

**INSTITUTO TECNOLÓGICO DE COSTA RICA**

**ESCUELA DE BIOLOGÍA**

**INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

**CULTIVO DE TEJIDOS**

**Profesora: MSc Vilma Jiménez**

**Micropropagación de *Theobroma cacao L.***

**Estudiantes:**

**Agustín Büchert Sainato**

**Diana M. Ortiz Rivera**

**Jose R. Herrera Mesén**

**Juan C. Quesada Rojas**

**II Semestre, 2004**

# ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	3
MICROPROPAGACIÓN DE CACAO.....	6
Embriogénesis Somática en Cacao.....	7
Iniciación de los embriones .....	7
Desarrollo de los embriones somáticos.....	8
Conversión de embriones a plantas .....	9
Preservación de germoplasma .....	10
Producción de plantas de cacao a través de microinjertos de embriones somáticos.....	10
Histología de Embriogénesis Somática de Tejidos Florales .....	12
Embriogénesis somática y regeneración de plantas a partir de explantes florales utilizando <i>Tidiazuron</i> .....	13
Comparación entre embriogénesis cigótica y embriogénesis somática a partir de partes florales .....	16
CONCLUSIONES .....	18
BIBLIOGRAFÍA.....	19
ANEXO 1.....	21

## INTRODUCCIÓN

El cacao es un cultivar nativo de América Tropical, cuyo centro de origen se ha situado al noreste de Suramérica, en los bosques ecuatoriales de la región amazónica. *Theobroma cacao*, pertenece a la familia de las esterculiáceas, siendo una de sus principales características la producción de flores y frutos en el tallo y las ramas. *T. cacao* es una de las 21 especies del género *Theobroma*, el cual presenta gran diversidad (Atlas del Cacao, 2002; CNC, 1988).



Figura 1. Hoja, flor, fruto y semilla de *Theobroma cacao* L. (Köhler, 2001)

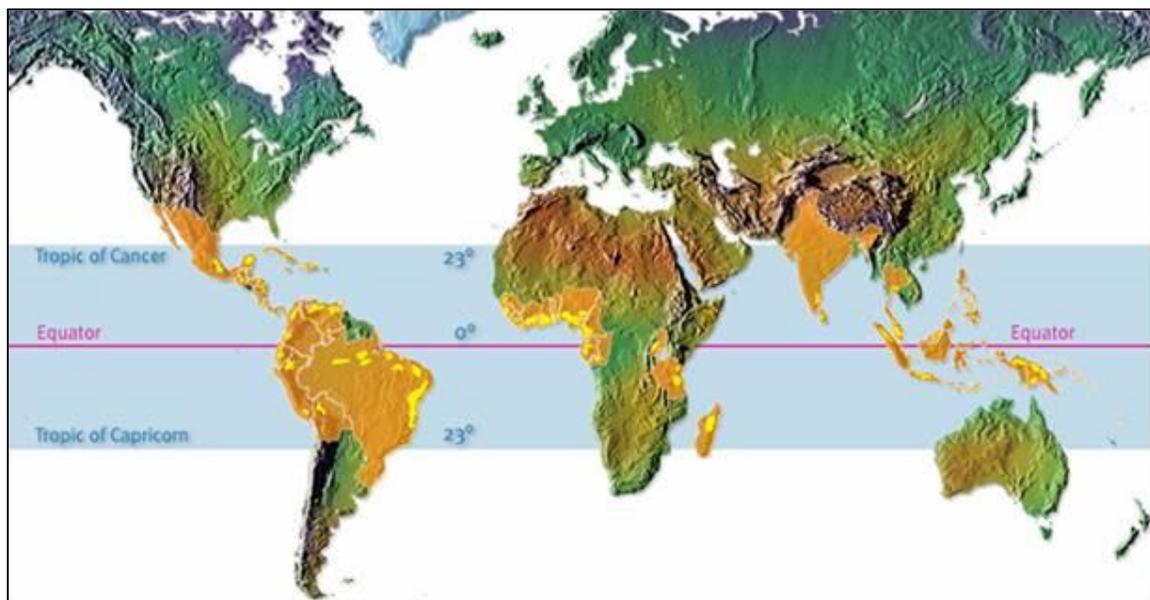
El clima tropical húmedo es el más favorable para el crecimiento estable del cacao, los árboles se desarrollan mejor en las regiones comprendidas entre los 20° al norte y 20° al sur de la línea ecuatorial. La mayoría de los cacaotales se encuentran a una altitud inferior a los 400 msnm. Los máximos de cosecha se encuentran estrechamente vinculados con la distribución de las lluvias, entre otras cosas, porque el tamaño del grano se ve influenciado por las lluvias ocurridas durante la etapa de crecimiento de los frutos. Dentro de las condiciones climáticas deseables se encuentran: niveles de precipitaciones ubicados entre los 1 500 - 2 000 milímetros (bien repartidos durante los doce meses del año), temperatura comprendida entre 18 °C y 32 °C y una humedad relativa aproximada del 70%; además deben protegerse los árboles de la luz solar directa y de los vientos excesivos (CNC, 1988; Centro de Comercio Internacional UNCTAD/OMC, 2001).

El cultivo de cacao necesita de un suelo con buena retención de humedad durante el verano y con buen drenaje durante el invierno; siendo los suelos de textura mediana (franco-arenoso, franco-limoso, franco-arcilloso, etc.) los que mejor cumplen los requisitos que estas plantas requieren. En cuanto a la

profundidad del mismo se requiere un mínimo de 1.50 m, un pH alrededor de 6.0-7.5, una relación Carbono/Nitrógeno mínima de 9, una capacidad de intercambio catiónico de más de 12 miliequivalentes por cada 100 g de suelo y un grado de saturación de bases de más del 35% (CNC, 1988).

El árbol puede alcanzar alturas alrededor de 8-10 m y sus raíces alcanzan profundidades de 1.5 a 2 m. El fruto o mazorca, mide de 15 – 25 cm de largo y contiene de 30 a 40 semillas, que son convertidas en el grano de cacao después de ser fermentadas y secadas. El cacaotal empieza a producir después de cinco años de haber sido plantado y puede seguir produciendo durante varias décadas (Atlas del Cacao, 2002; Centro de Comercio Internacional UNCTAD/OMC, 2001).

El cacao, a inicios del siglo XX era producido de forma predominante en las Américas, y fuera de esta región, el único volumen de producción importante correspondía las islas de Santo Tomás y Príncipe. En la actualidad este cultivo es encontrado alrededor del mundo en la zona tropical, cuya área de desarrollo alcanza en el extremo norte, hasta Hainan en China y en el extremo sur hasta Sao Paulo, Brasil. Dentro de los principales países productores se encuentran Costa de Marfil, Ghana, Indonesia, Nigeria, Brasil, Camerún, Ecuador y Malasia; siendo la región de África Occidental una de las mayores productoras (Atlas del Cacao, 2002; Centro de Comercio Internacional UNCTAD/OMC, 2001).



