

MINISTERIO DE EDUCACION SUPERIOR



UNIVERSIDAD DE GRANMA

Facultad de Ciencias Agrícolas

Centro de Estudios de Biotecnología Vegetal



UNIVERSIDAD DE COTOPAXI

**UNIDAD ACADDEMICA CIENCIAS AGROPECUARIAS, Y
RECURSOS NATURALES**

TRABAJO DE DIPLOMA

**EFFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE 2,4-D Y EL TIPO DE
EXPLANTE EN LA FORMACIÓN DE CALLOS EMBRIOGÉNICOS
EN EL CULTIVO *IN VITRO* DE CACAO (*THEOBROMA CACAO L.*)**

AUTOR: Byron Efraín Quimbita Guanoluisa

TUTOR: MSc. Ángel Espinosa Reyes

COTUTOR. DrC. Juan José Silva Pupo

2011

“Año 53 de la Revolución”



Pensamiento

“El camino siempre será difícil y requerirá del esfuerzo inteligente de todos.....prepararse siempre para lo peor de las variantes, ser tan prudente en el éxito como firmes en las adversidades. Es un principio que no puede olvidarse”



FIDEL CASTRO RUZ

DEDICATORIA

Este trabajo está dedicado de manera muy especial a mis queridos padres César Quimbita y María Guanoluisa, que con su amor, consejos y apoyo moral han logrado que cumpla una meta más plantada en mi vida.

A mis hermanos, que día a día me han demostrado su amor y cariño cualidades que me ha dado fuerzas para seguir en adelante.

A mis abuelitos Zoila Panchi, Juan José Guanoluisa y Agustín Quimbita, quien con su cariño me han demostrado lo valioso y lindo que es la vida.

A mis tíos Blanca Quimbita, Victoriano Molina y primos quienes me han dado su apoyo y nunca me han dejado solo y así poder cumplir mis objetivos.

Byron Efraín Quimbita Guanoluisa

AGRADECIMIENTOS

Primero quiero agradecer a Dios por darme la vida y guiarme por el camino del bien porque sin él no podría estar aquí.

A mi familia quienes con mucho amor me dieron la oportunidad de vivir esta experiencia.

A la Universidad Técnica de Cotopaxi por acogermé en su manto de enseñanza durante la culminación de mi carrera.

A los profesores de La Universidad de Granma, que me inculcaron el espíritu educativo e investigativo.

A mi tutor MSc. Ángel Espinosa Reyes por haber dedicado su mayor tiempo en implantarme sus conocimientos en la realización de este trabajo de diploma.

Cotutor. DrC. Juan José Silva Pupo por haberme facilitado todos los recursos y conocimientos para que este trabajo de diploma tenga éxito.

También expreso mis agradecimientos todos y cada uno de los compañeros del Laboratorio de Biotecnología de la Universidad de Granma.

GRACIAS A TODOS

Byron Efraín Quimbita Guanoluisa

RESUMEN

La presente investigación fue desarrollada en el Centro de Estudios de Biotecnología Vegetal de la Universidad de Granma (UDG), en el año 2011, con el objetivo de evaluar la formación de callos en diferentes tipos de explantes utilizando diferentes dosis de 2,4-D en el cultivo *in vitro* del cacao (*Theobroma cacao* L.). Se utilizaron limbos foliares como explantes cultivados sobre un medio de cultivo con diferentes concentraciones de 2,4-D (0,0; 1,0; 2,0; y 3,0 mg.l⁻¹). En un segundo experimento se utilizaron explantes de cotiledones, estaminoides y pétalos, utilizando un medio de cultivo con 2,0 mg.l⁻¹ de 2,4-D. en todos los tratamientos evaluados se logró la formación de callos a partir de los limbos foliares, obteniéndose los mejores resultados cuando se utilizó 2,0 mg.l⁻¹ de 2,4-D (100%). Se logró la formación de callos potencialmente embriogénicos en todos los tipos de explantes evaluados: pétalos (36%), estaminoides (32%) y cotiledones (50%). Los estudios histológicos mostraron que los callos estuvieron formados por células esféricas, de núcleo denso, características que distinguen los callos embriogénicos.

ABSTRACT

This research was developed at the Center for Plant Biotechnology, University of Granma (UDG), in 2011, aiming to assess callus formation in different types of explants using different doses of 2,4-D *in vitro* culture of cacao (*Theobroma cacao* L.). Leaf laminae were used as explants grown on a culture medium with different concentrations of 2,4-D (0.0, 1.0, 2.0, and 3.0 mg.l⁻¹). In a second experiment, explants of cotyledons were used, estaminoides and petals, using a culture medium with 2.0 mg.l⁻¹ 2,4-D. in all treatments evaluated was able callus formation from the leaf laminae, obtaining the best results when using 2.0 mg.l⁻¹ of 2.4-D (100%). Was achieved potentially embryogenic callus formation in all types of explants tested: petals (36%), estaminoides (32%) and cotyledons (50%). Histological studies showed that the callus cells were formed by spherical, dense core, features that distinguish embryogenic.

INDICE

PAG

I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	4
1.1. El cultivo del cacao.....	4
1.2. Morfología y taxonomía.....	4
2.2.1. Planta.....	5
2.2.2. Sistema radicular.....	5
2.2.3. Hojas.....	5
2.2.4. Flores.....	5
2.2.5. Fruto.....	5
2.3. Exigencias En Clima Y Suelo	6
2.3.1. Exigencias en clima.....	6
2.3.1.1. Temperatura.....	6
2.3.1.2. Agua.....	6
2.3.2. Exigencias en suelo.....	7
2.4. Propagación.....	7
2.4.1. Propagación Vegetativa o Asexual	7
2.4.1.1. Injerto por aproximación.	7
2.4.1.2. Injerto con yemas.....	7
2.4.1.3. Empleo de estacas.....	8
2.4.2. Propagación por Semilla o Sexual	8
2.5. El cultivo de tejidos en la micropropagación de especies vegetales.....	8
2.5.1. Micropropagación	9
2.5.2. Organogénesis	10
2.5.3. Embriogénesis somática	11
2.5.3.1. Callogenesis	11
2.5.3.2. Diferenciación de embriones somáticos.....	12
2.5.4. Factores que intervienen en la micropropagación.....	12
2.5.5. Medios de cultivo y hormonas de crecimiento	13
2.5.6. Etapas de la micropropagación de plantas.....	15
2.5.6.1. Fase O. (Preparativa).	16
2.5.6.2. Fase. I Establecimiento o Iniciación.....	16

INDICE	PAG
2.5.6.3. Fase II. Multiplicación <i>in vitro</i>	16
2.5.6.4. Fase III. Enraizamiento <i>in vitro</i>	17
2.5.6.5. Fase IV. Aclimatización.....	17
2.6. Cultivo <i>in vitro</i> de cacao.	18
II. MATERIALES Y MÉTODOS	20
3.1. Aspectos generales	20
3.1.1. Condiciones generales para el trabajo en el laboratorio	20
3.2. Experimento 1. Efecto de la concentración de 2,4-d en la formación de callos a partir de limbos foliares obtenidos <i>in vitro</i>	20
3.3. Experimento 2. Formación de callos en diferentes tipos de explantes de cacao.....	21
3.4. Variables evaluadas en los experimentos 1 Y 2.....	22
3.5. Análisis histológico de callos de los diferentes tratamientos.....	23
3.6. Análisis Estadístico	24
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	25
4.1. Experimento 1. Formación de callos en explantes de limbo foliar de cacao en el clon ccn-51.	25
4.1.1. Desinfección de los explantes.....	25
4.1.2. Inicio de la formación de callos.	26
4.1.3. Porcentaje de formación de callos en limbos foliares de cacao del clon CCN-51.....	28
4.2. Experimento 2. Formación de callos en diferentes tipos de explantes de cacao del clon ccn-51.	31
4.2.1. Desinfección de los explantes y material necesario para el cultivo <i>in vitro</i>	31
4.2.2. Inicio de la formación de los callos en los diferentes explantes de cacao del clon CCN-51.	33
4.2.3. Formación de callos en el clon CCN-51.	34
4.3. Experimento 3. Histología de callos embriogénicos de cacao del clon ccn-51.....	51

INDICE

PAG

V. CONCLUSIONES.....	40
VI. RECOMENDACIONES.....	41
VII.REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	42

I. INTRODUCCIÓN

El cacao (*Theobroma cacao* L.) es una planta originaria de las selvas amazónicas. Su cultivo es relativamente exigente en cuanto a altitud, latitud y humedad, viéndose favorecido con el clima cálido y húmedo, con temperaturas óptimas de crecimiento que oscilan entre los 18^o y 32^o C y una precipitación anual de 1500 a 2000 mm (Menéndez *et al.*, 2002).

El cacao se introdujo en África a principios del siglo XIX (Sasson, 1993), para el año 1900, también se cultivaba en Asia y Oceanía (Braudeau, 1970). África representaba un 54% de la producción mundial, América del Sur 36% y Asia y Oceanía un 10% (Walgate, 1990).

Varios estudios han mostrado que este mercado es una opción rentable e interesante para países que se dedican a la producción agrícola. La producción de cacao en América Latina sigue creciendo en un 2.5% anual, dentro de este porcentaje Ecuador tiene un crecimiento anual esperado de 0.8% en el mercado. Los mayores consumidores de cacao en el mundo son los países desarrollados donde se estima que el crecimiento en el consumo será de un 2.2 % anual (FAO, 2010).

Entre los principales países exportadores la mayor tasa de crecimiento desde el 2000 al 2010 es para el continente africano (2.8%) y países como Indonesia (4.3%) y Malasia (4.0%). Los mayores importadores de este cultivo son los países desarrollados de Norte América y Europa, quienes han tenido un incremento en la demanda de cacao desde el 2000 al 2010 en 0.3% y 3.5% respectivamente. Esto muestra entonces una tendencia al incremento de la demanda de cacao en el mundo y un mercado potencial para la producción de este cultivo por parte de los países productores (FAO, 2010).

En Cuba las principales áreas de cultivo de cacao están en las provincias de Guantánamo, Santiago de Cuba, Granma y Holguín, con un área total de 5089 hectáreas, con una producción de 1387 toneladas y un rendimiento de 2725 kg.ha⁻¹ (FAO, 2005). 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).

El chocolate, derivado del cacao, es considerado como uno de los alimentos más completos que existe (Bayer, 1984). 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, del 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 *et al.*, 2003).

Las dificultades en la propagación del cultivo han incrementado el interés por el empleo de los métodos biotecnológicos en el cacao. Pence (1989) señaló que dentro de las principales aplicaciones del cultivo de tejidos en el cacao se encuentran la obtención de metabolitos secundarios y la propagación *in vitro*. Sondalh (1994) expresó que los esfuerzos debían dirigirse al desarrollo de métodos de propagación vía embriogénesis a partir de tejidos somáticos la producción *in vitro* de metabolitos del cacao, el cultivo de anteras, el aislamiento y la fusión de protoplastos y la transformación genética.

La embriogénesis somática como herramienta de la Biotecnología Vegetal tiene la particularidad de poder ser utilizada con fines de propagación de plantas, como método auxiliar para el mejoramiento y en la conservación de los recursos fitogenéticos, además de ser posible el uso de callos para la obtención de metabolitos secundarios (Esan, 1977).

Cambios sustanciales se obtuvieron en la respuesta embriogénica cuando se comenzaron a emplear tejidos de origen somático como nucelas (Chatelet *et al.*, 1992, Sondahl y *et al.*, 1993,), pétalos (Sondahl *et al.*, 1994) y estaminoides (López-Báez *et al.*, 1993; Alemanno *et al.*, 1997). A pesar de los avances alcanzados en el mundo, existen dificultades con el desarrollo del proceso de la embriogénesis somática de cacao, ya que la respuesta está determinada fundamentalmente por los genotipos usados (Alemanno *et al.*, 1997).

