedia, 2011).

La variable necrosis evaluada a pétalos y estaminoides del clon CCN-51 dio como resultado diferencias muy significativas de entre estos dos explantes, como muestra la figura 13. En los explantes de pétalos, no se observó la necrosis de los tejidos, en ninguna de las concentraciones de 2,4-D utilizadas, sin embargo en los estaminoides, los valores de explantes necrosados fue mayor, aunque no tuvo una relación directa con la concentración de 2,4-D empleada.

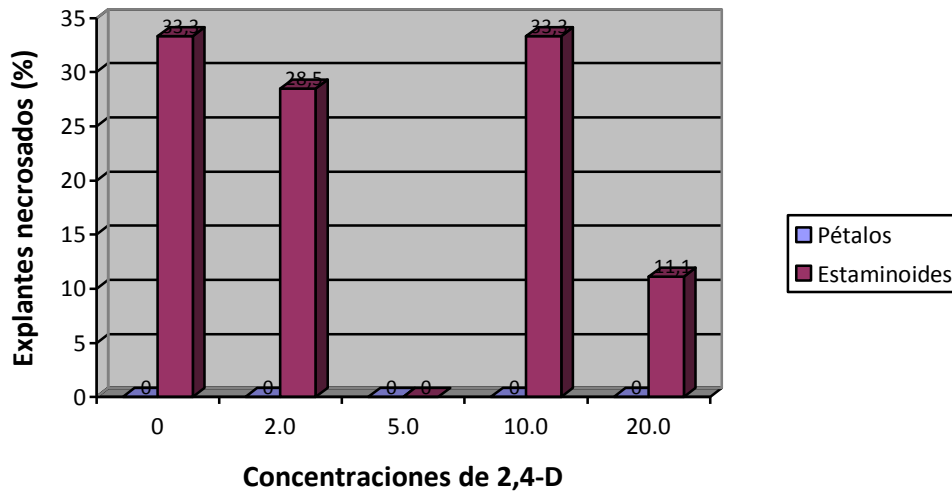


Figura 13.- Explantes necrosados

En el caso de los estaminoides, los callos iniciaron su formación principalmente en la base de los explantes, zona en que fueron separados del resto del botón floral. A los 7 días en los tratamientos con explantes de estaminoides, no se evidenció variación o diferencia alguna, con excepción del tratamiento en que se utilizan $10,0 \text{ mg.l}^{-1}$ en que se observó en la parte que se realizó el corte, el inicio de formación de una protuberancia de color violeta, y fue evidente la hinchazón de esa parte del estaminoide.

A los 14 días, los estaminoides mantenían su coloración inicial, pero se pudo apreciar en la zona del explante donde se realizó el corte, la formación de unas protuberancias de color violeta, en todos los tratamientos en que se empleó el 2,4-D. La formación de los callos se hizo evidente, por el engrosamiento de la parte más gruesa del estaminoide, en la cual, se observó la presencia de callos muy pequeños de color blanco (Figura. 14 A y B).

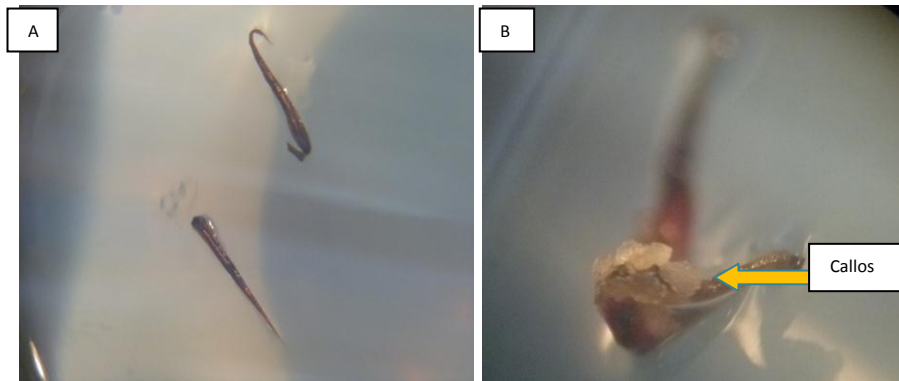


Figura 14.- Inicio de formación de callos en estaminoides de cacao en medio de cultivo con 2,4-D. A inicio a los 7 días y B a los 14 días.

Según Gómez (1998), el sitio o lugar para el comienzo de la proliferación de callos generalmente se situaron en la superficie del explante o en la parte extirpada del resto de la flor, lo cual se hace referencia en los dos explantes mencionados. A los 20 días los resultados de la observación mostraron que la formación de callos era evidente en la parte más gruesa es decir por donde se separó del botón floral los estaminoides, dando lugar a callos de color blanco en unos casos y otros de color marrón (Figura 15). Este proceso era visible en todos los tratamientos en que se empleó el 2,4-D.

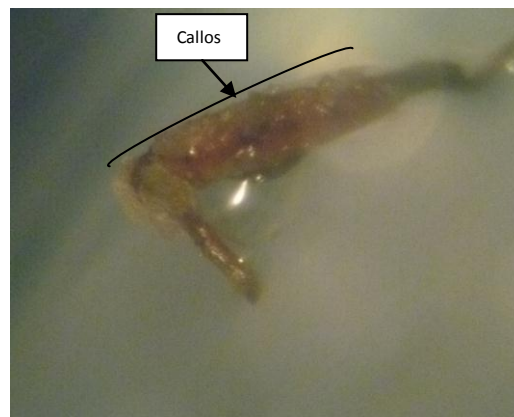


Figura 15.- Formación de callos en estaminoides a los 20 días.

A los 30 días ya formaban una masa marrón- amarilla por casi todo el explante y se notó la presencia de formaciones nuevas de callos de color blanco de forma globular y esponjosa (Figura 16). Los callos formados presentaron una consistencia friable, nodular, características que identifican los callos embriogénicos.



Figura 16.- Callos obtenidos a partir de estaminoides a los 30 días.

En la figura 17 se describe la formación de callos en los diferentes tratamientos utilizando estaminoides como explantes. Los resultados indican diferencias significativas entre los tratamientos. Los mejores resultados corresponden al tratamiento en el cual se emplea 10,0 mg.l⁻¹ con valores del 100 % de callos formados a los 20 y 30 días, seguido por los tratamientos 2 y 3 (2,0 y 5,0 mg.l⁻¹) con valores de 57,14 y 60,0 % respectivamente, sin deferencias entre ellos. Los resultados más bajos de formación de callos se obtuvieron al emplear 20,0 mg.l⁻¹ de 2,4-D, en el cual solo se alcanzó un 44,44 %. Cuando no se utilizó el 2,4-D no se produjo la formación de callos.