**Figura 2.** Zona de Cultivo del Cacao (color naranja). (Atlas del Cacao, 2002).

Las especies de cacao producidas tradicionalmente se agrupan en tres variedades importantes: Criollo, Forastero y Trinitario. La variedad Criollo tiene su origen en América Central y México; constituye un cacao de sabor suave, el cual crece en regiones de Venezuela, América Central, Nueva Guinea, las Antillas, Sri Lanka, Timor Oriental y Java. La variedad Forastero, da el mayor volumen de

granos de cacao básico cosechado y procede de regiones situadas más al sur, en el Amazonas. Los principales países que producen cacao emplean variedades derivadas de Forastero y sus híbridos, en la mayor parte de su producción. Por su parte, la variedad Trinitario es un cruce de Criollo y Forastero, procedente de las Antillas (Centro de Comercio Internacional UNCTAD/OMC, 2001).

El cacao es conocido como la materia prima para la elaboración de chocolate, absorbiendo el 90% de producción mundial de cacao. Más de 1000 millones de árboles de cacao son cultivados a través del mundo, ocupando un área de aproximadamente 7.36 millones de hectáreas. Cada año son producidos en promedio unos 3 millones de toneladas de cacao en grano; para el año 2000 la producción de semilla seca fue de aproximadamente 7 millones de toneladas, sin embargo cada año millones de esos árboles llegan a morir y deben ser reemplazados. Su producción suele realizarse en pequeñas explotaciones agrícolas o en fincas de subsistencia familiar, como por ejemplo en África Occidental o Asia Sudoriental, en donde las fincas cuentan con dimensiones inferiores a una hectárea. Sin embargo existen excepciones, y es posible encontrar grandes haciendas en Suramérica o auténticas plantaciones en Malasia (Centro de Comercio Internacional UNCTAD/OMC, 2001; Pence *et al*, 2002).

Como se puede apreciar en el cuadro 1, entre los años 2001 y 2002, los precios por tonelada de cacao orgánico fueron de US\$ 1300-1600 y US\$ 1750-2200, respectivamente. El incremento del precio del cacao orgánico durante el 2002, surgió por los conflictos sociales y militares en Costa de Marfil, el principal productor de cacao a nivel mundial, lo cual motivó un alza de los precios en la bolsa de Nueva York. Desde la creación de los mercados orgánicos y comercio justo, se ha mantenido un sobreprecio como estímulo a los productores certificados. El éxito en los mercados internacionales de cacao se encuentra en la diferenciación del cacao como producto orgánico, ya que los precios pagados por estos productos son elevados en comparación al convencional. Existe una necesidad latente de incrementar las plantaciones de cacao, ya que en los últimos años ha venido disminuyendo la cantidad de granos en las principales zonas productoras, lo que lleva a una gran competencia entre las cooperativas y la empresa privada para lograr un mayor acopio del producto y así llenar sus necesidades del mismo (Schosinsky y Büchert, 2004).

**Cuadro 1.** Comparación de precios de cacao en diferentes nichos de mercado (1999-2004).

Año	Cacao Convencional			Cacao Orgánico			
	Precio Convencional (US\$ t)	Precio Justo (US\$t)	Sobreprecio (%)	Precio Orgánico (US\$ t)	Sobreprecio (%)	Precio Justo (US\$ t)	Sobreprecio (%)
1999	1138	1750	54	1685	48	1950	71
2000	886	1750	98	1510	70	1950	120
2001	1086	1750	61	1449	33	1950	80
2002	1753	1903	9	1924	10	1953	11
2004*	1500	1700	13	1950	30	2050	37

Fuente: Schosinsky y Büchert, 2004

Con respecto al mercado internacional, el precio del cacao es notoriamente inestable. Las cosechas se ven constantemente afectadas por condiciones climáticas extremas y enfermedades, por lo tanto el

volumen de cosecha puede variar significativamente de un año a otro. El transporte físico del cacao en grano a grandes distancias hasta los principales centros de distribución y elaboración, es un asunto complejo que implica riesgos. Además el transporte a granel y el almacenaje de cacao debe realizarse con sumo cuidado y atención, debido al conjunto de normas y reglamentaciones internacionales vigentes que giran en torno a su comercialización (Centro de Comercio Internacional UNCTAD/OMC, 2001).

La colecta de germoplasma de cacao para su conservación *ex situ* representa actualmente un reto, debido a que las semillas de estas especies son altamente recalcitrantes. Diferentes secciones o cortes y semillas maduras son usadas generalmente para su propagación, pero, a causa de que éstas pierden viabilidad rápidamente, deben ser transferidas de forma rápida al campo donde son conservados los genes. Por lo tanto, es muy difícil mantener el material a plantar a salvo durante largas distancias entre el sitio de colecta y el destino de plantación. La utilización de técnicas de cultivo de tejidos, no obstante, provee una alternativa para la colecta y conservación de recursos genéticos. Gracias a estas técnicas es posible colectar y mantener microcortes y embriones en bancos de genes, tanto para conservar su germoplasma como para sostener programas de propagación o mejoramiento. En suma, la colecta de material vegetativo, estableciendo métodos adecuados para la colecta de embriones *in vitro*, podría incrementar el potencial para la conservación de germoplasma de cacao, además podría servir como un modelo a seguir para otras especies con el mismo problema de semillas recalcitrantes (Pence *et al*, 2002).

El presente trabajo tiene por objetivo principal, conocer las diferentes técnicas que han sido utilizadas para la propagación *in vitro* de cacao, así como las nuevas técnicas que están siendo empleadas en dicho cultivar, determinando los alcances, las limitaciones y los aportes de los diferentes trabajos realizados en la micropropagación de esta especie leñosa.

## MICROPROPAGACIÓN DE CACAO

Debido a la gran distribución mundial del cacao, y a los problemas fitopatológicos relacionados al cultivo, en los últimos años se ha intentado un mejoramiento de la especie. Estos acercamientos, utilizando técnicas tradicionales de fitomejoramiento, se han basado en reproducción sexual de individuos saludables de genotipos heterocigotas. Esto, aunado a que las semillas de cacao se obtienen generalmente a través de polinización abierta, ha provocado la obtención de progenies híbridas de estructura genética muy variable. Entre los métodos tradicionales de propagación vegetativa se pueden citar: el enraizamiento de estacas y los injertos; estas técnicas poseen una serie de desventajas como la demanda de labores intensivas, costos asociados, tasas de propagación frecuentemente bajas, y un patrón de crecimiento arbustivo, que se presenta frecuentemente utilizando estas técnicas y es altamente indeseable. Estos factores han llevado a diversos científicos de todo el mundo a desarrollar nuevos sistemas que superen los métodos tradicionales para reproducir plantas de *Theobroma cacao* y así poder mejorar la especie y controlar las enfermedades del cultivo. Las técnicas *in vitro* resultan una alternativa importante para la regeneración de plantas, así como para inducir variabilidad y clonar

genotipos deseables. Asimismo, las técnicas *in vitro* son la base para la ingeniería genética y facilitan enormemente el intercambio de germoplasma, necesario para programas de mejoramiento. Diversos intentos se han hecho en cuanto a la micropropagación de *Theobroma cacao*, y se ha descubierto que la especie es altamente recalcitrante para la regeneración de brotes y métodos de micropropagación basados en la organogénesis. Debido a esto se han probado diferentes técnicas, como lo son los microinjertos o la embriogénesis somática, así como el uso de diferentes tipos de explantes, como embriones sexuales, anteras y otras partes florales, entre otros (Aguilar *et al*, 1992; Gotsch, 1999; Zhijian *et al*, 1998). A continuación se discuten los trabajos más importantes en cuanto a micropropagación de cacao.