PROBLEMA

Bajos niveles de formación de callos embriogénicos en el cultivo de cacao utilizando explantes foliares, pétalos y cotiledones.

HIPÓTESIS

Es posible lograr la formación de callos embriogénicos en diferentes tipos de explantes en el cultivo del cacao, con la aplicación de diferentes concentraciones de 2,4-D.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de la concentración de 2,4-D y el tipo de explante en la formación de callos embriogénicos en el cultivo *in vitro* de cacao (*Theobroma cacao* L).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar el efecto de las concentraciones de 2,4-D en la formación de callos embriogénicos a partir de limbos foliares en el cultivo *in vitro* de cacao (*Theobroma cacao* L).
- Evaluar la respuesta de explantes de pétalos, estaminodes y cotiledones en la formación de callos en el cultivo *in vitro* de cacao (*Theobroma cacao* L).

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. EL CULTIVO DEL CACAO

El cultivo de cacao (*Theobroma cacao* L.) ha estado presente a lo largo de la historia de América Latina; aun antes de la llegada de los conquistadores. El cacao tuvo una importancia enorme para las comunidades indígenas (Beer, 1999).

El árbol del cacao es nativo del nuevo mundo y desde México hasta Perú se encuentran plantas silvestres formando el estrato inferior de los bosques bajos, donde predominan condiciones favorables de temperatura, sombra y humedad (Urquhart, 1963).

La hipótesis más aceptada sobre la domesticación del cacao sugiere que la misma comenzó en Mesoamérica y propone que su distribución va desde el Amazonas hasta el sudeste de México. Esta opinión se justifica a partir de los datos históricos e iconográficos del cultivo del cacao durante tiempos prehispánicos en Mesoamérica, empleado por la cultura maya en el desarrollo de sus actividades políticas, económicas y sociales (De la Cruz *et al.*, 1996).

En Ecuador el cultivo, producción, comercialización, industrialización y exportación del cacao sobre todo del cacao fino y de aroma constituyen un sector relevante de la economía, en el mercado mundial ocupamos el sexto puesto (Romero, 1997).

2.2. MORFOLOGÍA Y TAXONOMÍA

Desde el punto de vista botánico el cacao se clasifica de la siguiente manera (Castilla, 1981).

División: **Espermatofita**
Clase: **Angiosperma**
Subclase: **Dicotiledónea**
Orden: **Malvales**
Suborden: **Malvíneas**

Familia: **Sterculiaceae**
Tribu: **Bitneraceae**
Género: **Theobroma**
Especie: ***Theobroma cacao* L.**

2.2.1. Planta

Árbol de tamaño mediano (5-8 m) aunque puede alcanzar alturas de hasta 20 m cuando crece libremente bajo sombra intensa. Su corona es densa, redondeada y con un diámetro de 7 a 9 m. Tronco recto que se puede desarrollar en formas muy variadas, según las condiciones ambientales

2.2.2. Sistema radicular

Raíz principal pivotante y tiene muchas secundarias, la mayoría de las cuales se encuentran en los primeros 30 cm de suelo (Castilla, 1981).

2.2.3. Hojas

Simples, enteras y de color verde bastante variable (color café claro, morado o rojizo, verde pálido) y de pecíolo corto (Urquhart, 1963).

2.2.4. Flores

Son pequeñas y se producen al igual que los frutos, en racimos pequeños sobre el tejido maduro mayor de un año del tronco y de las ramas, alrededor en los sitios donde antes hubo hojas. Las flores son pequeñas, se abren durante las tardes y pueden ser fecundadas durante todo el día siguiente (Dublin, 1984).

2.2.5. Fruto

De tamaño, color y formas variables, pero generalmente tienen forma de baya, de 30 cm de largo y 10 cm de diámetro, siendo lisos o acostillados, de forma elíptica y de color rojo, amarillo, morado o café. La pared del fruto es gruesa, dura o suave y de consistencia como de cuero. Los frutos se dividen interiormente en cinco celdas. La pulpa es blanca, rosada o café, de sabor ácido a dulce y aromática. El contenido de semillas por baya es de 20 a 40 y son

planas o redondeadas, de color blanco, café o morado, de sabor dulce o amargo (Dublin, 1984).

2.3. EXIGENCIAS EN CLIMA Y SUELO

2.3.1. Exigencias en clima

Los factores climáticos críticos para el desarrollo del cacao son la temperatura y la lluvia. A estos se le unen el viento y la luz o radiación solar. El cacao es una planta que se desarrolla bajo sombra. La humedad relativa también es importante ya que puede contribuir a la propagación de algunas enfermedades del fruto. Estas exigencias climáticas han hecho que el cultivo de cacao se concentre en las tierras bajas tropicales (Iniap/pnrt-cacao, 2008).

2.3.1.1. Temperatura.

El cacao no soporta temperaturas bajas, siendo su límite medio anual de temperatura los 21 °C ya que es difícil cultivar cacao satisfactoriamente con una temperatura más baja. Las temperaturas extremas muy altas pueden provocar alteraciones fisiológicas en el árbol por lo que es un cultivo que debe estar bajo sombra para que los rayos solares no incidan directamente y se incremente la temperatura (Herrera, M.; Carpio, H.; Chávez, G. 1999).

2.3.1.2. Agua

El cacao es una planta sensible a la escasez de agua pero también al encharcamiento por lo que se precisarán de suelos provistos de un buen drenaje. Un anegamiento o estancamiento puede provocar la asfixia de las raíces y su muerte en muy poco tiempo.

Las necesidades de agua oscilan entre 1500 y 2500 mm en las zonas bajas más cálidas y entre 1200 y 1500 mm en las zonas más frescas o los valles altos (Ekanayake, 1993).

2.3.2. Exigencias en suelo

El cacao requiere suelos muy ricos en materia orgánica, profundos, franco arcillosos, con buen drenaje y topografía regular. El factor limitante del suelo en el desarrollo del cacao es la delgada capa húmica. Esta capa se degrada muy

rápidamente cuando la superficie del suelo queda expuesta al sol, al viento y a la lluvia directa. Por ello es común el empleo de plantas leguminosas auxiliares que proporcionen la sombra necesaria y sean una fuente constante de sustancias nitrogenadas para el cultivo (Alvarado, S. 2008.)

Las plantaciones están localizadas en suelos que varían desde arcillas pesadas muy erosionadas hasta arenas volcánicas recién formadas y limos, con pH que oscilan entre 4,0 y 7,0. Se puede decir que el cacao es una planta que prospera en una amplia diversidad de tipos de suelo (Alvarado, S. 2008).

2.4. PROPAGACIÓN

2.4.1. Propagación Vegetativa o Asexual

El injerto del cacao debe realizarse en patrones vigorosos y sanos obtenidos de semilla, desarrollados en recipientes o en el campo. Los árboles más viejos se pueden injertar, siempre que los injertos se hagan en varetas jóvenes ya presentes o en brotes que se producen después de que las plantas han sido podadas hasta una altura de 30 a 50 cm (Winarsih y Priyono, 1995).

2.4.1.1. Injerto por aproximación.

Es demasiado laborioso y costoso en la práctica comercial. También se emplea el injerto de astilla o enchapado y el Forkert modificado (Columbié *et al.* 2002).

2.4.1.2. Injerto con yemas.

Es una de las técnicas más empleadas. Las yemas se deben tomar de aquellos brotes que se encuentren en árboles sanos y vigorosos. Las varetas de yemas deben ser aproximadamente de la misma edad que los patrones, pero las yemas deben ser firmes, rechonchas y listas para entrar en desarrollo activo. El injerto en yema no debe hacerse en época de lluvias ya que se puede favorecer el desarrollo de enfermedades fúngicas (Winarsih y Priyono, 1995).

2.4.1.3. Empleo de estacas.

En la multiplicación de árboles por estacas o injerto de yemas se obtiene una mayor uniformidad de la plantación, árboles más fuertes y que se pueden podar para darles una mejor estructura, debido a que las ramas tienen más espacio

en el cual desarrollar. Los inconvenientes de este tipo de propagación son los elevados costos de obtención y de cuidado de los árboles (Yow y Lim, 1994; López-Baéz *et al.*, 1997; INIFAP, 2000).

2.4.2. Propagación por Semilla o Sexual

Es la forma más antigua y común para el establecimiento de plantaciones de cacao pero se obtiene una gran variabilidad de árboles, por lo que no se recomienda su utilización salvo cuando se empleen semillas de elevada calidad. En los últimos años se han recomendado las siembras con semilla certificada, debido al buen comportamiento de los árboles provenientes de semilla de polinización controlada, usando clones seleccionados. Estos híbridos han mostrado una gran precocidad en la fructificación y un desarrollo vigoroso de las plantas. La semilla híbrida se produce polinizando en forma controlada manipulando las flores de los clones seleccionados durante la fecundación (Vasconcellos y Neto, 1999).

2.5. EL CULTIVO DE TEJIDOS EN LA MICROPROPAGACIÓN DE ESPECIES VEGETALES

Hoy en día, es muy importante la aplicación de las técnicas de cultivo *in vitro* para la propagación de especies vegetales en la cual se agrupan diversos aspectos relacionados con el cultivo; cuya aplicación a logrado elevar el rendimiento y disminuir considerablemente las pérdidas (Pérez y Gómez, 1998).

La Biotecnología ofrece grandes posibilidades en la multiplicación de especies vegetales y los nuevos productos biotecnológicos deben ofrecer apoyo a los programas de propagación acelerada para los posibles efectos en el medio ambiente y su utilización a propiciado avances más rápidos en la obtención y multiplicación de genotipos. (Omokawa y Anonuma, 2002). Con el surgimiento de las técnicas de cultivo *in vitro*, se abre una amplia perspectiva para su empleo en la micropropagación de especies vegetales de interés (Arencibia y Cornide, 1999).

En los últimos años, la aplicación de las técnicas en el cultivo de tejidos vegetales han sobrepasado la fase de investigación y esto ha traído como consecuencia el establecimiento de laboratorios que propagan masivamente muchas especies en gran escala (Jiménez, 1998).

El cultivo de tejidos puede definirse como un conjunto de técnicas que permiten el cultivo en condiciones asépticas de órganos, tejidos, células y protoplastos empleando medios nutritivos artificiales (Pérez y Gómez, 1998).

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, base teórica sobre la que se sustenta el cultivo de tejidos (Pérez y Gómez, 1998).

Las herramientas necesarias hicieron posible el arranque de estas técnicas. El desarrollo de los medios de cultivo y el conocimiento de los reguladores del crecimiento, no estuvieron disponibles hasta finales de los años cincuenta. A partir de este momento sucedieron una serie de acontecimientos, como la regeneración de plantas a partir de callos mediante la formación de embriones somáticos *in vitro* (Reinert *et al.*, 1971).

2.5.1. Micropropagación

La multiplicación vegetativa *in vitro* es comúnmente denominada micropropagación, abarca diferentes técnicas de multiplicación, proliferación de brotes axilares, formación de nuevas yemas axilares (organogénesis) y embriogénesis somática en la producción de plantas a partir de yemas axilares. Se ha demostrado que constituye el método más confiable de la propagación *in vitro* porque asegura la estabilidad genética. Por estas razones constituye la vía de multiplicación más utilizada (Gamboa y Núñez, 2001).

En algunas especies, esta metodología ha demostrado importantes ventajas en comparación con los sistemas convencionales de propagación, los más importantes según, Maceo (2007).