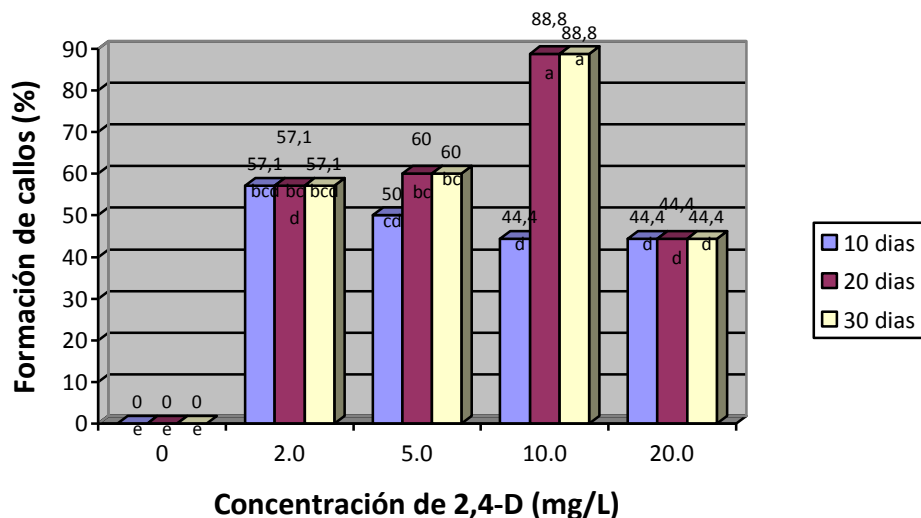


Figura 17.- Formación de callos con concentraciones de 2,4-D

Los resultados alcanzados en este experimento muestran de forma general, que es posible la formación de callos a partir de pétalos y estaminoides a un utilizando altas concentraciones de 2,4-D (10,0 y 20,0 mg.l⁻¹), aunque con una tendencia a disminuir los valores a medida que aumenta la concentración de la auxina. Los callos mostraron características que permiten clasificarlos como potencialmente embriogénicos. Se pudo apreciar además que los estaminoides son más sensibles a las altas concentraciones de 2,4-D resultando en un crecimiento más lento del callo.

Resultados similares a los obtenidos en esta investigación fueron alcanzados por Silva y Montes (2006), con el empleo de 34.05 µM de TDZ, con lo que lograron la mejor respuesta en la formación de callos (63.4 %) en el clon Pound 7. Estos mismos autores alcanzaron un 74 % de formación de callos con el empleo de 13.56 µM de 2,4-D y 1.17 µM de kinetina.

Los resultados obtenidos en esta investigación en la formación de callos utilizando 2,0 mg.l⁻¹ de 2,4-D son mayores (57,14 %), a los obtenidos por Bravo y Martínez (2010), quienes alcanzaron un 44,29 % de callos formados utilizando 2.0 mg.l⁻¹ de 2,4-D combinado con 0,05 mg.l⁻¹ de ácido salicílico.

De acuerdo a los resultados que se obtuvieron en esta investigación afirmo que el empleo de pétalos y estaminoides como explantes en el cultivo del cacao (*Theobroma cacao* L.) se obtuvo callos de forma eficiente, logrando altos valores por cada uno de los explante utilizados. Al analizar las características de los callos formados y el desarrollo a partir de ellos dieron como resultado un alto porcentaje de credibilidad

El empleo de la auxina 2,4-D en los medios de cultivo preparados para la formación de callos en explantes de (*Theobroma cacao* L.), dio los mejores resultados imprescindibles. El uso de las concentraciones de 2,4-D de 5 mg.l⁻¹ o superiores fue propicio para la formación de callos en todos los explantes evaluados en la presente investigación. Se observó en este experimento que a medida que aumento la concentración de 2,4-D se incrementó el tamaño de los callos formados.

4.2.-EXPERIMENTO 2.- ESTABLECIMIENTO DE SUSPENSIONES CELULARES EN EL CULTIVO DE CACAO (*THEOBROMA CACAO L.*)

Transcurridos los siete días que permanecieron los callos en agitación e incubación, se pudo apreciar que se habían disgregado en un porcentaje relativamente alto, por lo que cuando se observaba un medio la acumulación de cada disgregado se convertía en sedimento que se alojaba al fondo del erlenmeyer, presentándose esta disgregación en forma de pequeñas partículas de callos, provocando que el medio de cultivo presentara una coloración crema claro ya que esta fue la primera evaluación en donde se obtuvo los resultados de las dos variables (Figura 18 A, B y C)

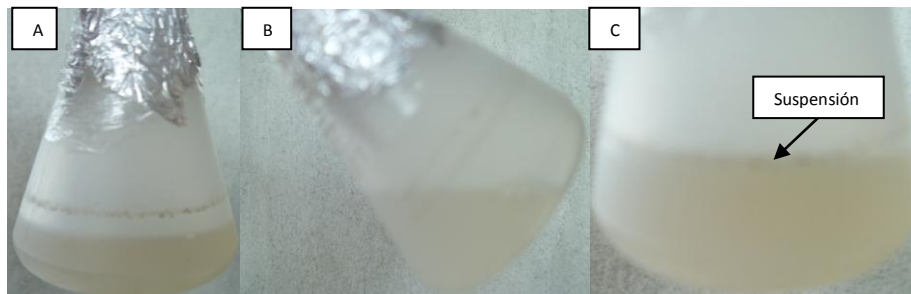


Figura. 18.- Suspensiones celulares de cacao establecidas a partir de callos. A vista la disgregación, B vista lateral, C color de la suspensión.