### **Embriogénesis Somática en Cacao**

A continuación se hará referencia al proceso de la embriogénesis somática de cacao, su situación actual y los estudios que se desarrollan para una mayor respuesta de la planta a esta técnica. La embriogénesis somática es una técnica que puede ayudar a mejorar la eficiencia de la propagación clonal de líneas cultivadas y silvestres de interés para los mejoradores (Pence, 1995).

#### ***Iniciación de los embriones***

Una de las etapas de la embriogénesis somática es la iniciación del embrión. Los primeros reportes de esta etapa describen la utilización de embriones cigóticos inmaduros, los cuales han sido utilizados por varios laboratorios con algunas modificaciones. Para el proceso de iniciación, los embriones cigóticos inmaduros son removidos asépticamente de los óvulos de la mazorca (previamente desinfectada) y puestos en cultivo. El medio que se utiliza para la iniciación está basado en el medio de Murashige & Skoog (1962), al cual en ocasiones se le agrega un contenido de caseína hidrolizada. Se ha probado que esta fase puede ser estimulada por la presencia de auxinas, agua de coco o peptona. También se ha utilizado el medio White (1963) y medios con presencia de citocininas y ausencia de auxinas. El cultivo de embriones cigóticos en medio líquido en lugar de medio semisólido puede también mejorar la embriogénesis directa. La fuente genética del tejido es de suma importancia para el éxito de la propagación ya que embriones cigóticos de diferente variedad mostraron diferente grado de respuesta al tratamiento. Otro factor de importancia es el estado de madurez del embrión. Los embriones de 4-10mm de longitud dieron los resultados más altos en la frecuencia de embriogénesis, comparados con estadios más tempranos o más maduros (Pence, 1995).

Los embriones somáticos pueden ser iniciados a partir de cotiledones de cigotos maduros siguiendo el protocolo de Aguilar, 1992 (ver anexo). El procedimiento se basa en tomar trozos de cotiledones maduros, que son incubados en un medio con auxinas y citocininas en condiciones de oscuridad, durante aproximadamente tres meses, mientras se forma el estado de crecimiento globular y torpedo. Luego son transferidos a un medio sin reguladores del crecimiento, bajo condiciones lumínicas, por un periodo de un mes; con la finalidad de observar su futuro desarrollo. Además de la embriogénesis

directa, los embriones de cigotos inmaduros también se han utilizado para la embriogénesis mediante la formación callos, los cuales han servido para el estudio en los cambios en el ADN nuclear, ARN y proteínas que acompañan la iniciación del embrión (Pence, 1995).

Otros tejidos del cacao no han tenido respuesta a la iniciación de embriones somáticos, aunque algunos procedimientos han tenido éxito. La embriogénesis somática se ha reportado en tejidos de hoja estimulada por altos niveles de auxinas y de citocininas. Estos embriones no crecieron de forma correcta y se desarrollaron hasta la etapa acorazonada. Un procedimiento de varios pasos para iniciar embriones a partir de nucelas y tejidos florales fue desarrollado en 1989. El procedimiento consiste en separar en medios semisólidos embriones en desarrollo, embriones maduros, y embriones germinados para utilizarlos en la regeneración de plantas. Las nucelas fueron inoculadas en un medio MS (1962) suplementado con auxinas, citocininas, PVP y otra serie de compuestos orgánicos como agua de coco, y se cultivaron en condiciones de oscuridad. Los pequeños embrioides que se producen son transferidos a otro medio complejo, el cual contiene auxinas y citocininas, así como AG<sub>3</sub> y ABA, bajo condiciones de luz. Esto permitió el desarrollo de raíces y brotes bipolares como una etapa previa a la germinación. Los embriones somáticos que se obtuvieron de pétalos de flores inmaduras se cultivaron en un medio con auxinas y citocininas. Una vez que los embriones fueron iniciados, éstos se transfirieron a un medio de desarrollo, al igual que las nucelas derivadas de los embriones. Otros investigadores también iniciaron embriones de nucelas utilizando una técnica similar en medio líquido. Este procedimiento logró un desarrollo de los embriones a sus etapas globular y torpedo, los cuales pudieron madurar como un proceso previo a la germinación, mediante la transferencia a medios líquidos que contenían un bajo nivel de sacarosa. También se ha reportado la obtención de embriones provenientes de tejidos de tegumentos internos. Para esto se utilizan medios simples con auxinas, citocininas e incubación en la oscuridad. Sin embargo, estos embriones no se desarrollaron, seguramente debido a la presencia de fenoles que se acumulan en los mismos; la adición de nitrato de plata al medio no fue suficiente para evitar este problema. Se han obtenido embriones somáticos a partir de explantes inmaduros de flores utilizando el protocolo de Lopez-Baez *et al* de 1993 (ver anexo). Un paso crítico en este protocolo consistió en remover la auxina y la citocinina después de dos o tres semanas en un medio de iniciación que contenía también aminoácidos y agua de coco. Después de seis a ocho semanas los embriones globulares fueron movidos a un tercer medio con la mitad de las sales, auxinas, ácido giberélico y otros compuestos que estimularon la maduración (Pence, 1995).

### ***Desarrollo de los embriones somáticos***

El desarrollo directo de embriones somáticos provenientes de tejidos de embriones cigóticos ocurre a través de dos procesos aparentemente distintos. El primero es un proceso de brotación, en donde el embrión cigótico presenta unas estructuras parecidas a cabellos en su superficie (ver figura 3). Estos embriones progresan a través de los estadios normales de desarrollo y al ser examinados con microscopio electrónico, se revela una superficie rugosa en el embrión durante el estado globular, la cual se alisa cuando el mismo avanza al estado acorazonado. Alternativamente se encuentra el proceso

de no brotación, el cual ocurre en los embriones que se desarrollan desde la parte interna del tejido cotiledonario. En algunos casos los embriones que no brotaron se perdieron antes del desarrollo del cotiledón. Estudios histológicos se han hecho también en cultivo de nucelas y tegumentos internos, revelando un desarrollo de células embriogénicas y proembriones a partir de los tejidos internos. Bajo las condiciones utilizadas, el desarrollo fue contrarrestado en esta etapa debido a que las células embriogénicas se vacuolizan y acumulan sustancias fenólicas (Pence, 1995).



**Figura 3.** Embriones somáticos de *Theobroma cacao* L. en maduración (Rosmin, 2004).

#### ***Conversión de embriones a plantas***

Los embriones inmaduros de cacao, ya sea somáticos o cigóticos, no tienden a germinar precozmente a plantas normales. Existe una gran cantidad de protocolos para la conversión de embriones somáticos a plántulas. La extensión radicular de los embriones somáticos fue obtenida bajando la concentración de sales MS (ver figura 4). Los últimos resultados sugieren la liberación de inhibidores de la germinación por parte del embrión al medio. Investigadores en el año 1989 utilizaron un medio con agua de coco, BAP, AIA, AG<sub>3</sub>, ABA y carbón para la germinación de embriones somáticos que habían pasado por un protocolo de tres pasos (iniciación, desarrollo y maduración) de embriogénesis de cacao. De manera similar se trabajó transfiriendo embriones maduros a un medio semisólido, especial para plantas leñosas, conteniendo fructosa como fuente de carbono. Se evaluó el efecto de la adición de CO<sub>2</sub> en el desarrollo de la germinación, y se determinó que tenía un efecto favorable (Pence, 1995).