- Incremento acelerado del número de plantas divididas por genotipo;
- Reducción del tiempo de multiplicación;
- Posibilidades de grandes cantidades de una especie reducida, a bajo costo y en tiempo económicamente costeable;
- Mayor control de la sanidad del material que se propaga;
- Facilidad para transportar el material *in vitro* de un país a otro, con menos restricciones aduaneras;
- Posibilidad de multiplicar rápidamente variedades de la cual no existen pocos individuos.

2.5.2. Organogénesis

La organogénesis se refiere al proceso donde las células pueden ser inducidas para formar plantas completas. Caracterizada por la formación de un primordio unipolar a partir de una yema con el subsiguiente desarrollo de éste en un brote vegetativo, existiendo siempre una conexión entre los nuevos brotes y el tejido paterno. Los brotes pueden formarse directamente del explante (organogénesis directa) o indirectamente a partir de callos (Jiménez, 1998).

Desde el punto de vista morfológico la característica más importante del callo es la totipotencia de sus células, ya que el manejo de las condiciones nutricionales, hormonales y ambientales, posibilitan el desarrollo de brotes, raíces y embriones somáticos, en dependencia del balance auxina-citoquinina en el medio de cultivo (Yoon y Choi, 2002).

Tanto en la embriogénesis somática como en la organogénesis para formar una planta ya sea vía directa o indirecta, se requiere de una secuencia de medios de cultivo, ya que aquellos que inhiben la formación de raíces favorecen el desarrollo vegetativo y viceversa (Pérez y Gómez, 1998).

2.5.3. Embriogénesis somática

La formación de callos está dada por el crecimiento desorganizado de células obtenidas a partir de un tejido y la inducción de este comienza con el aislamiento de órganos o tejidos diferenciados, los cuales posteriormente

sufren desdiferenciación ante la presencia de una auxina exógena en el medio de cultivo (Gómez, 1998).

Como embriones somáticos se han definido a los originados a partir de células, sin la necesidad de la fusión de gametos (Gómez, 1998). Son estructuras bipolares con un eje apical y radical bien definido, no poseen conexión vascular con el tejido que le dio origen y pasan por los estadios de desarrollo: globular, corazón, torpedo y cotiledonal, con la capacidad de crecer y formar plantas (Jong *et al.*, 1993).

Virtualmente todos los tejidos tienen la capacidad para formar callos *in vitro*; sin embargo, relativamente pocos explantes tienen la habilidad para producir callos potencialmente embriogénicos. La respuesta embriogénica de callo depende de varios factores, entre los cuales tenemos: el genotipo, el explante, el medio de cultivo, los reguladores de crecimiento, las condiciones de incubación, entre otros. La embriogénesis somática sigue varios pasos después de tener el material vegetal. Esas etapas son la callogénesis, diferenciación de embriones, multiplicación de células y embriones, maduración y conversión en plántulas de los embriones somáticos (Gómez, 1998).

2.5.3.1. Callogenesis

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 desdiferencian 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).

Uno de los factores de mayor incidencia en esta fase de la embriogénesis somática es el tipo de explante y su estado fisiológico. Casi todas las partes de la planta pueden ser utilizadas para inducir la embriogénesis somática, entre ellas las hojas, flores, segmentos de tallo, embriones cigóticos inmaduros y cotiledones (Santana, 1993).

2.5.3.2. 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).

2.5.4. Factores que intervienen en la micropropagación

El estado fisiológico de las plantas donadoras y la época del año son aspectos de gran influencia en la morfogénesis. Como regla general se puede decir que cuanto más joven e indiferenciado se encuentre el explante a cultivar, mejor será su respuesta *in vitro*. La época del año es un factor que suele tener mucha importancia en la micropropagación y que generalmente está asociado al grado de dormancia que presentan ciertos explantes (yemas) (Echenique *et al.*, 2004).

La atmósfera gaseosa es un factor determinante en los procesos morfogénicos y está condicionada por el tipo y tamaño de los frascos seleccionados así como por el sistema de cobertura de los mismos (Radice, 2004).

El ambiente in vitro se caracteriza por alta humedad relativa, temperatura constante, bajo nivel de densidad de flujo de fotones fotosintéticos, fluctuación en la concentración de CO₂, alta concentración de azúcar, sales y reguladores del crecimiento en el medio de cultivo, acumulación de sustancias tóxicas y ausencia de microorganismos. Esto causa bajos niveles de transpiración, absorción de nutrientes, CO₂ así como un alto nivel de respiración en la oscuridad, lo que resulta en un pobre crecimiento celular (Barbón, 2003).

El genotipo es un factor determinante en todos los procesos morfogénicos desde la capacidad del explante para su establecimiento en condiciones *in vitro* como para la proliferación de callos o la diferenciación y crecimiento de nuevos órganos (Radice, 2004).

La capacidad de regeneración de un explante depende en gran medida del genotipo, incluso dentro de la misma especie, lo que refleja diferencias en el poder de activación de las rutas embriogénicas (Parrot, 1993).

Es conocido que la luz y la temperatura han sido consideradas como los factores físicos más importantes en la micropropagación. La luz es uno de los factores que determina el desarrollo de los organismos autótrofos, en ello radica la importancia de controlar la luz en los cultivos *in vitro* (Pelacho *et al.*, 2002).

El fotoperiodo puede afectar los niveles internos de los reguladores del crecimiento donde cambios en la intensidad luminosa pueden causar organogénesis y cambios morfológicos específicos debido a la longitud de onda de la iluminación (Pérez, 2006).

2.5.5. Medios de cultivo y hormonas de crecimiento

Para el cultivo de meristemas 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* (Kantha, 1981).

Los reguladores del crecimiento y el desarrollo de la planta actualmente se agrupan en cinco categorías: auxinas, giberelinas, citoquininas, ácido abscísico y etileno. Estas son sustancias endógenas insustituibles para la planta, pues en su interrelación deciden el crecimiento y las bases para su desarrollo. Se encuentran íntimamente relacionadas con las zonas de crecimiento en las plantas y son las encargadas de desencadenar todos los procesos que ocurren en los tejidos (Takahashi *et al.*, 1995).

Dentro de los reguladores de crecimiento vegetal, se encuentran las fitohormonas formadas por un grupo de sustancias de elevada actividad biológica, que generalmente se desplaza de su lugar de síntesis con cierta dirección y velocidad hasta el lugar de acción, causando un efecto de

crecimiento específico o de diferenciación (González, 2003). Entre las cuales tenemos:

Auxinas: De las auxinas naturales el AIA es el compuesto más utilizado en los medios de cultivo pero es sensible a la degradación enzimática (AIA-oxidasa) y a la fotooxidación. También se utiliza un número de sustancias que provocan un efecto fisiológico similar y que se producen sintéticamente; son las llamadas "auxinas sintéticas" (2,4D, ANA y AIB) (González *et al.*, 2007). En algunas investigaciones donde se han estudiado varias auxinas se ha observado que el AIA y el ANA promueven la formación de estructuras embriogénicas, mientras que el 2,4-D estimula la formación de callos de menor tamaño, poco compactados y con menor capacidad de regeneración (Trejo *et al.*, 2002).

Citoquininas: Se encuentran muy difundidas en el reino vegetal y en los microorganismos. Su principal lugar de síntesis lo constituyen las hojas adultas. Promueven la división celular a bajas concentraciones y generalmente inhiben el crecimiento de las raíces y la elongación del tallo, pero estimulan el alargamiento de las hojas, actúan en el retraso de la senescencia y tiene un papel fundamental en la embriogénesis (Martin *et al.*, 1993).

Giberelinas: Son activas en el crecimiento y en la división celular, la giberelina más difundida es el AG₃ o ácido giberélico. Estas hormonas endógenas se emplean poco en cultivo *in vitro* ya que hay numerosas experiencias que indican un efecto inhibitorio sobre la organogénesis y, particularmente la rizogénesis (Crozier, 1981).

Ácido Abscísico y etileno: El ácido abscísico favorece la maduración de los embriones somáticos, facilita la formación de bulbos y tubérculos y promueve el desarrollo de la dormancia. El etileno es la única hormona gaseosa conocida la cual estimula la senescencia de las hojas y la maduración de los frutos (González *et al.*, 2007).

2.5.6. Etapas de la micropropagación de plantas

Debido a la formación acumulada, la mayoría de los micropropagadores de plantas en el mundo están de acuerdo en que realmente se pueden diferenciar 5 fases críticas para lograr una exitosa multiplicación de plantas (Murashige y Skoog, 1978).

- **Fase O (Preparativa):** Esta etapa inicial comprende la selección de la planta madre y la selección de una serie de pretratamientos en condiciones higiénicas controladas, cuyo objetivo es mejorar la eficiencia en el desarrollo posterior de los cultivos *in vitro*.
- **Fase I Establecimiento o Iniciación de los cultivos:** El objetivo de esta fase es establecer el cultivo actual o primordio con los cuales iniciar el proceso de propagación.
- **Fase II Multiplicación:** Se considera la etapa más importante del proceso, donde se debe garantizar la propagación de los brotes y la estabilidad genética de las plantas producidas.
- **Fase III Enraizamiento:** Corresponde al enraizamiento o etapa de pretransplante, tiene como objetivo producir una planta autótrofa que puede sobrevivir en condiciones de transplante al suelo.
- **Fase VI Aclimatización:** Es la fase final del proceso por tanto su meta es lograr que la planta esté lista para su transplante definitivo a campos comerciales de producción o invernadero.

2.5.6.1. Fase O. (Preparativa).

Existe un consenso de que es importante e indispensable para el desarrollo de un esquema de micropropagación eficiente y repetible. La misma tiene una marcada influencia sobre la calidad posterior de las plantas resultantes del proceso, desde el punto de vista sanitario, fisiológico y genético (Zayas, 2005).

2.5.6.2. Fase. I Establecimiento o Iniciación

El cultivo de tejidos *in vitro* consiste en cultivar un pequeño segmento de plantas (explantes) sobre un medio sintético en condiciones controladas, con el propósito de regenerar las plantas enteras (Roca y Mroginski, 1993).

El objetivo de esta etapa debe ser lograr un cultivo axénico y viable, fisiológicamente vigoroso con el cual iniciar el proceso de multiplicación. Una vez seleccionado el explante se requiere desinfectarlo suficientemente, por la razón de que en el medio de cultivo pueden crecer bacterias y hongos que competirán ventajosamente con el explante (Pérez y Gómez, 1998).

El cultivo *in vitro* puede iniciarse prácticamente a partir de cualquier parte de la planta, sin embargo, la fuente inicial del material vegetal puede determinarse para el éxito de las plantas en el establecimiento del cultivo. Generalmente se aconseja utilizar plantas sanas y vigorosas de aquellas partes que se encuentran en división activa, como las regiones meristemáticas de las plantas, por lo que es recomendable utilizar las plantas más jóvenes como fuentes de explantes (Rossel, 1990).

Los desinfectantes más utilizados son el hipoclorito de sodio (NaClO), hipoclorito de calcio (CaClO₂), peróxido de hidrógeno (H₂O₂), etanol y dicloruro de mercurio (HgCl₂). Además se pueden añadir algunas gotas de Tween-20 (Zayas, 2005).

2.5.6.3. Fase II. Multiplicación *in vitro*

Es la fase más importante y determinante en todo el programa de propagación *in vitro*, es aquella que realiza la verdadera multiplicación con la micropropagación de una especie o variedad definiéndose no solo el número de plantas y propágulos a obtener, sin embargo su calidad genética por esta fase en la que reproducen variantes somaclonales (Maceo, 2007).

El objetivo de esta fase es la producción del mayor número posible de propágulos, plantas, microtubérculos o microbulbillos a partir de explantes ya establecidos *in vitro* sin sacrificar los objetivos de la fase siguiente (Pérez y Gómez, 1998).