A partir de los 14 y 28 días de incubado los cultivos no se observó diferencia significativa entre estos, lo que se pudo apreciar en el momento de evaluación fue la presencia de un tipo de areniscas muy pequeñas, la coloración de la suspensión continuo de acuerdo al primer resultado obtenido en las variables disgregación de callos y color de la suspensión (Figura 19 A, B, C, D)

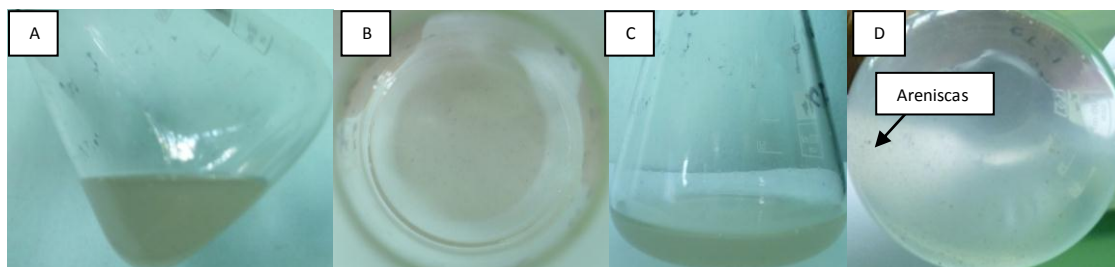


Figura 19.- A 14 y 28 días evaluados las variables en las suspensiones. A vista lateral. B vista de arriba. C vista de frente. D vista de abajo.

El análisis de varianza para la variable masa fresca, indicó que no existieron diferencias significativas entre los factores evaluados (medio de cultivo, clones y momento de evaluación), pero si existieron diferencias altamente significativas entre los factores independientes clones y medios de cultivo. El factor momento de evaluación no mostró diferencias significativas, por lo que procedió al análisis de estos factores de forma independiente. El análisis de varianza para la variable masa seca manifestó que no existieron diferencias significativas en la interacción de los factores evaluados, pero si en el factor medios de cultivo. Los factores clones y momento de evaluación no mostraron diferencias significativas.

En la figura 19 se muestran los resultados obtenidos al evaluar la masa fresca y masa seca en los medios de cultivo empleados. Los mejores resultados corresponden al tratamiento 2 (medio de maduración de embriones) con valores de 1,3000 y 0,02881 g.ml⁻¹ de masa fresca y masa seca respectivamente, significativamente superiores al tratamiento 1 (medio de inducción de callos).

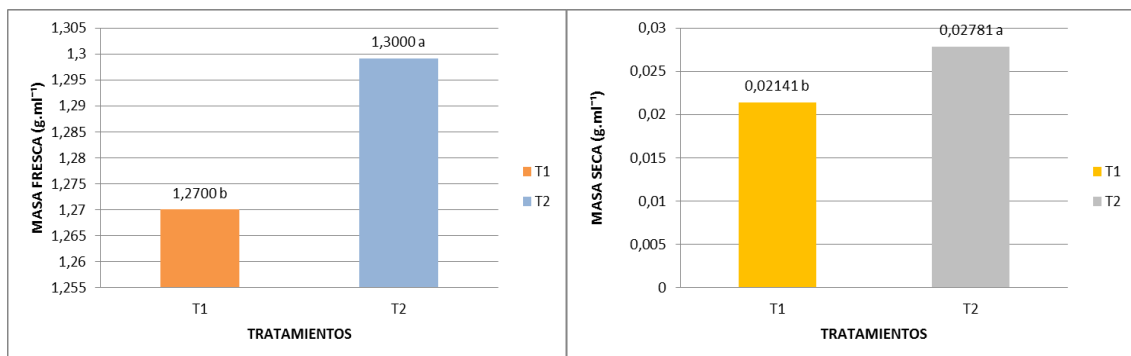


Figura 19.- Respuesta de la masa fresca y seca de las suspensiones en diferentes medios de cultivo.

Estos resultados indican que el medio de cultivo de maduración de embriones provoca un mayor crecimiento de las suspensiones celulares de cacao, y una mayor acumulación de materia seca, al compararlo con el medio de inducción de callos.

Al comparar el comportamiento de la masa fresca y la masa seca de la suspensión celular en los dos clones utilizados (Figura 20). En relación con la

masa fresca se pudo observar, que el clon Hb mostró resultados significativamente superiores en comparación con el clon CCN-51.

La masa seca, no tuvo diferencias significativas entre los clones, pero se observaron pequeñas diferencias entre los valores obtenidos, favoreciendo al clon CCN-51.

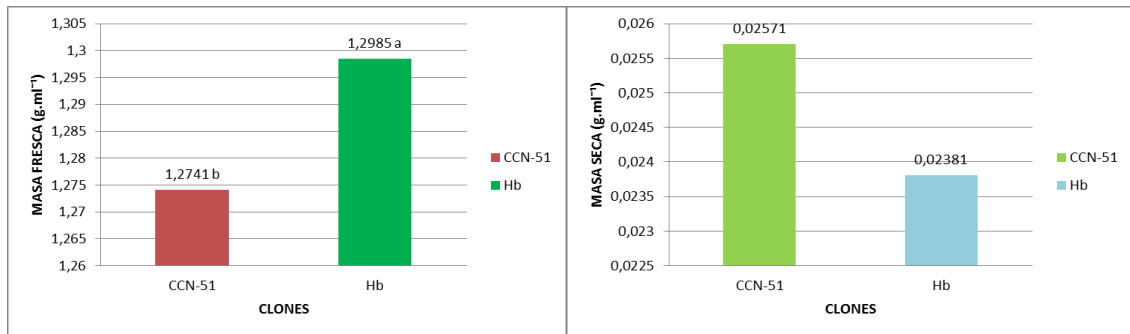


Figura 20.- Respuesta del peso fresco de las suspensiones en los clones utilizados.

Estos resultados evidencian, que el crecimiento de las suspensiones celulares, puede estar en dependencia del genotipo utilizado.

La evaluación sistemática de la masa fresca y seca de la suspensión (Figura 21), indica una tendencia general al aumento a medida que transcurren los días de cultivo, aunque sin diferencias significativas entre los momentos en que se produjo la evaluación.