En 1993 se trabajó transfiriendo embriones somáticos maduros a un medio con la mitad de sales MS, aminoácidos, ANA, AG<sub>3</sub>, 2iP, ABA, carbón activado y glucosa o maltosa, para obtener germinación. Los embriones de más de un centímetro fueron transferidos a un medio sin reguladores del crecimiento, en el cual se redujeron los niveles de carbono y glucosa; obteniéndose crecimiento y desarrollo foliar (Pence, 1995).



**Figura 4.** Germinación de un embrión somático de *Theobroma cacao* L., ocho meses posterior a su obtención (Rosmin, 2004).

### Preservación de germoplasma

La preservación a largo plazo de la diversidad genética del cacao y de especies silvestres relacionadas, presenta el problema de la corta vida natural de las semillas de cacao. Al contrario de muchas semillas de otras especies (las cuales pueden sobrevivir condiciones adversas y pueden mantenerse en condiciones sencillas), las semillas de cacao son sensibles a la desecación y a condiciones frías. Además son viables por pocas semanas y la gran mayoría de ellas germinan o se deterioran. Los métodos de criopreservación con nitrógeno líquido ofrecen alternativas para la preservación de material a largo plazo. Embiones cigóticos inmaduros han tenido éxito siendo criopreservados mediante congelación lenta y desecación. Se han realizado muchos estudios en esta rama de forma exitosa y la criopreservación ha proveído un equivalente genético a un banco de semillas (Pence, 1995).

### Producción de plantas de cacao a través de microinjertos de embriones somáticos

En el artículo publicado en 1992 por Aguilar *et al*, para el Programa de Mejoramiento de Cultivos tropicales del CATIE, se demostró la posibilidad de propagar cacao mediante microinjertos de embriones somáticos en plántulas. La técnica de microinjertos fue utilizada por primera vez por Murashige y colaboradores en 1972, en la obtención de cítricos libres de virus. Esta técnica requiere dos componentes *in vitro* esenciales: el primero es el patrón, es decir, la planta sobre la cual se introducirá el injerto, la cual debe tener la edad apropiada; por otro lado se requiere un embrión somático para ser injertado. Utilizando plantas de la colección de campo del CATIE, las secciones utilizadas como explantes, fueron de cotiledones de semillas de mazorcas de 5-6 meses, a partir de los cuales se generaron embriones somáticos, que luego se injertaron *in vitro* en plántulas obtenidas a partir de las semillas de mazorcas de 6 meses de edad. Para llevar a cabo el proceso de embriogénesis somática se cultivaron secciones transversales de los cotiledones en medio MS (1962), complementado con sacarosa ( $30 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ ), BA ( $3 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ ) y ácido naftalenacético ( $1 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ ). Los cultivos se mantuvieron en este medio y en cámaras de crecimiento en la oscuridad por 90 días, para luego ser transferidos a

medio MS (1962) suplementado con caseína hidrolizada ( $500 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ ) y sacarosa ( $50 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ ), e incubados con un fotoperíodo de 16 horas a una intensidad lumínica de 1700 lux. Los embriones en los estados globular (ver figura 5) y torpedo se transfirieron al medio mencionado por 30 días, período en el cual los embriones alcanzaron su total desarrollo. Para los microinjertos, solo se utilizaron los embriones completamente desarrollados (Aguilar *et al*, 1992).

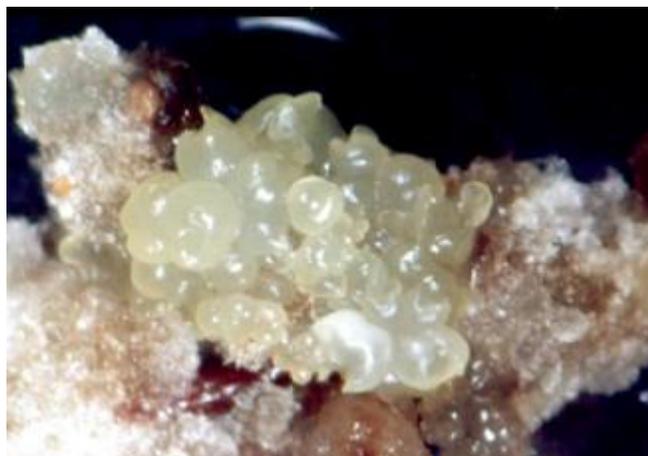


Figura 5. Embriones somáticos de *Theobroma cacao* L. en estado globular (Rosmin, 2004).

Los patrones para microinjertar se obtuvieron a partir de semillas enteras o seccionadas del genotipo IMC-67; esta variedad es autocompatible, produce un promedio de 48 almendras por mazorca y 1.4 gramos por almendra, y es tolerante a la monilia aunque susceptible a fitóftora. Se trata de un genotipo de gran calidad y muy deseado para su cultivo, se lo recomienda en propagación tradicional mediante injertos tanto para patrón como para el injerto (Echeverri, 2004). Las semillas se cultivaron en medio MS (1962) con sacarosa ( $30 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ ) y diferentes concentraciones de caseína hidrolizada, en combinación con diferentes valores de pH, aunque posteriormente se determinó que estas dos variables no produjeron diferencias significativas en la germinación. Cuando se obtuvieron plántulas, fueron cortadas transversalmente a nivel del hipocótilo, y se realizó una incisión longitudinal de aproximadamente 5 mm. En cuanto a los embriones somáticos, se removieron los cotiledones y la radícula, y se insertaron en el corte longitudinal de los patrones. Las plántulas injertadas se transfirieron a un medio de cultivo para desarrollo, utilizando diferentes concentraciones de AIB, para inducir el desarrollo de raíces adventicias (aunque esta variable de concentración tampoco produjo diferencias significativas en el desarrollo). Los injertos que produjeron hojas y raíces fueron gradualmente aclimatizados, para ser transferidos a contenedores plásticos, luego a condiciones controladas en un invernadero y finalmente las plántulas en crecimiento activo se plantaron en el campo (Aguilar *et al*, 1992).

Luego de dos meses de cultivo en la oscuridad, los embriones somáticos se diferenciaron, y fueron cultivados con luz por 3 meses adicionales. Las plántulas patrón injertadas produjeron callo en la zona del injerto dentro de la primer semana después de que se realizara el proceso de inserción de los embriones. Se observaron de dos a seis hojas nuevas en tres semanas en el 61 % de las muestras. En

total, se determinó que utilizando estas técnicas se pueden regenerar plantas completas en 10 meses. Se observó que la edad más apropiada para las plántulas patrón es de 3 semanas, es decir cuando se empiezan a desarrollar las raíces secundarias; plántulas más jóvenes producían la muerte del injerto, debido a la alta concentración de sustancias fenólicas en las mismas. Todas las variables tomadas en cuenta en este trabajo (formación de callo, desarrollo del microinjerto, formación de hojas y raíces nuevas, supervivencia *in vitro* y aclimatación) fueron superiores en plántulas de 3 semanas. Una diferencia significativa se encontró entre el uso de semillas completas y semillas seccionadas; el desarrollo del hipocótilo se vio favorecido en semillas enteras, mientras que el desarrollo y el crecimiento del epicótilo y las hojas fue mejor en semillas que perdieron sus partes laterales y su extremo distal. Bajo las condiciones mencionadas, un 83.3 % de los microinjertos mostraron desarrollo foliar, obteniéndose plantas de hasta seis hojas; un 66.7 % de estas plantas produjeron raíces nuevas y pudieron ser aclimatizadas y transferidas a suelo, donde siguieron con un crecimiento ininterrumpido. En conclusión, a pesar de que se desarrolló un método práctico para micropropagar cacao, Aguilar *et al* expresan la necesidad de investigar y determinar los factores que actúan como inhibidores de la conversión de embriones somáticos en plantas completas (Aguilar *et al*, 1992).