2.5.6.4. Fase III. Enraizamiento *in vitro*

Se caracteriza por ser la fase más voluminosa de todo el proceso. En ella cada brote o yema de forma individual que se ha formado durante la fase de multiplicación debe desarrollar raíces que le permitan comenzar la absorción de nutrientes al transplantarse sobre un sustrato envejecido y convertirse en una planta aclimatada lista para ser llevada al campo (Orellana, 1998).

Para lograr la mayor eficiencia biológica en esta fase deben manejarse varios factores entre ellos: medios de cultivos simples y de ser posible en estado líquido, uso de componentes del medio de cultivo con sustancias químicas de calidad, técnica, luz natural como fuente de iluminación, frascos de cultivo con dimensiones adecuadas para cada especie, disminuir el riesgo de contaminación (Pérez y Gómez, 1998).

2.5.6.5. Fase IV. Aclimatización

Durante el cultivo *in vitro* las plantas crecen en condiciones de baja intensidad luminosa, alta humedad relativa, temperatura constante, escaso intercambio gaseoso y medios de cultivos ricos en compuestos orgánicos, especialmente sacarosa. Estas condiciones provocan cambios en la morfología y fisiología de las plantas que las hacen diferir de las que crecen en invernaderos o en el campo (Barranco, 2001).

Estos cambios provocan que una gran parte de las plantas micropropagadas no sobrevivan al transplante a condiciones ambientales, lo que hace necesario aplicar técnicas de aclimatización *in vitro* y *ex vitro* que garanticen un retorno gradual de éstas a sus características morfológicas normales (Agramonte *et al.*, 1998).

Para evitar el exceso de transpiración de las plantas hasta que éstas logren un adecuado desarrollo de los estomas y la cutícula es necesario mantener una alta humedad relativa mediante el riego o colocando cobertores de polietileno sobre las plantas y retirándolos unos días después (Agramonte *et al.*, 1998).

2.6. CULTIVO *IN VITRO* DE CACAO.

Los primeros intentos del cultivo de tejidos en el cacao fueron hechos por Archibald (1954), cuando colocó fragmentos de tallo en el medio de White desprovisto de todas las sustancias de crecimiento, y se obtuvieron callos que no regeneraron plantas.

Orchard *et al.* (1979), realizaron cultivos de ápices en el medio de Lismanier suplementado con diversas sustancias de crecimiento como kinetina, zeatina, ácido indolbutírico, AIA y ácido giberélico. Los ápices extraídos de plantas jóvenes de cacao del grupo amazónico se cultivaron en un medio sólido y en un medio líquido agitado; se obtuvo una tumefacción 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 ni otros continuaron 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 μM), ANA 2.5 μM y florogluciol (1 mM). 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 amelonado 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*.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. ASPECTOS GENERALES

La investigación fue realizada en el Centro de Estudio de Biotecnología Vegetal (CEBVEG) de la Facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad de Granma (UDG) – Bayamo. Cuba, periodo marzo del 2011 a julio del 2011.

3.1.1. Condiciones generales para el trabajo en el laboratorio

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 N y ácido clorhídrico (HCl) con la utilización de un pH-metro (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 2 y 3 se realizó en condiciones asépticas en la cabina de flujo laminar (modelo *Faster*), empleando para su desinfección 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 LA CONCENTRACIÓN DE 2,4-D EN LA FORMACIÓN DE CALLOS A PARTIR DE LIMBOS FOLIARES OBTENIDOS *IN VITRO*.

El material vegetal fueron limbos foliares de plantas *in vitro* obtenidas por cultivo de cotiledones en un medio líquido constituido por las sales DKW al 50%, con glucosa 10 g.l⁻¹, sacarosa 5 g.l⁻¹, vitaminas DKW y pH 5,7; suplementado con 2.33 µM de kinetina en medio líquido con soportes de papel de filtro, del clon de cacao CCN-51 (Figura 1), producidas en el Centro de Estudios de Biotecnología Vegetal de la Universidad de Granma.



Figura 1. Plantas *in vitro* de cacao utilizadas en el experimento 1.

Los limbos foliares fueron seccionados con bisturí, seleccionándose una porción de aproximadamente $0,5 \text{ cm}^2$ de la parte central de la hoja. El medio cultivo basal empleado fue el constituido por las sales de Murashigue y Skoog (1962) al 100%, vitaminas López- Báez (LB) 10 mg.l^{-1} , mioinositol 100 mg.l^{-1} , agua de coco 50 ml.l^{-1} , sacarosa 30 g.l^{-1} . El pH fue ajustado a 5.7 y se solidificó con agar 6 g.l^{-1} .

Las concentraciones de 2,4-D evaluados fueron las siguientes:

Tratamiento 1. (T1) 0 mg.l^{-1} (control)

Tratamiento 2. (T2) $1,0 \text{ mg.l}^{-1}$

Tratamiento 3. (T3) $2,0 \text{ mg.l}^{-1}$

Tratamiento 4. (T4) $3,0 \text{ mg.l}^{-1}$

Los explantes fueron sembrados con el haz hacia el medio de cultivo. Se utilizaron 25 frascos por tratamiento. La incubación se realizó en oscuridad, temperatura de $20\text{-}25^{\circ} \text{ C}$ y humedad relativa de 60-70%.

3.3. EXPERIMENTO 2. FORMACIÓN DE CALLOS EN DIFERENTES TIPOS DE EXPLANTES DE CACAO.

El material vegetal consistió en frutos y flores del clon de cacao CCN-51 recolectados en horas tempranas de la mañana en el banco de germoplasma del CEBVEG, de la Universidad de Granma (Figura 2). Se escogieron frutos maduros en perfecto estado de sanidad y sin daños físicos. Los botones florales se tomaron antes de la antesis.



Figura 2. Flores y frutos de cacao del clon CCN-51

Para la desinfección del material vegetal en el laboratorio, se lavó durante 30 minutos en una disolución de agua con detergente y posteriormente se enjuagó varias veces con agua destilada. Posteriormente los cotiledones extraídos del fruto y las flores se sumergieron en una disolución de hipoclorito al 1% durante 20 minutos, posteriormente se enjuagaron 4 veces con agua.

La extracción de los explantes se realizó con la ayuda de un bisturí y pinzas quirúrgicas. Se colocaron a razón de 2 explantes por frascos sobre 10 ml de medio de cultivo constituido por las sales MS (1962) al 50% de su concentración, vitaminas LB 10 mg.l^{-1} , mioinositol 100 mg.l^{-1} , agua de coco 100 ml.l^{-1} , sacarosa 40 g.l^{-1} , ácido giberélico $0,057 \mu\text{M}$, glicina 1 mg.l^{-1} , el pH se ajustó a 5,7 y se solidificó con agar 6 g.l^{-1} . Se incubaron en condiciones de oscuridad a una temperatura de $20\text{-}25^{\circ} \text{C}$ y humedad relativa de 60-70%.

3.4. VARIABLES EVALUADAS EN LOS EXPERIMENTOS 1 Y 2.

- **Inicio de la formación de los callos: días y zona del explante**
- **Desinfección (%)**

A los 5 días posteriores a la siembra se evaluó el porcentaje de explantes libres de contaminantes visibles. Este determinó por la siguiente fórmula:

$$PELC = \frac{NELC}{NTE} \times 100\%$$

NELC = Número de explantes libres de contaminación

NTE = Número total de explantes

- **Formación de callos (%).** Se realizó por conteo del número de explantes con callos a los 15 y 21 y 30 días posteriores a la siembra.

Para la evaluación de formación de callos, se empleo la escala propuesta por Santana (1982), la cual plantea:

Grado 0: No formación del callo.

Grado 1: Ligera formación del callo (débil proliferación en las zonas del borde del explante).

Grado 2: Formación del callo (proliferación celular por los bordes del explante, sin formar una masa).

Grado 3: Abundante formación del callo (masa voluminosa en todo el explante).

Se realizó la evaluación cualitativa en los callos en cuanto a:

- **Color (amarillo, crema y blanco).**
- **Consistencia (compacta, friable, esponjosa).**

3.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos obtenidos en la evaluación de los experimentos se registraron en el programa Excel Office 2007 y los análisis estadísticos se realizaron en el programa estadístico STATISTICA, versión 6.0 sobre Windows. Todas las variables fueron expresadas en forma porcentual, a lo que se les realizaron pruebas de comparación de proporciones para un nivel de significación del 5.0%.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. EXPERIMENTO 1. FORMACIÓN DE CALLOS EN EXPLANTES DE LIMBO FOLIAR DE CACAO EN EL CLON CCN-51.

En el experimento se evaluó la primera fase de la embriogénesis somática, que es la formación de callos o callogénesis con el objetivo de determinar la respuesta a la formación de callos de limbos foliares obtenidos del clon de cacao CCN-51 utilizando diferentes concentraciones de 2,4-D.

4.1.1. Desinfección de los explantes.

En la figura 3 se muestran los resultados alcanzados en la desinfección de los explantes de los limbos foliares. A los 5 días se evaluó el porcentaje de desinfección de los limbos foliares. Los mayores valores se obtuvieron en los tratamientos 1 y 3, con valores de 88 y 73% respectivamente.

En los tratamientos 2 y 4 (1,0 y 2.0 mg.l⁻¹) se obtuvieron valores de 64% de desinfección en los cuales fueron significativamente menores en comparación a los tratamientos 1 y 3.

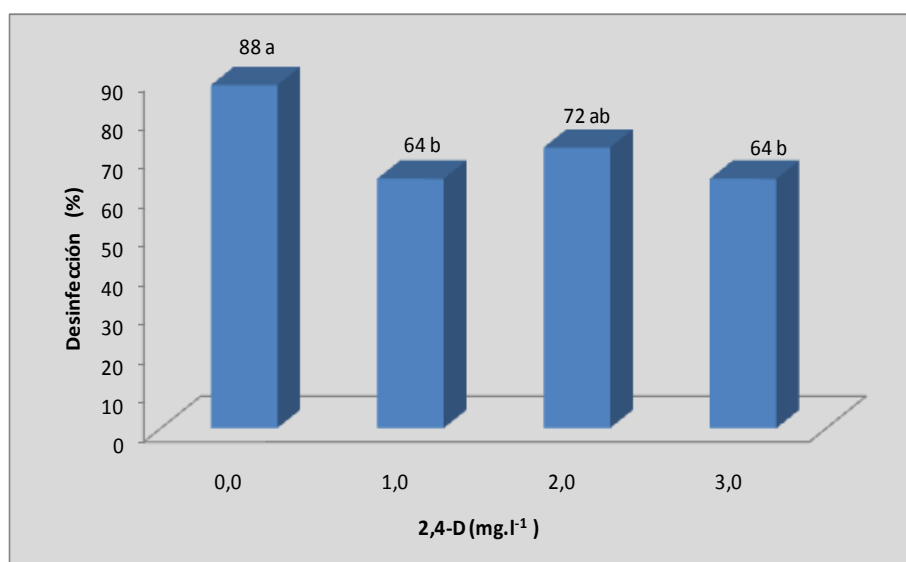


Figura 3. Efecto de la desinfección del material vegetal e instrumental.

De manera general los resultados que se obtuvieron pueden considerarse satisfactorio para el cultivo, los bajos niveles de contaminación pueden estar

asociados a que los explantes fueron tomados de material establecido en condiciones *in vitro*.

De la misma manera, para garantizar estos altos niveles de desinfección, se realizó una desinfección minuciosa del flujo laminar y la esterilización de todos los materiales necesarios para proceder a la siembra del explantes del limbo foliar de cacao.

Al respecto, Cassells (1991), plantea que la mayor fuente de contaminación primaria en los cultivos *in vitro* provienen de la planta madre. Si se logra establecer un explante axénico, la contaminación posterior será debido a fallos en las técnicas o procedimientos. Por otro lado este autor considera que en el tejido *in vitro* prácticamente no se observan síntomas y las poblaciones son muy bajas, sobre todo en los primeros subcultivos.