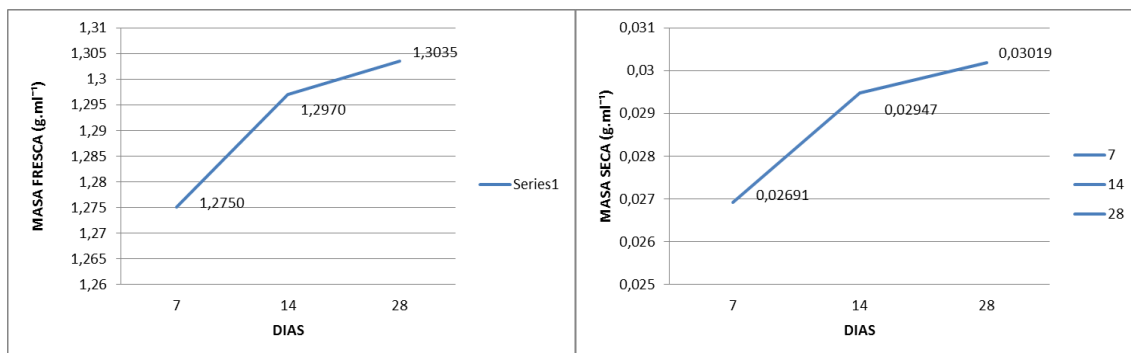


Figura 21.- Respuesta del masa fresca de las suspensiones al tiempo de incubación.

Estos resultados son indicativos de un crecimiento lento pero sistemático de las suspensiones celulares, es decir existe una acumulación de biomasa a medida que transcurren los días de incubación de la suspensión.

En resumen los resultados obtenidos al evaluar el establecimiento de suspensiones celulares en el cacao nos indican que existe un crecimiento continuo de la suspensión, evidenciado por el aumento de la masa fresca y seca, la cual no mostró diferencias significativas entre los momentos evaluados. El crecimiento de la suspensión celular está estrechamente relacionado con el medio de cultivo que se empleó para su establecimiento y el genotipo que se utilizó.

El lento crecimiento de las suspensiones celulares, obtenido en esta investigación pudiera atribuirse a que se empleó una baja densidad de inóculo, lo cual según De Feria y col. (2000), es un aspecto indispensable en la multiplicación de suspensiones celulares, planteando que la pobre multiplicación de los agregados celulares puede estar dado por la escasez de precursores metabólicos primarios de este proceso, que precisamente son incorporados al medio de cultivo por las propias células vegetales.

En estudios por De Feria y col, (2000), al establecer suspensiones celulares embriogénicas de (*Coffea arabica* cv). Catimor 9722, observaron un incremento de la masa fresca y seca de las suspensiones hasta los 21 días evaluados cuando utilizaron 10 y 25 gMF.l⁻¹ como densidad de inoculación, cuando emplearon densidades de inoculación mayores, apreciaron una disminución de estas variables a partir de los 15 días, lo cual es atribuido al agotamiento de los azúcares reductores en el medio de cultivo, lo cual provoca daños celulares y la disminución de la viabilidad de las células, fenómeno que no ocurrió cuando se utilizó menores densidades de inoculación.

En una investigación realizada por Cabrera y col, (2002), para la multiplicación e histodiferenciación de suspensiones celulares en plátano vianda "Navolean" (AAB), obtuvieron un alto porcentaje de embriones somáticos germinados, utilizando el medio de cultivo de maduración de embriones somáticos al utilizar una densidad de inoculación de 0,5 gMF.

Quiala y col, (2002), estudiaron el establecimiento y multiplicación de suspensiones celulares de la planta medicinal *Cymbopogon citratus* (D.C) Stapf, y lograron el establecimiento exitoso de las mismas a partir de callos, las suspensiones se caracterizaron por una coloración amarilla intensa de los agregados celulares, células redondeadas y pequeñas. Estos mismos autores obtuvieron un crecimiento exponencial de la biomasa al transcurrir los días de establecidas las suspensiones celulares.

Las observaciones sistemáticas utilizando un microscopio de las suspensiones celulares, mostraron la composición y características de las células. A los 14 días de establecida la suspensión celular, se observaron células individuales, de forma redondeada y en otros casos células de forma alargada (Figura 22).

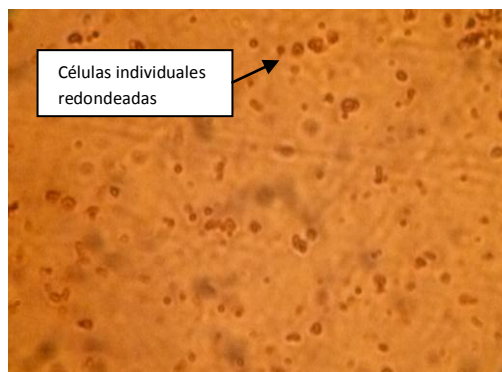


Figura 22.- Características de las suspensiones celulares de cacao a los 14 días.

Observaciones realizadas a los 28 días, permitieron observar células redondeadas, individuales, de núcleo denso, en una activa división celular y además, la formación de agregados celulares (Figura 23). Teniendo en cuenta las características observadas, podemos inferir que las células y agregados celulares obtenidos en la presente investigación son potencialmente embriogénicos.

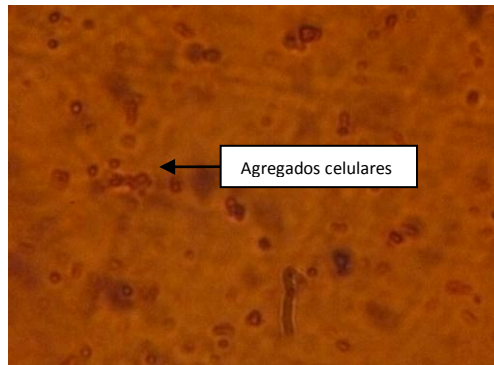


Figura 23.- Características de los agregados celulares embriogénicos observados en microscopio.

Chong y *col*, (2007) durante el establecimiento de suspensiones celulares embriogénicas de banano cv. "Grande naine" (Musa AAA), observaron a los 15 días de cultivo de las suspensiones, células embriogénicas pequeñas, esféricas, con un contenido citoplasmático denso, gránulos de almidón y algunos agregados embriogénicos. Después de ocho semanas de cultivo se obtuvieron suspensiones celulares embriogénicas compuestas por agregados celulares embriogénicos. También estudios realizados en banano, cultivar "Navolean" (AAB), para el establecimiento de suspensiones celulares realizados por Santos y *col*, (2002), observaron a los 20 días de establecida la suspensión un gran número de agregados celulares, formados por células esféricas, pequeñas, con contenido citoplasmático denso y en división activa, observaron además, la proliferación de agregados traslucidos compuestos por células meristemáticas.