### Histología de Embriogénesis Somática de Tejidos Florales

En 1996, Alemanno y colaboradores realizaron un estudio desde una perspectiva histológica de la embriogénesis somática del cacao. Los explantes se cultivaron bajo dos condiciones sucesivas de medio: uno de callogénesis y otro de expresión. Las respuestas morfológicas e histológicas fueron distintas para genotipos embriogénicos y no embriogénicos. En este estudio se reportó embriogénesis somática en diferentes genotipos de cacao y se realizaron observaciones sistemáticas de los tejidos para determinar el origen somático de los embriones a partir de los explantes florales (Alemanno *et al*, 1996).

Como explantes se utilizaron brotes de flores de cacao de 6-8 mm, de árboles cultivados en invernadero. Después de cortar los brotes, la base floral del mismo, los pétalos, estaminoides, estambres y ovarios, se cultivaron en medios para callogenesis (CM, *callogenesis media*), el cual consiste en el medio MS (1962) complementado con glicina, lisina, leucina, arginina, triptófano, 2,4-D, kinetina, agua de coco y sacarosa. Los estambres y los estaminoides fusionados no fueron separados y fueron considerados como un solo explante. Después de tres semanas en el medio CM, los tejidos se transfirieron a un medio de expresión libre de reguladores del crecimiento (EM, *expression media*) complementado con glicina, lisina, leucina, arginina, triptófano, agua de coco y sacarosa. En cinco genotipos pertenecientes a tres grupos de árboles de cacao, se evaluó la respuesta de la embriogénesis somática. Las observaciones de tejidos se llevaron a cabo en dos genotipos embriogénicos y dos no embriogénicos. Los explantes, después de un previo tratamiento, fueron deshidratados y observados (Alemanno *et al*, 1996).

La efectividad de la embriogénesis somática fue demostrada en varios genotipos de cacao, además la variabilidad genotípica con respecto a la capacidad embriogénica. Otro de los aspectos importantes

de los resultados obtenidos en esta investigación fue, que de todos los explantes florales cultivados, solo los estaminoides y los filamentos del estambre fueron capaces de producir embriones somáticos. El proceso para la formación de embriones somáticos fue seguido por la formación de un pequeño callo interno nodular, un grupo de células meristemáticas que progresivamente se volvieron embriogénicas; de este grupo de células meristemáticas, ocurrió una fragmentación a la hora de formarse los embriones somáticos. El tipo celular que estaba en el origen de los embriones somáticos, fue diferente al que generalmente se describe en la literatura, la cual indica un origen unicelular; en el artículo fue demostrado sin ninguna ambigüedad el origen multicelular (Alemanno *et al*, 1996).

Los embriones que se forman de la división de una célula aislada, poseen un engrosamiento y una modificación de la pared celular sumado a una gelificación de la lámina media. Durante el estudio se observó que en la ontogenia del embrión somático, las células nunca muestran características de células embriogénicas. Debido a esta observación, a la rapidez de todo el proceso y a la fragmentación del grupo de células embriogénicas, se asume un origen multicelular. En el estudio se consideró el hecho de que el embrión fue formado por un grupo de células, las cuales se obtuvieron a partir de una sola célula meristemática. La única diferencia entre el cacao y otras especies radica en que de las otras especies se obtiene un embrión a partir de un grupo de células meristemáticas, mientras que en el cacao, de un grupo de células meristemáticas se pueden obtener varios embriones somáticos (Alemanno *et al*, 1996).

La viabilidad de los brotes adventicios como fuente de embriones somáticos también fue probada. Este proceso es otra fuente de embriones somáticos a partir de embriones preexistentes. Para tejidos de cacao, bajo las condiciones de cultivo empleadas, se observaron pocas células mostrando características de células embriogénicas. Este evento puede representar los primeros pasos de una ruta de origen unicelular (Alemanno *et al*, 1996).

El conocimiento histológico sobre la ontogenia de embriones somáticos de cacao, proporciona información importante para implementar la embriogénesis somática en este cultivo. Se ha visto que las células meristemáticas y embriogénicas son reducidas en número y que frecuentemente son rodeadas por grandes masas de células vacuolizadas, las cuales acumulan compuestos fenólicos. En base a todos estos estudios realizados debería ser posible encontrar las condiciones adecuadas para que estas células de interés puedan proliferar, y que la embriogénesis somática de una célula embriogénica pueda ser favorecida (Alemanno *et al*, 1996).

### **Embriogénesis somática y regeneración de plantas a partir de explantes florales utilizando *Tidiazuron***

En el artículo "*Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration From Floral Explants of Cacao using Tidiazuron*", de Zhijian y colaboradores (1998), se reporta un procedimiento para la embriogénesis somática y la regeneración de plantas a partir de tejidos florales de varios genotipos de cacao, aplicando *tidiazuron*, un derivado de la fenilurea que posee actividad reguladora similar a las citocininas, que se utiliza tanto por su actividad hormonal como por su efecto herbicida. Dicho estudio

se fundamenta en que investigaciones anteriores de embriogénesis somática en cacao utilizaron usualmente el medio MS (1962) como la principal fuente de nutrientes para los explantes; sin embargo, dentro de los resultados obtenidos a partir del estudio, se indica que el cultivo de varios tejidos de cacao (incluyendo hojas inmaduras, brotes de ápices, secciones de embriones cigóticos y cotiledones provenientes de embriones tanto cigóticos como somáticos) en medio MS (1962) frecuentemente resulta en una reducción del crecimiento, rápida senescencia y eventualmente necrosis de los tejidos (Wood, 2004; Zhijian *et al*, 1998).

El material vegetal utilizado en este trabajo consistió en estaminodios (ver figura 6), los cuales fueron obtenidos de la parte superior de brotes florales a partir de árboles mantenidos en invernadero; el crecimiento de callos fue inducido mediante el cultivo de los explantes de estaminodios en medio para el crecimiento primario de callos (PCG, *primary callus growth*) el cual contenía sales básicas, suplementado con glutamina, myo-inositol, tiamina-HCL, ácido nicotínico, glicina, glucosa, Phytigel y *tidiazuron* (1-fenil-3-(1,2,3-tiadiazol-5-il)urea, según IUPAC) a varias concentraciones. El medio PCG fue utilizado para evaluar la capacidad de crecimiento de callos y la producción de embriones somáticos. Después de permanecer 14 días en este medio, los callos embriogénicos fueron subcultivados en un medio para el crecimiento secundario de callos (SCG, *secondary callus growth*) junto con las sales básicas del medio McCown (utilizado para el cultivo de plantas leñosas), solución de vitaminas de Gamborg, glucosa, 2,4-D, kinetina, agua de coco y Phytigel. Posteriormente, con el fin de lograr la producción de embriones somáticos, los callos obtenidos fueron cultivados en medio para el desarrollo de embriones; dicho medio estaba compuesto de las mismas sales básicas del medio PCG, myo-inositol, tiamina-HCL, ácido nicotínico, glicina, sacarosa, glucosa y Phytigel (Wood, 2004; Zhijian *et al*, 1998).