4.1.2. Inicio de la formación de callos.

A los 5 días de establecido el explante, en todos los tratamientos se observó que los explantes comenzaron a curvarse por la parte central, quedando los bordes en contacto con el medio de cultivo (Figura 4). Sin embargo, no se presenta la formación de callos en ninguno de los tratamientos.

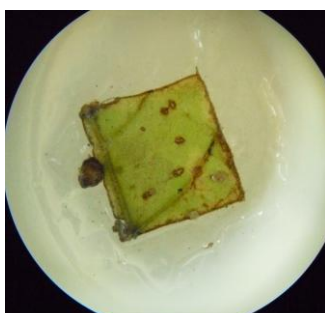


Figura 4. Explante de limbo foliar a los 5 días de establecidos en el medio de cultivo.

A los 20 días del cultivo en todos los tratamientos empieza la formación de pequeñas protuberancias, fundamentalmente sobre la nervadura principal de la hoja y en los bordes, lugar donde se realizó el corte de los explante. Los pequeños callos formados, presentaron un color cremoso. Los callos formados

alcanzaban un mayor tamaño en el medio de cultivo en el cual se utilizó $2,0 \text{ mg.l}^{-1}$ de 2,4-D, donde prácticamente ocupaba todo el explante (Figura 5).

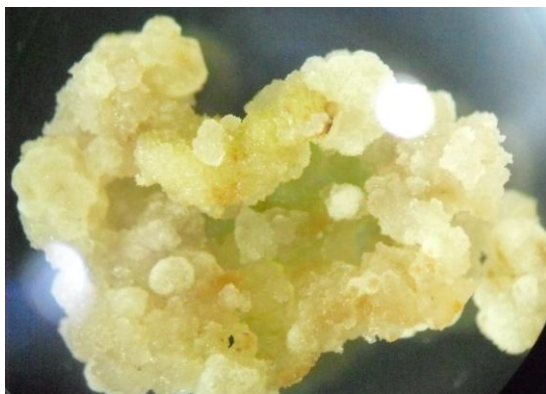


Figura 5. Explantes de limbos foliares a los 20 días de establecido el cultivo *in vitro*.

A los 30 días de establecimiento del cultivo *in vitro*, se observa la formación de callos en todos los tratamientos. En el tratamiento 3 ($2,0 \text{ mg.l}^{-1}$ de 2,4-D), los callos prácticamente cubren todo el explante (Figura 6. E). En el tratamiento 2 ($1,0 \text{ mg.l}^{-1}$ de 2,4-D), la formación de callos aun no cubre la totalidad del explante, sin embargo son callos de mayor tamaño en comparación a los callos obtenidos en los tratamiento 1 y 4 (Figura 6. D). En el tratamiento 1 y 4 ($0,0$ y $3,0 \text{ mg.l}^{-1}$ de 2,4-D), se manifiesta una ligera formación de callos que no cubre el explante en su totalidad (Figura 6. C y F).

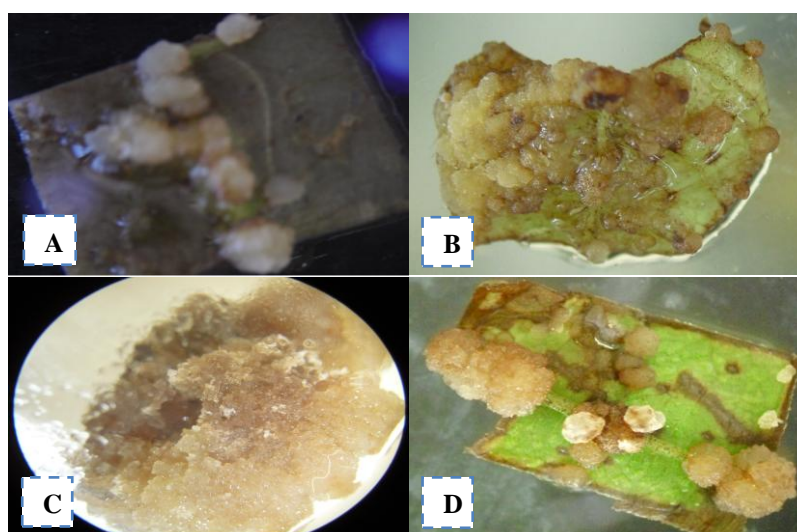


Figura 6. Formación de callos de los tratamientos T1 (A), T2 (B), T3 (C), T4 (D) a los 30 días de cultivo *in vitro*.

4.1.3. Porcentaje de formación de callos en limbos foliares de cacao del clon CCN-51.

En la figura 7 se muestra los porcentajes de formación de callos en cada tratamiento a los 5, 20,30 días. A los 5 días del cultivo se observó que no existe la formación de callos en ninguno de los tratamientos.

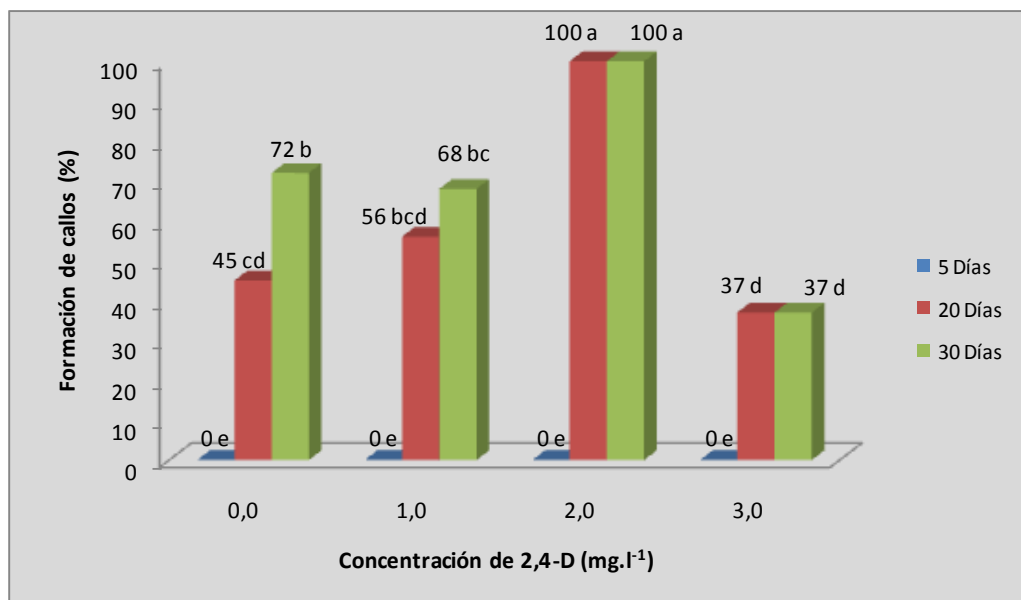


Figura 7. Porcentaje del explante con formación de callos durante 5, 20 y 30 días con diferentes niveles concentración de 2,4-D.

A los 20 días el tratamiento 3 (2,0 mg.l⁻¹ de 2,4-D) se obtuvo el 100% de formación de callos, siendo significativamente superior al resto de los tratamientos, seguido por los tratamientos 1, 2 y 4 con valores de 45, 56 y 37% respectivamente, sin diferencias entre ellos.

A los 30 días del cultivo se observa que el tratamiento 3 mantiene un 100% de callos formados, con diferencia altamente significativa al resto de los tratamientos, seguido por los tratamientos 1 y 2 con valores de 72 y 68% de callos formados respectivamente, los cuales no difieren entre sí, pero son significativamente superiores al tratamiento 4, en el cual solo se alcanza el 37% de formación de callos.

Los resultados obtenidos indican que los explantes de limbo foliar del clon CCN-51 manifiestan un mayor respuesta biológica frente a la concentración de 2,0

mg.l⁻¹ de 2,4-D, pues ésta promovió más la inducción de la calogénesis al compararlo con las otras concentraciones evaluadas. Además desde el punto de vista morfológico produjo un mayor desarrollo de los callos.

A concentraciones mayores de 2,0 mg.l⁻¹, parece ser que el 2,4-D tiene una acción inhibitoria del desarrollo de los callos, debido a que a concentraciones de 3,0 mg.l⁻¹, los callos prácticamente no desarrollaron.

En la tabla 1, se muestran el desarrollo alcanzado por los callos según la escala de Santana (1982), como puede observarse en el tratamiento 3 (2,0 mg.l⁻¹ de 2,4-D) a los 30 días del cultivo *in vitro* el 100% de los callos formados corresponden al grado 3, caracterizado por una abundante formación de callo (masa voluminosa en todo el explante).

Tabla 1. Grado de formación de callos obtenidos a partir de limbos foliares según la escala de Santana (1982).

Grado de formación de callos según Santana (1982)	0,0 mg.l ⁻¹ (2,4-D)			1,0 mg.l ⁻¹ (2,4-D)			2,0 mg.l ⁻¹ (2,4-D)			3,0 mg.l ⁻¹ (2,4-D)		
	Días			Días			Días			Días		
	5	20	30	5	20	30	5	20	30	5	20	30
Grado 0	0	-	-	0	-	-	0	-	-	0	-	-
Grado 1	-	45	72	-	56	-	-	-	-	-	37	37
Grado 2	-	-	-	-	-	68	-	100	-	-	-	-
Grado 3	-	-	-	-	-	-	-	-	100	-	-	-

En el resto de los tratamientos, el crecimiento de los callos fue más lento, evidenciado en que a los 30 días, solo se alcanzaba el 72, 68 y 37% de callos de grado 1,2 en los tratamientos 1, 2 y 4 respectivamente.

Los callos obtenidos presentaban una coloración crema – amarillenta en todos los tratamientos en los que se formaron (Figura 8), los callos obtenidos fueron de

consistencia friable y nodular, lo que demuestra su alto potencial embriogénico, según plantea Gonzales (2006).

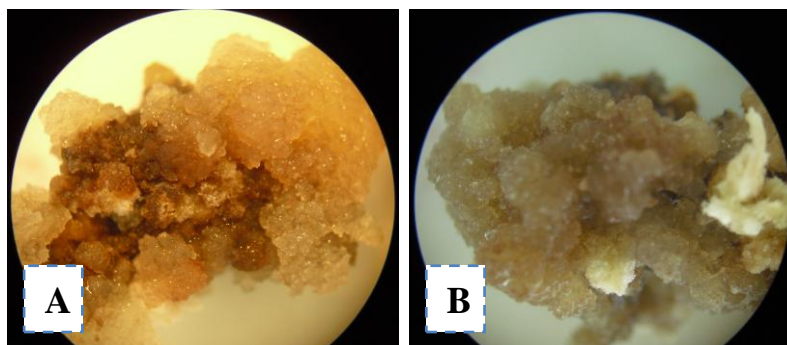


Figura 8. Coloración de los callos (A) amarillo y (B) crema a los 30 días de establecimiento *in vitro*.

De manera general los resultados obtenidos en este experimento demuestran el papel imprescindible que desempeña el 2,4-D en la formación de callos, obteniéndose los mejores resultados en los explantes de limbos foliares, cuando se utiliza a concentración de $2,0 \text{ mg.l}^{-1}$, proporcionando callos de color crema – amarillenta, friables, nodulares que indican sus características embriogénicas.

El regulador de crecimiento 2,4-D para la inducción de callos ha sido ampliamente utilizado por diferentes autores, podemos citar López (2006), en la variedad Navolean de Plátano vianda; Rodríguez (2004) en cacao; Silva (2006), en cotiledones inmaduros del mismo clon UF-613.