Gonzales y *col*, (2010), al estudiar la influencia de la edad del callo en la inducción de suspensiones celulares del cafeto observaron a los 15 días las suspensiones de color crema claro, con aspecto de arenisca, resultados que coinciden con los alcanzados en la presente investigación. A los 60 días de cultivo, estos autores observaron un alto porcentaje de células meristemáticas, las cuales se caracterizaron por una forma casi esférica, núcleo grande, alto contenido citoplasmático y alta capacidad de división, lo que constituyó un importante indicador del potencial embriogénico de la suspensión.

CONCLUSIONES

V.- CONCLUSIONES

1.- Se logró la formación de callos de *Theobroma cacao* L, en medios de cultivo con altas concentraciones de 2,4-D, (5,0 10,0 y 20,0 mg.l⁻¹) empleando explantes de pétalos y estaminoides.

2.- Los explantes de pétalos mostraron mejores resultados (100, 85,7 y 81,8%) en la formación de callos en medios de cultivo con altas concentraciones de 2,4-D al compararse con los estaminoides (60, 88,8 y 44,4%).

3.- Se logró el establecimiento exitoso de suspensiones celulares embriogénicas a partir de callos obtenidos de estaminoides en los clones de cacao CCN-51 e Híbrido EICB-234.

RECOMENDACIONES

VI.-RECOMENDACIONES

- 1.- Evaluar las concentraciones de 2,4-D utilizadas en otros tipos de explantes del cultivo de cacao.
- 2.- Estudiar el efecto de las altas concentraciones de 2,4-D en etapas posteriores de la embriogénesis somática en el cacao.
- 3.- Evaluar el efecto de la densidad de inóculo en la multiplicación de las suspensiones celulares de cacao.

BIBLIOGRAFA

VII.- BIBLIOGRAFIA

1. Aguilar, M. E., Villalobos, V. y N. Vazquez, (1992). Production of cocoa plants (*Theobroma cacao* L.) via micrografting of somatic embryos. *In vitro Cell Dev. Biol.* January: 15-19.
2. Alemanno, L., Berthouly, M. y N. Michaux-Ferrière, (1997). A comparison between *Theobroma cacao* zygotic embryogenesis and somatic embryogenesis from floral explants. *In vitro Cellular and Developmental Biology – Plant* 33: 163–172.
3. Alvarado, Y. (1998). Contaminación microbiana en el cultivo *in vitro* de plantas. En: Propagación y mejora genética por Biotecnología. Editor: J. Pérez Ponce. IBP. Santa Clara. Cuba. pp 81-104.
4. Archibald, J. (1954). Culture *in vitro* of cambial tissue of cacao. *Nature* 173: 351-352.
5. Barbón, R. (2002). Efecto del dióxido de carbono sobre la embriogénesis somática de *Coffea arabica* L. CV. Caturra Rojo y Clematis tangulica K. Tesis en opción al Grado Científico de Doctor en Ciencias Agrícolas. Universidad Central de Las Villas. Resumen. 33p.
6. Bekele, F.L., Kennedy, Aj, McDavid, C., Lauckner Fb. Y E I. Bekele, (1994). Numerical taxonomic studies on cacao (*Theobroma cacao* L.) in Trinidad. *Euphita* 75:234-240.
7. Bhojwani, S.S y M.K Razdan, (1996). Plant tissue culture: Theory and practice. Elsevier. 766p.
8. Braudeau, J. (1970). El cacao, técnicas agrícolas y producciones tropicales (*Theobroma cacao*, L). Editorial Pueblo y Educación. La Habana. Cuba, p: 279.
9. Bravo y Martinez, (2010). Evaluar el efecto de la adición de ácido salicílico, a diferentes concentraciones en la formación de callos a partir de estaminoides de tres clones de cacao. Tesis de Diploma. Centro de Estudios de Biotecnología Vegetal. Universidad de Granma.

10. Bueno, M., Gómez, A., Boscaiu, M., Manzanera, J.A. Y O.Vicente L, (1997). Stress-induced formation of haploid plants through another culture in cork oak (*Quercus suber*). *Physiologia Plantarum* 99:335-341.
11. Cabrera M, J. López, R Gómez, N. Montano, M. Reyes, D. Reinaldo, J C. Ventura, V. Medero, Arletys Santos, M. García, Milagros Basail, E. Espinosa, (2002). Multiplicación, histodiferenciación y regeneración de suspensiones celulares embriogénicas en plátanos vianda “Navolean” (AAB). *Biotecnología vegetal* Vol. 2, No. 2: 115-117.
12. Capuana, M y P. Debergh, (1997). Improvement of the maturation and germination of horse chestnut somatic embryos. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*.48:23-29.
13. Castilla. J. (1981). *Fitotécnia del cacao*. Editorial Pueblo y Educación. La Habana. Cuba, p: 279.
14. Castillo R, Moliner V, Andres J, Oliva M, Safont V.S, Bohm S. (1998). Theoretical investigation of the abnormal. Reiner-Tieman reaction.
15. Castillo, R. (2000). La embriogénesis somática en la caña de azúcar (*Saccharum spp.* híbrido). Estudios básicos del proceso y su contribución a la semilla artificial. Tesis de Doctor en Ciencias. Ciego de Avila. 109p.
16. Cevallos, A.M. (2000). Establecimiento de una metodología eficiente en el proceso de embriogénesis somática del cafeto (*Coffea spp.*) mediante el uso de marcadores morfohistológicos y moleculares. Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas. INCA. p. 100.
17. Chong B, Kosky R, Reyes M, Bermúdez I-Carballoso, Gallardo J-Colina, Freire M-Seijo, Posada L-Pérez, Herrera I, (2007). Comparación entre dos métodos de establecimiento de suspensiones celulares embriogénicas de banano cv. ‘Grande naine’ (*Musa AAA*). *Biotechnology Vegetal* Vol. 7, No. 2: 95 – 101.