Figura 6. Estaminodio de *Theobroma cacao* L. (Rosmin, 2004).

En relación con la iniciación de callos desde explantes florales, se logró determinar el efecto del *tidiazuron* sobre la estimulación del crecimiento celular y la inducción de callos a partir de los estaminodios cultivados en medio PCG. El efecto del *tidiazuron* fue determinado mediante la evaluación del incremento en peso fresco de los estaminodios cultivados, esto después de 14 días de la iniciación del cultivo. Los explantes de estaminodios cultivados en medio PCG en ausencia de *tidiazuron* presentaron un reducido aumento en su tamaño y un limitado desarrollo de callos alrededor del sitio de

corte. Los explantes de estaminodios cultivados en medio PCG conteniendo *tidiazuron*, incrementaron significativamente su peso fresco y además presentaron una mayor producción de callos. El cultivo de estaminodios en el medio con una concentración de 22.7 nM de *tidiazuron* presentó la mayor velocidad de proliferación de callos; así como el mayor incremento en el peso fresco de los mismos, el cual ocasionalmente superó en 10 veces el peso fresco de los explantes de estaminodios mantenidos en medio de cultivo libre de *tidiazuron* (Zhijian *et al*, 1998).

En cuanto a la inducción de embriogénesis somática, dentro de los resultados del estudio, se obtuvo que la concentración de *tidiazuron* en los medios PCG afectó significativamente el porcentaje de explantes que finalmente desarrollaron embriones somáticos; los estaminodios cultivados en medios libres de *tidiazuron* presentaron como respuesta una producción de entre 3 y 6 embriones somáticos por explante. La concentración de *tidiazuron* a la que los explantes presentaron la mejor respuesta, y por consiguiente un mayor número de embriones somáticos producidos por explante, fue 22.7 nM, con un promedio de 40 embriones por explante. Por su parte las concentraciones de *tidiazuron*, tanto menores como mayores a 22.7 nM, no presentaron una respuesta positiva en cuanto al crecimiento de callos y la producción de embriones somáticos, esto en comparación con la respuesta obtenida en dicha concentración. Sin embargo, anteriormente a este estudio, no existen pruebas de la capacidad del *tidiazuron* para estimular la embriogénesis somática en cacao (Zhijian *et al*, 1998).

De acuerdo a los resultados de este estudio, los investigadores establecen que la concentración de 22.7 nM o 5 µg/l de *tidiazuron* fue suficiente para inducir una óptima producción de embriones somáticos a partir de explantes de estaminodios de varios genotipos de cacao. Además, mencionan que el medio DKW posee un significativo aumento en la concentración de calcio, sulfuro y magnesio, en comparación con el medio MS (1962); estos elementos son esenciales para la diferenciación celular y la embriogénesis somática. Por lo tanto, la utilización del medio DKW estimula un rápido crecimiento de callos embriogénicos (ver figura 7), una efectiva inducción y desarrollo de embriones somáticos y el logro del crecimiento de plantas de cacao derivadas de dichos embriones (Zhijian *et al*, 1998).

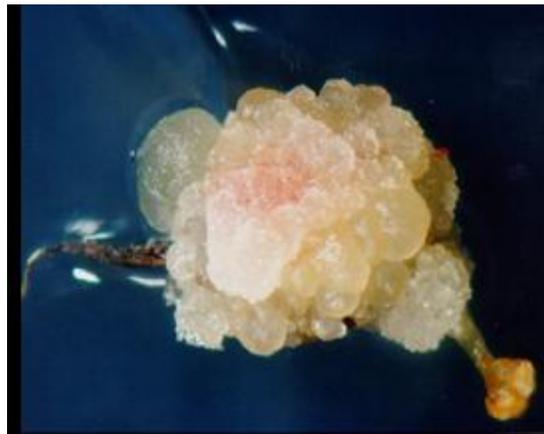


Figura 7. Callo de *Theobroma cacao* L. obtenido *in vitro* (Rosmin, 2004).

Subsecuentes estudios demostraron que el *tidiazuron* posee una fuerte actividad como citocinina posiblemente por su capacidad para estimular la biosíntesis de estos reguladores del crecimiento, o bien alterar el metabolismo de las citocininas endógenas. El *tidiazuron* puede ocasionar un incremento en la producción de etileno endógeno, por lo que esta sustancia puede ser utilizada para la inducción de embriogénesis somática, formación de brotes adventicios y proliferación de brotes axilares de un gran número de especies, incluyendo especies leñosas. Estudios recientes revelan que el tratamiento con *tidiazuron* puede resultar en un significativo cambio en la acumulación de minerales dentro de los tejidos incluyendo manganeso, hierro, cobre, calcio, magnesio y potasio, y en el incremento de los niveles de un gran número de compuestos biológicos envueltos en la respuesta de las plantas a condiciones de estrés (Zhijian *et al*, 1998).

Como conclusiones al estudio se encuentra que el uso de *tidiazuron* y glucosa como recursos de citocinina y carbono, respectivamente, fue esencial para la iniciación de callos embriogénicos y la subsiguiente producción de embriones somáticos en el cacao. Así, la utilización de *tidiazuron* a una concentración de 22.7 nM en medio para el desarrollo primario de callos es una forma óptima para la estimulación de embriogénesis somática en cacao. El reducido rango de efectividad de las concentraciones de *tidiazuron* para la embriogénesis somática puede ser un indicio de la alta sensibilidad de los tejidos de cacao a elevados niveles de etileno (que son inducidos por el *tidiazuron*). Por otra parte se determinó que la velocidad de proliferación de callos en la presencia de *tidiazuron* fue positivamente correlacionada con la frecuencia en la producción de embriones somáticos (Zhijian *et al*, 1998).

### **Comparación entre embriogénesis cigótica y embriogénesis somática a partir de partes florales**

El cultivo de embriones cigóticos, o embriogénesis cigótica, es una técnica que consiste en la separación de los embriones cigóticos de los tejidos maternos y de reserva, para luego cultivarlos asépticamente en un medio de cultivo. Existen varias diferencias entre este tipo de embriogénesis y la somática, ya que los cigotos son intrínsecamente embriogénicos, a diferencia del caso de la embriogénesis somática, donde se requiere la inducción de esta característica en células que normalmente no son embriogénicas. Otra importante diferencia entre los embriones cigóticos y somáticos son sus sistemas de iniciación, ya que los primeros se forman a partir de la unión de gametos (la doble fecundación), y originan plantas híbridas por recombinación meiótica de sus genes. Los embriones somáticos, en cambio, se originan de células vegetativas de un único individuo, y se transforman en plantas que son duplicados genéticos (clones) de la planta madre. Sin embargo, ambos tipos de embriones comparten una similar ontogenia, ya que los dos pasan por los mismos estados de desarrollo (globular, corazón, torpedo, cotiledonar) (Dodeman *et al*, 1997; Montoya, 1991).

En el trabajo de Alemanno *et al* (1997), se realizó una comparación entre la embriogénesis somática y la cigótica, con el fin de determinar los factores que pudieran estar limitando las bajas tasas de germinación en el cultivo de embriones somáticos. Se estudió la embriogénesis cigótica de

*Theobroma cacao* tomando en cuenta parámetros morfológicos, fisiológicos e histológicos, y se diseñaron experimentos para mejorar el proceso de embriogénesis somática (Alemanno *et al*, 1997).