Estos resultados fueron similares con los que obtuvieron González *et al.* (2000) cuando aplicaron $0,5 \text{ mg.l}^{-1}$ de 2,4-D en explantes foliares del cultivo *Coffea canephora* P., y observaron que la velocidad de crecimiento de los callos en uno de los clones de Robusta fue más rápido que cuando se utilizaron en otros reguladores de crecimiento como 6-BAP y Picloram. Los reguladores de crecimiento como las auxinas tienen un gran aporte en el crecimiento de las plantas en su estado natural para la división celular, pero en los experimentos de multiplicación celular, su forma sintética se emplea con mejores resultados (Daves, 1995).

Varios autores (Velásquez *et al.*, 2004; López *et al.*, 1996), plantean que la aplicación de 2,4-D a diferentes concentraciones combinado con kinetina ayuda en la formación de callos friables y la rapidez en que se inducen los mismos. En estudios realizados por González (2001), para la multiplicación *in vitro* de Agave, observó el efecto producido por la interacción entre los factores (tipo de auxina-concentración) utilizando como auxinas el 2,4-D en combinación con el dicamba.

4.2. EXPERIMENTO 2. FORMACIÓN DE CALLOS EN DIFERENTES TIPOS DE EXPLANTES DE CACAO DEL CLON CCN-51.

4.2.1. Desinfección de los explantes y material necesario para el cultivo *in vitro*.

La desinfección de los explantes en el cultivo *in vitro* es una fase esencial para el establecimiento, multiplicación, inducción de callos, órganos o embriones somáticos.

En la figura 9 se muestran los resultados alcanzados en la desinfección de los diferentes explantes. Para los estaminoides y pétalos se obtuvo un 100% y para los cotiledones un 80% de explantes desinfectados, sin diferencia significativa entre ellos. Estos resultados demuestran que con el empleo de hipoclorito al 1% durante 20 minutos, se obtienen resultados satisfactorios para la eliminación de los microorganismos existentes en los botones florales y los cotiledones, lo que permitió la obtención de un elevado porcentaje de explantes asépticos.

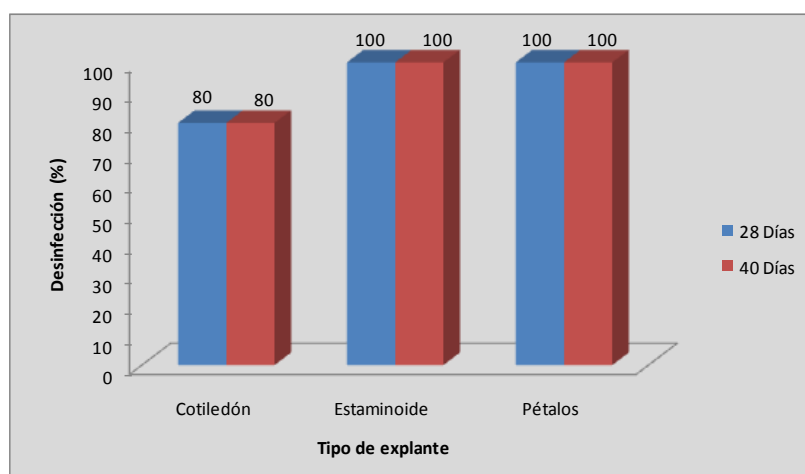


Figura 9. Porcentaje de desinfección de diferentes explantes de cacao del clon CCN-51

Respuestas similares fueron alcanzadas por Silva (2006), cuando utilizó para la desinfección hipoclorito de sodio al 1% durante 20 minutos en el clon UF- 613, y obtuvo un 96% de estaminoides utilizados como explantes, libres de contaminación microbiana.

En el caso de los cotiledones, el tiempo de exposición del explante con el desinfectante, permitió la penetración del cloro en el mucílago que recubre la semilla y permitió la eliminación de los microorganismos, que puedan encontrarse en la superficie o tejidos del explante (Jiménez, 1998).

Trabajos realizados por Finale *et al.* (2002) y Alvarado *et al.* (2003), les permitieron plantear que la desinfección del material vegetal requiere de un análisis minucioso, teniendo en cuenta las condiciones en que se desarrolló la planta donante. La existencia de poblaciones bacterianas y fungosas en los explantes constituyen un factor responsable de las mayores pérdidas por contaminación en el cultivo *in vitro* de plantas y continua siendo uno de los principales problemas que afecta la aplicación de las técnicas del cultivo *in vitro* de tejidos vegetales (Gonzales y Barrios, 2003).

Skirvin *et al.* (1999) señalaron que la desinfección superficial de los explantes puede realizarse con el hipoclorito de sodio, hipoclorito de calcio, alcohol y peróxido de hidrógeno, siendo el hipoclorito de sodio el agente desinfectante más comúnmente empleado. Los explantes pueden ser tratados con una solución de hipoclorito de sodio de 1 a 60 minutos; además expresaron que el bicloruro de mercurio fue usado como desinfectante, pero no es recomendado por su toxicidad.

4.2.2. Inicio de la formación de los callos en los diferentes explantes de cacao del clon CCN-51.

A los siete días, de iniciado la implantación *in vitro*, se observó un aumento del volumen de los explantes, lo que constituye un indicio de respuesta callogénica. Los explante de cotiledones, tomaron una coloración rosada y se observó que se rompía la estructura inicial, sin embargo no se evidenció formación de callos (Figura 10).



Figura 10. Explantes de cotiledón (A), estaminoides (B) y pétalos (C), a los 7 días del cultivo *in vitro*.

En los estaminoides y pétalos se observa un engrosamiento de los limbos de los pétalos y en los estaminoides en la parte que se separa del resto del botón floral.

4.2.3. Formación de callos en el clon CCN-51.

En la figura 11 se muestran los resultados del porcentaje de formación de callos a partir de cotiledones, estaminoides y pétalos del clon CCN-51 a los 28 y 40 días posteriores al establecimiento.

A los 28 días de cultivo se observó la presencia de callos en todos los tratamientos. Los mayores valores (21%) corresponde a los cotiledones, en los pétalos y estaminoides los porcentajes de callos formados fueron bajos (8 y 12%) respectivamente.

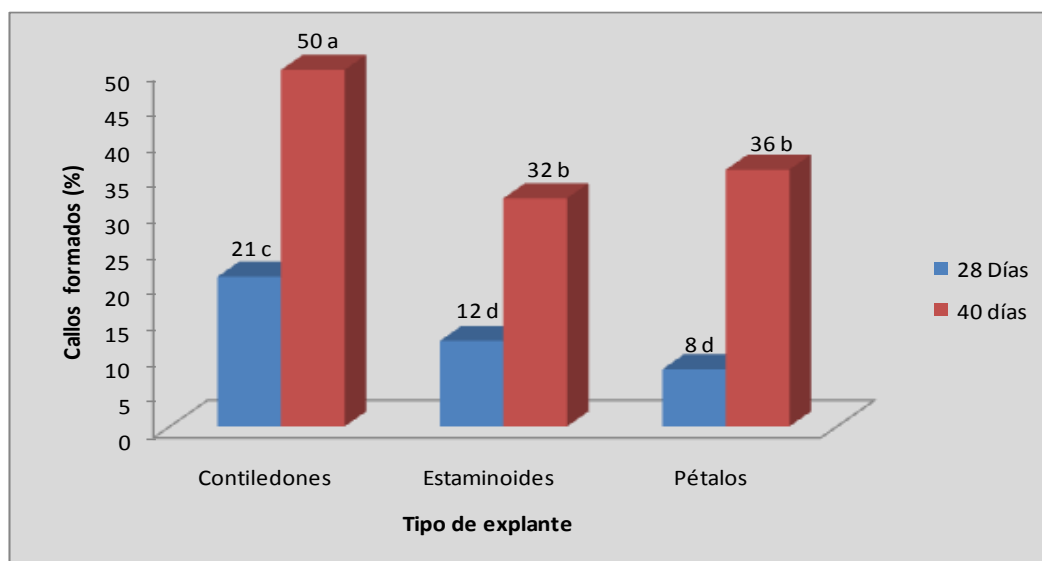


Figura 11. Porcentaje de formación de callos de diferentes explantes de cacao del clon CCN-51.

A los 40 días se observó un aumento en la formación de callos en todos los tratamientos, los cotiledones mantuvieron los mayores valores de formación de callos alcanzando un 50% de explantes con callos, valores significativamente superiores a los alcanzados en los explantes de estaminoides y pétalos, en los cuales lograron valores de 32 y 36% respectivamente.

Los callos obtenidos a los 40 días posteriores al establecimiento en los diferentes tipos de explantes (Figura 12), fueron pequeños, con una coloración pardo – cremoso, de consistencia friable, nodulares característicos de los callos embriogénicos.



Figura 12. Formación de callos de cotiledón (A), estaminoides (B) y pétalos (C), a los 40 días del cultivo *in vitro* de cacao del clon CC-51.

Estos resultados demuestran, que es posible obtener callos con características embriogénicas a partir de diferentes partes de la planta de cacao, en este caso cotiledones, estaminoides y pétalos.

En sentido general los cotiledones presentaron una respuesta superior en cuanto a la formación de callos al compararlos con los demás explantes objeto de esta investigación, demostrando un crecimiento más rápido y alcanzando un mayor tamaño en un menor tiempo.

Los resultados obtenidos en la presente investigación no coinciden con los obtenidos por algunos autores como Velásquez *et al.* (2004), Silva (2006) quienes desarrollaron experimentos utilizando explantes florales y cotiledonales de cacao. Estos autores obtuvieron que los estaminoides mostraron mejores

resultados en la formación de callos embriogénicos. Gómez (1998), señaló que el tipo y estado fisiológico del explante es uno de los factores que más afectan a la formación de callos, además del genotipo de la planta, los reguladores del crecimiento y las condiciones de cultivo.

Rodríguez (2004), evaluó el comportamiento de la formación de callos en clones de cacao a partir de estaminoides, en medios de cultivo con diferentes combinaciones de auxinas y citoquininas, el cual pudo observar que en los medios donde aplicó $1,0 \text{ mg.l}^{-1}$ de 2,4-D sin la presencia de cinetina, obtuvo los mejores resultados.

Según Gómez (1998), el sitio o lugar para el comienzo de la proliferación de callos generalmente ocurre en la superficie del explantes o en la parte donde se han producido cortes, lo cual se manifestó en los explantes empleados en la presente investigación.

Según Suksa-Ard *et al.* (1999), la formación de callos y la embriogénesis somática depende considerablemente del órgano usado como explante. Diversos autores han destacado la importancia del tipo de explante para el éxito del proceso de embriogénesis somática en especies vegetales, entre los que podemos citar a Castillo (2002) y Usatorres *et al.* (2002).

De acuerdo con Gonzales (1993), las diferencias en la respuesta de los explantes pueden deberse a variaciones en el contenido endógeno de hormonas y a las características anatómicas de los mismos, ya que la estructura laminar del limbo foliar favorece el contacto con el medio de cultivo y puede ser un factor determinante en la respuesta. Jiménez *et al.*, (2005), consideraron que altos niveles endógenos de auxinas en los explantes son necesarios para la proliferación celular y favorecer los procesos embriogénicos, siendo responsables de la ocurrencia de la embriogénesis somática, estando directamente correlacionado el contenido de hormonas endógenas con la capacidad embriogénica del explante.

4.3. EXPERIMENTO 3. HISTOLOGÍA DE CALLOS EMBRIOGÉNICOS DE CACAO DEL CLON CCN-51.

Las técnicas de cultivo de tejidos son utilizadas para una rápida propagación de plantas, como una fuente importante de información genética en células vegetales y regeneración de algunas características (Maximota *et al.*, 2002; Hita *et al.*, 2003); siendo necesario conocer los aspectos de diferenciación celular y la histogénesis para poder entender mejor la organogénesis (Vieira & Esquibel, 1998). La embriogénesis somática es altamente dependiente de la especie, el genotipo, el estado fisiológico de la planta donante, las condiciones de incubación, la composición del medio de cultivo, el estado de desarrollo del explante y la técnica de cultivo *in vitro* que se aplique (Risueño, 2000).