18. Couch, J. A., Zintel, H.A. Y P.J. Fritz, (1993). The genome of the tropical tree *Theobroma cacao* L. Mol Gen Genet 237: 123-129.
19. Crozier, A. (1981). Aspects of metabolism and physiology of gibberellins adu. Bot. Res. 9: 33-148.
20. Dangou R, (2002). Histological and biochemical characterization of *Theobroma cacao* L. Endosperm during seed development. Seed Science Research, 12(2): 91-100.
21. Daquinta, M. (1998). Propagación *in vitro* de la Piña (*Ananas comosus* (L.) Merr). Tesis de Doctor en Ciencias Agrícolas. Ciego de Avila. 99p.
22. De Feria M, Jiménez E, Barbón R, Capote A, Chávez M y Quiala E, (2000). Multiplicación de suspensiones celulares embriogénicas de *Coffea arabica* cv. Catimor 9722. Biotecnología Vegetal, 1: 13-20.
23. De Feria, M. (2001). Embriogénesis somática del cafeto *Coffea arabica* L. CV Catimor 9722) en medios líquidos. Escalado en bioreactores. Tesis en opción al Grado Científico de Doctor en Ciencias Agrícolas. Universidad Central de Las Villas. 103p.
24. De Klerk, G.L. (1999). Plant hormones in tissue culture.
25. De La Cruz, M., Mota, L., Y A. Gómez, (1996). Cacao. Su domesticación. Investigación y Ciencia. Junio: 38-39.
26. Deng, M.D. y D. Cornu, (1992). Maturation and germination of walnut somatic embryos. Plant Cell Tissue and Organ Culture 28:195–202.
27. Wikipedia (2011). Auxinas. Disponible en <http://es.wikipedia.org/wiki/Auxina>. Revisado el: (01-06-11).
28. Wikipedia (2011). Cacao. Disponible en <http://es.wikipedia.org/wiki/Cacao>. Revisado el (17-05-2011).
29. Wikipedia (2011). Cultivo de Tejidos. Disponible en <http://es.wikipedia.org/wiki/>
Revisado el (17-05-2011).

30. Wikipedia (2011). Ácidos. Disponible en: <http://es.wikipedia.org/wiki/>
Revisado el: (05-05-11).
31. CIAT (2011). Biotechnology. Disponible en: <http://webapp.ciat.cgiar.org/>
Revisado el: (05-05-11).
32. Info Agro (2011). Reguladores del Crecimiento. Disponible en:
http://www.infoagro.com/frutas/reguladores_crecimiento.htm
Revisado el: (10-05-11).
33. Dublin, P. (1984). Cacao. In: Handbook of Plant Cell Culture: 541-563
34. Duchefa Catalogue 98-99. Pp 19-25.
35. Dufour, M. y P. Dublin, (1985). Some data on the in vitro vegetative propagation of cultivated cocoa trees (*Theobroma cacao* L.). *Café, Cacao, The.* 29(4): 235-244.
36. Engels, J., Bartley, B. Y G. Enríquez, (1979). Descriptores de cacao, sus clases y modus operandi. CATIE. Costa Rica.
37. Enríquez, G.A. (1985). Manual del cacao para agricultores. Editorial UNED. San José, Costa Rica.
38. Esan, E.B. (1977). Tissue culture studies on cocoa (*Theobroma cacao* L.). A supplementation of current research. In: Proceeding V Int. Cocoa Res. Conf. Pp. 116-125. Cacao Res. Inst. of Nigeria. Ibadan.
39. Escalant, J.V. Teisson, C. Y F. Cote, (1994). Amplified somatic embryogenesis from male flowers of triploid banana and plantain cultivars (*Musa* spp.). *In Vitro cell Development Biol.* 30: 181-186.
40. Etienne, H, Solano W, Pereira A, Barry-Etienne D, Bertrand B, Anthony F, Côte F y Berthouly M, (1997). Utilización de la embriogénesis somática en medio líquido para la propagación masal de los híbridos F1 de *Coffea arabica*. XVIII Simposio Latinoamericano de Caficultura, pp. 253-261. San José, Costa Rica.

41. FAO, (2009). Bases estadísticas FAOSTATS. <http://www.fao.org> (10-05-2011).
42. Figueira, A. y J. Janick, (1995). Somatic embryogenesis in cocoa (*Theobroma cacao* L.). In Somatic embryogenesis in woody plant. Vol. 2. Edited by Jain, S. Gupta, P., Newton, R. The Netherlands. Kluwer Academy Publisher. 291-310.
43. Figueira, A., Lambert, S., Carpenter, D., Pires, J.L., Cascardo, J.C.M. Y L. Romanczyk, (1997). The similarity of cocoa flavour of fermented seeds from fingerprinted genotypes of *Theobroma cacao* L. From Brazil and Malaysia. *Tropical Agriculture* 74(2):132-139.
44. Figueira, A., Y J. Janick, (1994). Optimizing carbon and light levels during in vitro culture of *Theobroma cacao* L. *J. Amer. Soc. Hort.* 119 (4):865-871.
45. Frank y Schmülling, (1999). Cytokinin cycles cells. *Trends in Plant Sciences*, 4 (7): 243-244.
46. Gómez, R. (1998). Cultivo de células y tejidos. En: J. Pérez Ponce (Ed). *Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología*. Cap. 2. Vol. 1. IBP, Santa Clara. P. 25-44.
47. González M. E, Hernández M. M, Hernández A, (2000). Influencia De La Edad Del Callo En La Inducción De Suspensiones Celulares De Cafeto. *Agronomía mesoamericana* 21(2):299-306. 2010. ISSN: 1021-7444.
48. González M. E,-Vega, Hernández M. M-Espinosa, Hernández A,-Rodríguez, (2010). Influencia de la edad del callo en la inducción de suspensiones celulares de cafeto. *Agronomía mesoamericana* 21(2):299-306. ISSN: 1021-7444.
49. González, M.C; Morejón, R y Portilla M, (2007). Establecimiento de las concentraciones óptimas de hormonas para el cultivo *in vitro* de especies *Coffea arabica* L. XII Congreso Científico del INCA. Programas y Resúmenes.