Para la embriogénesis cigótica, se utilizaron mazorcas resultantes de cruces dirigidos entre las variedades IMC 67, al igual que en los trabajos de Aguilar *et al* (1992) discutidos anteriormente, y UF 613, una variedad autoincompatible, con una producción promedio de 40 almendras por mazorca, 18 mazorcas por kg de cacao seco y 2.3 kg de cacao por árbol/año. El genotipo UF 613 es tolerante a monilia, resistente a fitóftora y es muy recomendado para su cultivo (Echeverri, 2004). Para la embriogénesis somática, se utilizaron estambres y estaminoides fusionados, los cuales se cultivaron en un medio para calogénesis que consistió en medio de cultivo MS (1962) suplementado con glicina, lisina, leucina, arginina, triptófano, 2,4-D, kinetina, agua de coco y sacarosa. Luego de tres semanas de permanecer en este medio, los tejidos se transfirieron a un medio de expresión, similar al de calogénesis pero libre de hormonas. Para la maduración de los embriones, se llevaron a cabo diferentes pruebas para desarrollar un medio de maduración propio. Se estableció que existe una importante relación entre la presencia de ABA en el medio de maduración y la síntesis de proteínas de reserva en las células de los embriones somáticos. Este factor, combinado con un alto contenido de sacarosa permitió una mejoría significativa en las tasas de germinación y de conversión de los embriones (Alemanno *et al*, 1997).

Los resultados de los análisis de peso, longitud, contenido de agua y potencial osmótico, así como de las observaciones histológicas de los embriones, determinaron que en los embriones somáticos (en comparación con sus equivalentes cigóticos) no hubo una debida etapa de crecimiento y acumulación de sustancias de reserva. Con el fin de solucionar este problema, se introdujo una fase de crecimiento en el proceso de embriogénesis somática. Se obtuvieron resultados favorables en términos de crecimiento al tomar los embriones somáticos formados en el medio de expresión y subcultivarlos en el mismo medio por tres semanas adicionales. Un total de 30 embriones somáticos, todos midiendo menos de 5 mm, llegaron a una medida de  $8.2 \pm 1.7$  mm al final de este subcultivo. Debido a esto, el medio de expresión fue utilizado como un medio de crecimiento por tres semanas en los subsiguientes experimentos. Adicionalmente a la mejoría observada utilizando una fase de crecimiento, en comparación con la embriogénesis somática común y corriente, se concluyó que si la fase de maduración se realiza en el medio de maduración desarrollado (con  $80 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$  de sacarosa y  $10 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$  de ABA) se obtiene una mayor acumulación de reservas y una ligera deshidratación (lo cual es signo de desarrollo, ya que los embriones maduros se encuentran en estado deshidratado). Aunque se observaron frecuentes anomalías morfológicas en los embriones obtenidos, los autores sugieren experimentar con los tipos y concentraciones de auxinas en el medio de cultivo para solucionar este problema. En conclusión, los resultados obtenidos en este trabajo son un acercamiento a la embriogénesis somática exitosa del cacao, pero aún es insatisfactoria si se desea utilizarla rutinariamente (Alemanno *et al*, 1997; Dodeman *et al*, 1997).

## CONCLUSIONES

Debido a la serie de inconvenientes que presenta este cultivar en cuanto a su preservación, así como las deficiencias en cuanto su propagación por métodos tradicionales y los problemas fitopatológicos; se encuentra latente la necesidad de aplicar un sistema eficiente, tanto para la conservación de germoplasma como para los programas de mejoramiento, en donde las técnicas de cultivo *in vitro* juegan un rol primordial.

La micropropagación de cacao ha sido documentada de manera exitosa, y se ha enfocado principalmente a la embriogénesis somática. También se ha reportado propagación *in vitro* exitosa utilizando embriogénesis cigótica, aunque la utilidad de esta técnica es muy limitada, ya que se necesita establecer protocolos de multiplicación clonal. Los protocolos desarrollados en los últimos años, si bien han logrado superar problemas anteriores y lograr la iniciación de embriogénesis somática a partir de tejidos que previamente no respondían al cultivo *in vitro*, involucran el uso de varios medios sucesivos, lo cual conlleva a largos períodos de cultivo. El hecho de que se requiera tanto tiempo para regenerar plantas de manera clonal, aunado al costo elevado que representa, hace que los protocolos desarrollados no puedan ser aplicados con fines comerciales de propagación masiva. Con el fin de poder encontrar un protocolo eficiente para propagar masivamente clones élites seleccionados de cacao, es necesario continuar investigando sobre la embriogénesis somática primaria y secundaria de la especie, con el fin de comprender mejor estos procesos y así poder determinar las condiciones para el óptimo desarrollo del material vegetal.

## BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar, M.; Villalobos, V.; Vasquez, N. 1992. Production of cocoa plants (*Theobroma cacao* L.) via micrografting of somatic embryos. In Vitro Cellular and Developmental Biology. Enero, 1992. pp 15-19.
- Alemanno, L.; Berthouly, M.; Michaux-Ferriere, N. 1996. Histology of somatic embryogenesis from floral tissues cocoa. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. No. 46. pp 187-194.
- Alemanno, L.; Berthouly, M.; Michaux-Ferriere, N. 1997. A comparison between *Theobroma cacao* L. zygotic embryogenesis and somatic embryogenesis from floral explants. In vitro Cellular and Developmental Biology. Plant 33. Jul-Sept, 1997. pp 163-172.
- Atlas del Cacao, 2002. Biología del Cacao. Foundation of the German Cocoa and Chocolate Industry. Hamburg/ Bonn, Germany.
- Centro de Comercio Internacional UNCTAD/OMC, 2001. Cacao: Guía de prácticas comerciales. Ginebra, Suiza. 188 p.
- Compañía Nacional de Chocolates (CNC), 1988. Manual para el Cultivo del Cacao. 3ª ed. Editorial EDINALCO Ltda. Colombia. 140 p.
- Dodeman, V.; Ducreux, G.; Kreis, M. 1997. Zygotic embryogenesis versus somatic embryogenesis. Journal of Experimental Botany. Vol. 48, No. 313, Agosto 1997. pp. 1493–1509,
- Echeverri, J. 2004. Propuesta para la siembra de 10 hectáreas de cacao. Proyecto Cacao; Finca La Amistad, Costa Rica. 31 pp.
- Gotsch, N. 1999. Future prospects in cocoa biotechnology. AgBiotechNet, vol. 1. Febrero, 1999. 4 pp.
- Köhler, F. 2001. Köhlers Medizinal-Pflanzen in naturgetreuen Abbildungen und kurz erläuterndem Texte. <http://caliban.mpiz-koeln.mpg.de/~stueber/koehler/>. Revisado: Agosto, 29, 2004.