Para un mayor conocimiento y una mejor comprensión de los cambios estructurales que dan lugar a la embriogénesis somática, mediante la aplicación del cultivo *in vitro*, se ha hecho uso de las técnicas histológicas que han facilitado describir el proceso que conduce a un tejido a readquirir sus potencialidades embriogénicas y esto puede ser determinado para diferentes tejidos y plantas (Ramírez *et al.*, 2000).

En la figura 13 se muestran los resultados de los cortes histológicos realizados a los callos obtenidos de diferentes explantes.

Para todos los tipos de explantes se observaron zonas, donde predominaron células parenquimatosas, organizadas de forma compacta en algunas áreas y en otras de forma menos organizada. Se observó además células esféricas, pequeñas y de núcleo denso, que las distinguen como células embriogénicas. Se apreciaron zonas del callo constituido por células no embriogénicas, alargadas y vacuoladas.

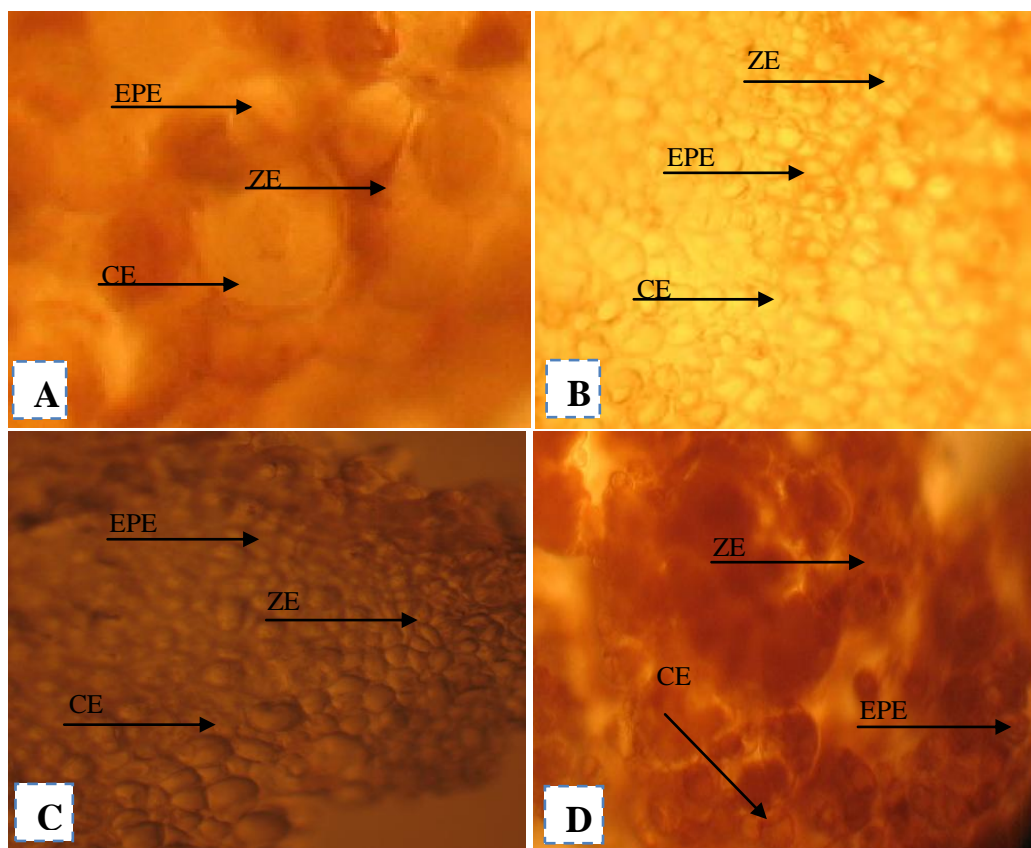


Figura 13. Corte histológico de cotiledón (A), estaminoides (B), pétalos (C) y limbo foliar (D); de segmentos de callos de los diferentes explantes de cacao del clon CCN-51.

Leyenda: CE: Células Embriónicas. ZE: Zona Embriónica. EPE: Estructura Proembriónica.

Rival (2000) y Goh *et al.*, (2001) manifiestan que conjuntamente con las células embriónicas también se puede observar células de tipo no embriónicas altamente diferenciadas y vacuoladas, demostrándose que en un mismo callo pueden existir células con capacidad embriónica y células no embriónicas, y la formación de un tipo de callo u otro, depende del explante empleado y la formación de los proembriones puede ser influido por el genotipo.

Fuentes *et al.* (2005), realizaron una evaluación histológica en callos de *Stylosanthes guianensis* cv. CIAT-184, obtenidos a partir de hipocótilos, hojas cotiledonales y hojas verdaderas, los cuales fueron cultivados en medio MS suplementado con 2,4-D y 6-BAP. Los explantes manifestaron diferencias en cuanto al nivel de desdiferenciación de los tejidos durante la callogénesis, así como variabilidad en la textura de los callos formados, dependiendo de la

concentración hormonal, observando que los callos estuvieron constituidos por células meristemáticas de pequeño tamaño, de núcleo denso, con características embriogénicas.

Laparra *et al.* (1997), manifestaron que se ha demostrado que las células embriogénicas proceden de las células meristemáticas y el aumento en el número de éstas se debe casi enteramente a la división repetida en tejidos meristemáticos específicos que se hallan sólo en regiones limitadas y están formados por células permanentemente embrionarias.

V. CONCLUSIONES

- Se logró la formación de callos a partir de limbo foliar en todas las concentraciones de 2,4-D empleadas, los mejores resultados (100%) se obtuvieron al utilizar $2,0 \text{ mg.l}^{-1}$ de 2,4-D.
- Se obtuvo la formación de callos potencialmente embriogénicos en explantes de pétalos (36%), estaminoides (32%), y cotiledones (50%) en el cultivo del cacao utilizando $2,0 \text{ mg.l}^{-1}$ de 2,4-D.

VI. RECOMENDACIONES

- Realizar evaluaciones de otros reguladores del crecimiento en la inducción de callos en diferentes explantes de cacao.
- Evaluar diferentes combinaciones de auxinas y citoquininas para la diferenciación de embriones somáticos.
- Emplear nuevos medios en las diferentes fases de embriogénesis somática.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Agramonte, D., Jiménez, F. y M.A. Dita (1998). Aclimatización. En: Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología. Editor: J.N. Pérez.193-206.
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, S. 2008. Dinámica de la materia orgánica en los suelos agrícolas. XI Congreso Ecuatoriano de la Ciencia del Suelo. Universidad Central del Ecuador. Pp.1-8. Quito-Ecuador.
4. 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.
5. Alvarado, Y.; MCruz; N. Portal; L. García; M. freire; E. Quiala y R. Gómez. (2003). Estrategia de trabajo para el control de la contaminación bacteriana en la micropropagación de la caña de azúcar. Resúmenes. Taller internacional de Biotecnología Vegetal (BioVeg 2003). Centro de Bioplasmas. CD-ROM. Ciego de Ávila.
6. Barbón, R (2003) Aspecto relacionado con el ambiente físico y la caracterización molecular de la embriogénesis somática. Biotecnología Vegetal 3 (4): 211-221.
7. Barranco, LA (2001) Embriogénesis somática en banano (*Musa AAAB cv. FHIA-18*) empleando medios de cultivo líquidos. En: Tesis presentada en opción al grado de Doctor en Ciencias Agrícolas. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central de las Villas, Santa Clara .p.8-15.
8. Bayer (1984). Manual Fitosanitario del cacao. Ciudad México. 35p.

9. Braudeau, J.(1970). El cacao, técnicas agrícolas y producciones tropicales (*Theobroma cacao*, L). Editorial Pueblo y Educación. La Habana. Cuba, p: 279.
10. Carrazana, D.; Herrera; N. mollinedo; I. Arbolaes; H. Castellanos y T.Martinez. (2003). Detección de contaminantes bacterianos y fúngicos endógenos en el establecimiento de *Musa sp*. *Biotecnología Vegetal*, 49-52.
11. Cassells AC, 1991. Problem in tissue culture: culture contamination. En: Debergh P, Zimmerman RH. (Eds). *Micropropagación*. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, 31-45.
12. Castillo, L.R. (2000). La embriogénesis somática en la caña de azúcar (*Saccharum sp. Híbrido*). Estudios básicos del proceso y su contribución a la semilla artificial. Tesis de grado (Dr. En Ciencias Agrícolas). Ciego de Ávila. 109 p.
13. Chatelet, P; Michaux-Ferriere, N; Dublin, P. 1992. Potentialites embryogenes du nucelle et du tegument interne de graines immatures de cacaoyer (*Theobroma cacao* L.). *Acad. Sci. Paris, t. 315, Serie III*, pp. 55-62.
14. Crozier, A (1981) Aspects of metabolism and physiology of gibberellins *Adu. Bot .Res.* 9: 33-148.
15. Daves P.J (1995). "Plant Hormones, Physiology, Biochemistry and Molecular Biology", Kluwer Academic Publishers, London.
16. De la Cruz, M., Mota, L., y A. Gómez (1996). Cacao. Su domesticación. *Investigación y Ciencia*. Junio:38-39.
17. Dublin, P. (1984). Cacao. In: *Handbook of Plant Cell Culture*: 541-563
18. Ekanayake, I. J. Evaluación de resistencia a la sequía en genotipos de cacao. 1993. 12 P <CIP. Guía de Investigación No 19>.

19. 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.
20. Fao (2010). Bases estadística FAOSTATS. Disponible en: <http://www.fao.org>, visitada: 15 de mayo de 2011.
21. Fao. (2005). Bases estadística FAOSTATS. <http://www.fao.org> (15 de marzo de 2005).
22. 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.
23. Figueira, A., Janick, J. y J.N. Bemiller (1994). Partial characterization of cocoa pod and stem gums. *Carbohydrate Polymers* 24: 133-138.
24. Figueira, A., Janick, J., y Goldsbrough (1994). Genome size and DNA polymorphism in *Theobroma cacao*. *J. Amer Soc Hort Sci* 117(4):673-677.
25. Gamboa, VA y Núñez, LE (2001) Comportamiento de la propagación masiva del ñame en escala comercial. Trabajo de Diploma Universidad de Oriente.
26. Goh, D., Bon, M., Aliotti, F., Escoute, J., Ferreire, N. & Montevvis, O. 2001. *In vitro* somatic embryogenesis in two major rattan species: *Calamus merrilli* and *Calamus subinermis*. *In vitro CELL. DEV. BIOL. -PLANT*, 37: 375-881.
27. 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.
28. Gonzales, G. (2001). Embriogénesis somática en Henequén (*Agave Fourcroydes* Lem.). Establecimiento de una metodología de propagación *in*

in vitro Tesis de Grado (Dr. En Ciencias agrícolas). Universidad de Matanzas. 114 p.