50. Gostch, N. (1997). Cocoa biotechnology: status, constraints and future prospects. *Biotechnology Advances*. Vol.15.No. 2.333-352.
51. Gray, D.J. (1989). Effects of deshydration and exogenous growth regulators on dormancy, quiescence and germination of grape somatic embryo. *In Vitro Cell Dev. Biol.* 25:1173-1178.
52. Hancock, B.L y M.S Fowler, (1994). Cocoa bean production and transport. In S.T. Beckett (Ed.) *Industrial chocolate Manufacture and Use* (p 12).London: Chapman & Hall.
53. Hunter, J.R, (1990). The status of cacao in the western hemisphere. *Economy Botanic* 44(4):425-439
54. ICCO, (1995). Boletín trimestral de estadísticas del cacao de la Organización Internacional del Cacao.
55. INEC, (1996). Instituto Nacional de Estadística y Censo. Ecuador. Datos estadísticos de ese año, en la producción de cacao.
56. INIFAP, (2000). *Tecnologías llave en mano*. Tomo I. Sagar.146-149.
57. Irizarri, H. y E. Rivera, (1999). Early yield of five cocoa families at the three locations in Puerto Rico. *J. Agric. Univ. P.R.*82:167-176.
58. Janick, J y A. Whipkey, (1985). Axillary proliferation of shoots from cotyledonary nodal tissue of cacao. *Revista Theobroma* 15(2): 125-131.
59. Jay, V, Genestier S, Courduroux J. C, (1992). Effects of flooding on growth and metabolism of herbaceous plants. En: Kozlowski, T. T. (Ed). *Flooding and plant growth*. Academic Press, 47-128 New York.
60. Jiménez, E. (1998). Generalidades del cultivo in vitro. En: *Propagación y mejora genética por Biotecnología*. Editor: J. Pérez Ponce. IBP. Santa Clara. Cuba.pp 13-24.
61. Jiménez, E., De Feria, M., Barbón, R., Capote, A. Y Chavés, M. (1995). Empleo de biorreactores para la producción de embriones

- somáticos de café (*Coffea arabica* cv. catimor). *Advances in Modern Biotechnology* 3:11.2.
62. Kartha, K. (1981). Kartha, K. 1981. Meristem culture and cryopreservation. In: *Plant Tissue Culture, Methods and Applications in agriculture*. Ed. by T. A. Thorpe. Academic Press. 325 p.
 63. Kohlenbach, H. W (1985). Fundamental and applied aspects of in vitro plant regeneration by somatic embryogenesis. In: S.H. Fer-Menuhr A. (ed) *In vitro Techniques propagation and long term storage*. Martinus Nijhoff, Federal Republic of Germany: 101-109.
 64. Komatsuda, T., Lee, W. Y S. Oka, (1992). Maturation and germination of somatic embryo as affected by sucrose and plant growth regulators in soybeans *Glycine gracilis* Skvortz and *Glycine max* (L.) Merr. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 28:103-113.
 65. Krikorian, A. (1991). Propagación clonal in vitro. In CIAT. Roca, W; Mroginski; eds. *Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones*. Colombia. p 91-125.
 66. Label, P. y M.A Lelu, (1994). Influence of exogenous abscisic acid on germination and plantlet conversion frequencies of hybrid larch somatic embryos (*Larix x leptoeuropaea*). Relation with in planta abscisic acid and abscisic acid glucose ester levels. *Plant Growth Regulators* 15:175-182.
 67. Li, Z. Traore, A., Maximova, S. Y M. J. Guiltinan, (1998). Somatic embryogenesis and plant regeneration from floral explants of cacao (*Theobroma cacao*, L) using tidiazuron .*In vitro Cell. Dev.* 34:293-299. Oct-Dec.
 68. López, J., Montano, N., Swennen, R., Ventura, J., Schoofs, H., Medero, V., García, M., Del Sol, L. Y M. Cabrera, (2000). Establecimiento de suspensiones celulares en plátanos vianda del grupo (AAB). *Rev. Biotecnología Vegetal*. No. 1: 59-61.

69. López-Báez, O. (1994). Embriogenese somatique et regeneration de plantes de cacaoyer. (*Theobroma cacao*, L). a partir de pieces florales. Center de Biotechnologie Vegetale. Francereco. Francia: 1-128.
70. López-Báez, O., Esconda, G.M., Hernández, V.B., Fraire, V.G., Evans, H.M., Y A. Fontanel, (1997). Progresos recientes en la clonación del cacao. Actas del Primer Congreso Venezolano del cacao y su industria, 18-21 de noviembre. Maracay. Venezuela. 15-16.
71. López-Báez, O.,Bollon, H. Y A.B. Esques, (1993). Embryogénese somatique de cacaoyer *Theobroma cacao* L. à partir de pièces florales. Compte-Rendus de l'Académie des Sciences. Paris. 316. 579-584.
72. MAGAP, (2010). Ministerio de Agricultura Ganadería y Pesca. Ecuador.
73. Manual del Cultivo del cacao en el Ecuador. INIAP (2005). Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias.
74. Márquez, J.J. (2003). Cacao. Noticortas. Unidad de Impresiones Gráficas del MINREX 80p. Ciudad de La Habana. Cuba
75. Martínez, F., Menéndez, M., Rodríguez, D., López, C., Cabrera, M., Aguilar, P., Grave De Paralta, G. Y G.Suárez (2001). Edad óptima para llevar al campo las posturas híbridas de cacao. *Café y cacao*. Vol. 2, No. 2.
76. Matos, G., Lambertt, W., Nariño, A., Menéndez, M., Selva, F., Oliveros, A., Columbié, A. Y E. Sanchez, (2002). Principales enfermedades en el cultivo del cacao. *Café y cacao*. Vol. 3. No 1. Pp. 66-67.
77. Maximova, S.K., Alemanno, L., Young, A., Ferriere, N., Traore, A. Y M.J. Gultinan, (2002). Efficiency, genotypic variability and cellular origen of primary and secondary somatic embryogenesis of

- (*Theobroma cacao* L.) *in vitro* Cell Development Biol.Plant. 32:252-259.May-June.
78. Maxwell, P. y J.Blake, (1985). Micropropagation of cacao through Axillary bud Culture. Plant Tissue Culture and its Agricultural Applications sep: 17-21.
 79. Mckersie, B.D. Y D.C. Brown, (1996). Somatic embryogenesis and artificial seeds in forage legumes. Seed Science Research, 6:109-126.
 80. Menéndez, M., Lambertt, W., Y A. Columbié, (2002). Selección de clones de *Theobroma cacao* con alto potencial productivo y de calidad industrial. . Café y cacao. Vol. 3. No 1. 64-66.
 81. Merkle, S.A, Parrott, W.A Y B.S Flinn, (1995). Morphogenic aspects of somatic embryogenesis. In: Thorpe, TA, Editor, 1995. *In vitro* Embryogenesis in Plant, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. 155–203.
 82. Michaux-Ferriere, N., Dublin, P. Y J. Schwendiman, (1987). Histological study of somatic embryogenesis from foliar explants of *Coffea canephora*. Café, Cacao, Thé 31(2): 112-114.
 83. Minagri, (1987). Ministerio de la Agricultura Cuba. Instrucciones técnicas para el cultivo y cosecha del café y cacao. Centro de Información y Divulgación Agropecuario.122-123.
 84. Montes, S., Martínez, M., Rojas, R., Santana, N. Y M. Cuba, (1995). Obtención de embriones somáticos a partir de suspensiones celulares de *Coffea canephora* variedad Robusta. Cultivos Tropicales 16(3):77-81.
 85. Mroginski, L. y W. Roca, (1991). Establecimiento de cultivo de tejidos vegetales *in vitro*. En: Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Fundamentos y aplicaciones. CIAT, Colombia. Pp 19-40.
 86. Murashige, T. y F. Skoog, (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Plant 15: 473 – 497