29. Gonzales, O. (2006). Establecimiento de una metodología de micropropagación mediante embriogénesis somática en el cultivo del boniato (*Ipomea batata*(L) Lam). En tesis presentada en opción al grado de científico de Doctor en Ciencias agrícolas, INCA. La Habana.
30. González, G. (2001). Embriogénesis somática en henequén (*Agave fourcroydes* Lem.). Resumen de Tesis de Grado (Dr. en Ciencias Agrícolas). INCA. La Habana. 39p.
31. González, M. C., Padrón, E., Iglesias, L. Pérez, N. y R. Rojas (1993). Obtención de callos y regenerantes de plantas a partir de semillas de arroz irradiados con neutrones rápidos. Cultivos Tropicales. Vol. 14. No. 1:61-63.
32. González, M.E. (2003). Micropropagación de café (*Coffea canephora* P. var. Robusta) mediante la embriogénesis somática con el empleo de metabolitos de origen bacteriano. Tesis en opción al Grado Científico de Doctor en Ciencias Agrícolas. INCA. 97p.
33. González, MC; Morejón, R y Portilla, M (2007) Establecimiento de las concentraciones óptimas de hormonas para el cultivo *in vitro* de especies de *Coffea arabica* L. XII Congreso Científico del INCA. Programas y Resúmenes.
34. González, O.S., Sam, O., Hernández, M.M., Coronado, M.J. y J.J. Silva (2005). Caracterización histológica de la embriogénesis somática a partir de limbos foliares de boniato (*Ipomoea batatas* L.) Lam.). Cultivos Tropicales (en prensa).
35. Gostch, N. (1997). Cocoa biotechnology: status, constraints and future prospects. Biotechnology Advances. Vol.15.No. 2.333-352.

36. Hernández, G.; H. Vento y Y. Del Llano. (1998). Desinfección exógena y endógena de malanga para su conservación *in vitro*. III encuentro Latinoamericano de Biotecnología Vegetal. La Habana. P. 46.
37. Herrera, M.; Carpio, H.; Chávez, G. 1999. Estudio del sector de cacao.
38. Hita, O., Gallego, P., Villalobos, N., Lanas, I., Blázquez, A., Martín, J.P., Fernández, J., Martín, L. & Guerra, H. 2003. Improvement of somatic embryogenesis in *Medicago arborea*. *Plan Cell, Tissue and Organ Culture*, 72 (1): 13-18.
39. Iniap/Pnrt-Cacao, 2008. Guía para el manejo de producción de cacao. Instituto nacional autónomo de investigaciones agropecuarias. Programa nacional de cacao. Documento por publicar. Santo Domingo - Ecuador.
40. Irizarry, H. y E. Rivera (1999). Early yield of five cocoa family at the three locations in Puerto Rico. *J. Agric. Univ. P.R.* 82 :167-176.
41. Janick, J. y A. Whipkey (1985). Axillary proliferation of shoots from cotyledonary nodal tissue of cacao. *Revista Theobroma* 15(2): 125-131.
42. Jiménez, E (1998) Generalidades del cultivo *in vitro*. En: Pérez JN. (eds). Propagación y mejora genética de plantas por Biotecnología. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Santa Clara, Cuba .p. 45-46.
43. 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.
44. Jiménez, E. (1998a). Cultivo de ápices y meristemas. En: Propagación y mejora genética por Biotecnología. Editor: J. Pérez Ponce. IBP. Santa Clara. Cuba. pp 45-56.
45. Laparra, H., Bronner, R. & Hahne, G. 1997. Histological analysis of somatic embryogenesis induced in leaf explants of *Helianthus smithii* Heiser.

Protoplasm, 196: 1-11.

46. Maceo, Y (2007) Establecimiento y multiplicación *in vitro* de la *Curcuma longa*. En: Trabajo de Diploma. Centro de Estudio de Biotecnología Vegetal, Universidad de Granma. p. 9-10.
47. Maceo, Yariuska (2007). Establecimiento y multiplicación *in vitro* de la *Curcuma longa*. Trabajo de Diploma. Centro de estudios de Biotecnología Vegetal. Universidad de Granma, pp. 9-10.
48. Martin, R; Mok y D. Mok. (1993). Cytolocalization of zeatin. Oxylosyl transferase in Phaseolus. Proc. Natl Acad. Sci., 90: 953-957.
49. Martínez, F. (2005). Comunicación personal.
50. Maximova, S; Alemanno, L; Young, A; Michaux-Ferriere, N; Traore, A; Gultinan, M. 2002. Efficiency, Genotypic Variability, and Cellular Origin of Primary and Secondary Somatic Embryogenesis of *Theobroma cacao* L. In Vitro Cell. Dev. Biol-Plant 38. pp. 252-259.
51. Maxwell, P; Blake, J. 1984. Micropropagation of cacao through Axillary bud Culture. Plant Tissue Culture and its Agricultural Applications Sep. pp. 17-21.
52. Mckersie, B.D. y D.C. Brown (1996). Somatic embryogenesis and artificial seeds in forage legumes. Seed Science Research, 6:109-126.
53. 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.
54. Murashige, T y Skoog, F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant 15: 473 - 497.
55. Murashige, T. and Skoog, F.S. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Plant Physiol(5):173-197.

56. Orellana, P (1998) Propagación vía organogénesis. En: Pérez, JN (ed.). Propagación y mejora genética de Plantas por Biotecnología. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Santa Clara. p. 151-178.
57. Parrot, W (1993) Cell culture techniques: cell-culture, *in vitro* selection and somaclonal variation. En: Biotechnology applications for banana and plantain improvement. Reunión INIBAP (1992, San José, Costa Rica) Proceeding. Montpellier, Francia. p.183-191.
58. 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.
59. Pelacho, A; Martín, L; Cueva, R; Sanfaliere, J; Badía, J y Alins G (2002) Cultivo *in vitro* (en línea) En [http://www.etsea.edl.es/in vitro/luz](http://www.etsea.edl.es/in_vitro/luz) (Consulta 12 julio 2005). Tissues of *Stylosanthes guianensis* (Aubl.) Sw. Scientia Agricola. 58:759.
60. 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.
61. Pere, JN (2006). Embryogenesis somática en frijol tepary (*Phaseolus acutifolius* A. Gray cv. TB1). En: Tesis de Maestría. Instituto de biotecnología de la plantas, Villa Clara, pp. 15-18.
62. Pérez, J.C., Gómez, R. y J.N. Pérez (2001). Inducción de la embriogénesis somática a partir de inflorescencias inmaduras. Biotecnología Vegetal. Vol. 1.No 2:97-102.
63. Pérez, J.C., Gómez, R. y J.N. Pérez (2001). Inducción de la embriogénesis somática a partir de inflorescencias inmaduras. Biotecnología Vegetal. Vol. 1.No 2:97-102.

64. Pérez, JE y Gómez, R (1998) Field performance (*Sacharum spp hybrids*) Mutantst. En: Somaclonal and induced mutation in crop improvement. SM Jain D.S. Brar B.S. Ahloowalia (Eds) Dordrecht: Flower Academic Publishers. p. 425- 448.
65. Radice, S (2004) Morfogénesis *in vitro*. Parte II Herramientas Básicas de la Biotecnología y Mejoramiento Vegetal. En: Echenique, V; Rubinstein, C; Mroginski, L. (eds). Biotecnología y Mejora Vegetal. (Ed): INTA, Buenos Aires, Argentina.p. 27-33.
66. Ramírez, C., Testillano, P., Pintos, B., Moreno, M., Domenech, J., Gómez, A., Manzanera, J., Bueno, M. & Risueño, M. 2000. Cellular characterization of microspore embryogenesis in anther culture of *Quercus*
67. Ramírez, R. (2005). Uso de rayos x en la estimulación del crecimiento, rendimiento y calidad del fruto en las plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum*, mill). Tesis de Grado (Dr. En Ciencias Agrícolas). INCA. La Habana. 99 p.
68. Reinert, J; Backs- Husemarr N y Zerban, H; (1971) Determination of embryo and root. Formation and tissue culture from daucus CAROTA. Cell. Natl. CRNS. (Paris):261-268.
69. Risueño, M. 2000. Microspore-derived embryogenesis from *in vitro* cultures of heat-stressed anthers of *Capsicum annum* involves a differentiation followed by proliferation and further redifferentiation. Plant Development and Nuclear
70. Rival, A. 2000. Somatic embryogenesis in oil palm. In: Jain, S., Gupta, P., Newton, R. (eds.). *Somatic embryos in woody plant*, Vol. 6, Dordrecht, Boston, London: Kluwer Academic Publishers. P. 249-290.
71. Roca, W; Mroginski (1993) Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones. Editorial CIAT. Colombia No. 151. p. 60-70.

72. Rodríguez, P. 2004. Embriogénesis somática en Cacao (*Theobroma cacao* L.) trabajo de diploma, Universidad de Granma. p 30.
73. Rossel, C (1990). Fundamento teórico práctico del tejido vegetal.
74. Santana, N. (1982). Determinación de un medio adecuado para la obtención de callos en variedades de caña de azúcar (*Saccharum sp.*) *in vitro*. Cultivos tropicales, 4(3): 35-40.
75. Santana, N. (1993). Embriogénesis somática en el cultivo del cafeto (*Coffea sp.*). Tesis de Grado (Dr. en Ciencias Agrícolas). INCA. La Habana. 155 p.
76. Santana, N. Cortés, S., Martín, J. y S. Montes (1996). Adaptación de vitroplantas de embriones somáticos de cafeto (*C. arabica* L.) variedad catimor (9722). *Cultivos Tropicales* 17(2):83-85
77. Sasson, A. (1993). La Alimentación del Hombre del Mañana. UNESCO Editorial Reverté, S. A., Barcelona, España.
78. Silva. J. J. (2006) Establecimiento de una metodología para la embriogénesis somática en el cultivo del cacao (*Theobroma cacao* L.) Tesis de Doctorado en Ciencias Agrícolas.
79. Sondahl, M. R., Liu, S. y C. Bellato (1993). Cacao somatic embryogenesis. *Acta Horticulturae*. 336: 245-248
80. Sondahl, M.R., Liu, S., Bellato, C. y A. Bragin (1994). Recent advances in cacao micropropagation through the production of somatic embryos from non sexual tissues. The Scientific Research council. Jamaica: pp 79-84.
81. Statistica. (1998). Versión 6.0 para Windows Statsoft. Inc. Tulsa. USA.
82. Suber. Biotechnological Approaches for Utilization of Gametic Cells. Cost 824, Bled, Slovenia. P. 1-5.

83. Suksa-ARD, P., Kataoka, I., Fujime, Y. y S. Subhadrabandhu (1999). Requirement of 2,4-D and sucrose for somatic embryogenesis of papaya. Japanese Journal of Tropical Agriculture. Vol. 43.No 1:1-4.
84. Suksa-Ard, P.; I. Kataoka; Y. Fujime y S. Subhadrabandhu. (1999). Requirement of 2,4-D and sucrose for somatic embryogenesis of papaya. Jon. J. Trop. Agr., 43(1): 1-4.
85. Takahashi, T; Gasch A; Nishizawa, N y Chua, N (1995) The diminuto gene of *Arabidopsis* is involved in regulating cell elongation. Genes and Development.9:97-107.
86. Trejo, G; Maldonado, U; Jiménez, A; Blanqueto, M; Salcedo, G; Martínez, P y De Jesús, A (2002) Reguladores de crecimiento en la regeneración de plantas a partir de anteras de arroz (*Oriza sativa* L. var. Japónica H 2005). Agrociencia.36:441-449.
87. Vázquez, E. y S. Torres. (1995). Fisiología Vegetal. Editorial Pueblo y Educación. La Habana. 451 p.
88. Vieira, R. & Esquibel, M.D. 1998. Histogenesis of callus from stem explants of *Ipomoea batatas* (L.) Lam. *Leandra*, (13): 45-55.
89. Walgate, 1990. El cacao, Técnicas agrícolas y producciones tropicales (*Theobroma cacao* L). Editorial Pueblo y Educación. La Habana. Cuba, p. 279.
90. Yoon E. y Y. Choi (2002) Micropropagation and mass production of adventitious explantes. Journal of Plant biotechnology. Vol. 4, no.1, p 33-37
91. Zayas, Danaysis (2005). Efecto de diferentes formulaciones de vitamina en la multiplicación *in vitro* de ñame (*Dioscorea alata*, L.). En: trabajo de diploma, Universidad de Granma, pp. 9-11.