87. Nosti, J. (1970). Cacao y Café. 2 ed. La Habana. Instituto de Libro, p: 13-50.
88. Orchard, J.E., Collin, H.A. Y K. Harwick, (1979). Culture of shoot apices of *Theobroma cacao*. *Physiol. Plant.* 47: 207-210.
89. Paneque, O. (2006). Establecimiento de una metodología de micropropagación mediante la embriogénesis somática en el cultivo del boniato (*Ipomea batatas* L) En: Tesis presentada en opción al grado de Doctor en Ciencias Agrícolas. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas-Universidad de Granma.
90. Parrot, W. (2002). La embriogénesis somática en las angiospermas. Conferencia. VI Simposio Internacional de Biotecnología Vegetal. Libro Resúmenes. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Santa Clara. 7-17.
91. Passey, A.J y O.P. Jones, (1983). Shoot proliferations and rooting *in vitro* of (*Theobroma cacao* L.) type Amelonado. *Journal of Horticultural Sciences.* 58(4): 589-592.
92. Pence, V.C. (1989). Cacao (*Theobroma cacao* L.). In: *Biotechnology in agriculture and forestry.* Vol. II. Editor Y. P. S. Bajaj. Berlín Heidelberg New York. Springer-Verlag: 203-225.
93. Pérez y Gómez, (1998). Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología volumen 1.
94. Petiard, V, Ducos JP, Florin B, Lecouteux C, Tessereau H y Zamarripa A, (1992). Mass somatic embryogenesis: a possible tool for large-scale propagation of selected plants. Fourth international workshop on seeds.
95. Preil, W, Florek P, Wix U y Beck A, (1988). Towards mass propagation by use of bioreactors. *Acta Hortscience* 226: 99-106.
96. Preil, W. (1991). Application of bioreactors in plant propagation. En: Debergh PC y Zimmerman RH (Eds) *Micropropagation*, pp. 425-445.

97. Presilla, M. E. (2001). The new taste of chocolate: A cultural and nature history of cocoa with recipes. Berkeley: Ten Speed Press.
98. Pype, J., Everaert, K. Y P. Debergh L, (1996). Contamination by micro-arthropods in plant tissue cultures. Plant Biotechnology Congres. Cork, Ireland.1-6.
99. Quiala E, Barbón R, Jiménez E, De Feria M, Capote A, Pérez N, Chávez M e Bidot I, (2002). Establecimiento y multiplicación de suspensiones celulares de *Cymbopogon citratus* (D.C) Stapf. Biotecnología vegetal Vol. 2, No. 3: 155-161.
100. Sági, L, Remy S y Swennen R, (1997). Genetic transformation for the improvement of bananas- a critical assessment. INIBAP Annual Report 1996: 33-36.
101. Santana, N. (1993). Embriogénesis somática en el cultivo del cafeto (*Coffea sp.*). Tesis de Grado (Dr. en Ciencias Agrícolas). INCA. La Habana. 155 p.
102. Santos A, López J, Cabrera M, Montano N, Reinaldo D, Ventura J.C, Medero V, García M, Basail M, Rayas A, (2002). Obtención de embriones somáticos y establecimiento de suspensiones celulares embriogénicas en el cultivar de plátano 'Navolean' (AAB). Biotecnología vegetal Vol. 2, No. 2: 107-109.
103. Schoofs, Hilde. (1997). The origin of embryogenic cells in (*Musa*). Ph.D.thesis, K.U.Leuven, Belgium. p.257.
104. Silva, J y Montes, S. 2006. Embriogénesis somática en el cultivo del cacao (*Theobroma cacao* L.). Tesis en opción al Grado Científico de Doctor en Ciencias Agrícolas. 98 pp.
105. Sondahl, M. R., Nakamura, T., Y W.R. Sharp, (1985). Propagations of coffee. In: Henke R.R., Hughes, K.W., Constantin, M.J. Hollander, A. (Eds). Tissue Culture in forestry and agriculture. New York.215-232.

106. Sondahl, M.R. (1990). Coffee and cocoa. In Agricultural Biotechnology. Opportunities for International Development. Edited by G. J. Persley. CAB international.262-272.
107. Stuart, DA, Strickland SG y Walker KA, (1987). Bioreactor production of alfalfa somatic embryos. HortScience 22: 800-803.
108. Thévenin J.M y O. Trocmé, (1996). La moniliose de cacaoyer. Plantations, recherches and developpement. Nov-Dic: 397-406.
109. Traore, A., Maximova, S. Y M. J. Guiltinan, (2003). Micropropagation of (*Theobroma cacao* L). Using somatic embryo derived plants. In Vitro Cell Dev. Biol-Plant. 7: 1-6.
110. Tulecke, W. (1987). Somatic embryogenesis in woody perennials. In: Cell and Tissue Culture in Forestry. Vol. 2. Edited by Bonga J.M. and Durzan, D.J. 61-91. Martinus Nijhoff publishers, Dordrecht.
111. Urquhart, D.H. (1963). El cacao. Edición Revolucionaria. La Habana. Cuba.230p.
112. Van Boxtel, J; Berthouly, M. (1996). High frequency somatic embryogenesis from coffee leaves factors influencing embryogenesis and subsequent proliferation and regeneration in liquid medium. Plant Cell Tissue and Organ Culture 44:7-17.
113. Vasil, I. K. (1994). Automation in plant propagation. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 39 (2): 105-108.
114. Yow, S.T y D.H.L Lim, (1994). Green-pactch budding on very young cocoa rootstocks and side grafting of mature trees. Cocoa Grower's Bulletin 47:27-41.
115. Zamarripa, A, Ducos JP, Tesserau H, Bollon H, Eskes AB y Petiard V, (1990). Developpement D'un procede de multiplication en masse du cafeier par embrygenese somatique en milieu liquide. ASIC. Conference. France.