- Montoya, L. 1991. Cultivo de tejidos vegetales. Universidad Nacional de Colombia. 77 pp.
- Pence, V. 1995. Somatic Embryogenesis in Cacao (*Theobroma cacao*). Biotechnology in Agriculture and Forestry, vol. 30. Somatic Embryogenesis and Synthetic Seed I. Springer-Verlag. Berlin, Alemania. pp 455-467.
- Pence, V.; Sandoval, J.; Villalobos, V.; Engelmann, F. 2002. *In Vitro* Collecting Techniques for germplasm conservation. IPGRI Technical Bulletin No. 7. Rome, Italy. pp 49-51.
- Rosmin, K. 2004. Premier Technology Development and Service Center for Cocoa Biotechnology. Universidad de Malasia. <http://www.koko.gov.my/CocoaBioTech/CCBR3.html>. Revisado: Agosto, 29, 2004.
- Schosinsky, E.; Büchert, J. 2004. Resumen de estándares para el procesamiento de cacao. PROARCA, Junio 2004.
- Wood, A. 2004. Thidiazuron Data Sheet. <http://www.hclrss.demon.co.uk/thidiazuron.html>. Revisado: Agosto, 29, 2004.
- Zhijian, L.; Abdoulaye, T.; Maximova, S.; Guiltinan, M. 1998. Somatic embryogenesis and plant regeneration from floral explants of cacao (*Theobroma cacao* L.) using thidiazuron. *In Vitro Cellular and Developmental Biology*. Plant 34. Oct-Dic, 1998. pp 293-299.

## ANEXO 1

### Protocolos para micropropagación de *Theobroma cacao* (tomados de Pence, 1995)

*Iniciación de embriones somáticos a partir de embriones cigóticos inmaduros, según Pence et al, 1979, 1980.*

1. Esterilizar la superficie de un fruto de cacao inmaduro, aproximadamente 110-120 días después de la fertilización, asperjando con etanol al 70%.
2. Bajo condiciones asépticas, seccionar embriones pequeños de color blanco y transferirlos directamente al medio de cultivo.
3. Cultivar los embriones en un medio de cultivo semisólido conteniendo las sales y compuestos orgánicos MS, 1 g/L de hidrolizado de caseína, 1.5 mg/L de ANA, 10% de agua de coco, 3% de sacarosa, 0.2% de Phytigel o 1% de agar, con un fotoperíodo de 16 horas de luz y 8 de oscuridad, aproximadamente a 26 °C.
4. A medida que los tejidos desarrollen embriones somáticos, transferirlos a un medio de cultivo carente de auxinas y agua de coco, para su proliferación y mantenimiento.

*Iniciación de embriones somáticos a partir de embriones cigóticos maduros, según Aguilar et al, 1992.*

1. Esterilizar la superficie de un fruto de cacao maduro mediante lavados con detergente, asperjando etanol al 70% y flameando.
2. Bajo condiciones asépticas, separar los embriones y hacer cortes transversales de los cotiledones.
3. Cultivar los explantes en un medio semisólido conteniendo las sales y compuestos orgánicos MS, 3% de sacarosa, 3 mg/L de BAP, 1 mg/L de ANA y 0.8% de agar, en la oscuridad por 90 días.
4. Transferir los embriones en los estados globular y torpedo que se formen, a un medio conteniendo las sales y compuestos orgánicos MS, 0.5 g/L de hidrolizado de caseína y 5% de sacarosa, y cultivar por 30 días a un fotoperíodo de 16 horas luz, para continuar el desarrollo.

*Iniciación de embriones somáticos a partir de tejido nuclear, según Söndahl et al, 1989 y Figueira y Janick, 1993.*

1. Esterilizar la superficie de una mazorca de cacao inmadura y retirar asépticamente los óvulos, de aproximadamente 12 mm de longitud.
2. Descartar el extremo basal del óvulo y utilizar el resto del óvulo como explante.

3. Cultivar las secciones de óvulo en medio líquido conteniendo la mitad de la concentración de sales MS, la concentración total de los compuestos orgánicos MS, 0.5 g/L de extracto de malta, 0.5 g/L de caseína hidrolizada, 0.2% de PVP 10 000, 0.9 mg/L de 2,4-D, 0.1 mg/L de 2iP, 10% de agua de coco y 4% de sacarosa, en un agitador giratorio en la oscuridad por 30 días.
4. Transferir los cultivos a medio fresco y cultivar por 30 días más.
5. Transferir los cultivos a medio semisólido conteniendo la mitad de la concentración de sales MS, la concentración total de los compuestos orgánicos MS, 0.1 g/L de extracto de malta, 0.2% de PVP 10 000, 0.5 mg/L de 2iP, 10% de agua de coco, 4% de sacarosa y 0.8% de agar, en la luz por 60 días.
6. Transferir los cultivos a un medio de mantenimiento semisólido con la concentración de sales MS, la concentración total de los compuestos orgánicos MS, 1 g/L de hidrolizado de caseína, 3% de sacarosa y 0.8% de agar.

*Maduración y Conversión de Embriones Somáticos Maduros a Plantas, según López-Baez et al, 1993.*

1. Transferir embriones globulares a medio de maduración, conteniendo la mitad de la concentración de sales MS, 0.4 mg/L de L-leucina, 0.4 mg/L de L-lisina, 0.2 mg/L de L-tryptófano, 0.4 mg/L de L-arginina, 0.05 mg/L de AIA, 0.05 mg/L de AIB, 0.02 mg/L de AG3, 0.5 mg/L de sulfato de adenina, 40 g/L de maltosa, 2 g/L de gelrite. Incubar en un ciclo 12/12 h luz/oscuridad a 26 °C por 4-5 semanas.
2. Transferir los embriones maduros a medio de germinación, conteniendo la mitad de la concentración de sales MS, la misma cantidad de aminoácidos anterior, 0.01 mg/L de ANA, 0.02 mg/L de GA3, 0.2 mg/L de 2-iP, 1 mg/L de ABA, 0.5 mg/L de sulfato de adenina, 1 g/L de carbón activado, 80 g/L de maltosa o 40g/L de glucosa, y 3 g/L de gelrite. Mantener los cultivos en por 4-5 semanas en un ciclo de 12/12 h luz/oscuridad, con un ciclo de temperatura de 31/26 °C.
3. Transferir los embriones con hipocótilos superiores a 1 cm de longitud, a un medio conteniendo la mitad de la concentración de sales MS, la misma cantidad de aminoácidos anterior, 0.15 g/L de carbón activado, 5 g/L de glucosa y 3 g/L de gelrite en un contenedor más grande, como un frasco de comida de bebé, para el crecimiento y desarrollo foliar. Mantener los cultivos por 6-8 semanas bajo el mismo régimen de luz y temperatura.
4. Cuando las plantas cuentan con 2-3 hojas, transferirlas a una mezcla 2/2/1 de vermiculita/arena/perlite, bajo las mismas condiciones de luz y temperatura. Regar con un cuarto de la concentración de sales MS, sin azúcar, y mantener la humedad relativa al 90-95%.
5. Después de 4-5 semanas, transferir las plantas al suelo.

*Iniciación de Embriones Somáticos a partir de Tejido de Embrión Criopreservado, según Pence, 1991.*

1. Seccionar asépticamente pequeños embriones cigóticos de color blanco de 110-120 días.
2. Crioproteger los embriones directamente o precultivarlos en un medio de sales y compuestos orgánicos MS, 1 g/L de caseína hidrolizada, 10% de agua de coco, 3% de sacarosa, 0.2% de Phytigel por 1-4 semanas.
3. Para la crioprotección, incubar los embriones en un medio líquido de sales y compuestos orgánicos MS, 3% de sacarosa, y después de un periodo de 45 minutos agregar, en 3 alícuotas, un volumen equivalente de sales y compuestos orgánicos MS, con 1M sacarosa y 20% de DMSO (proporcionando un volumen final de 0.5 M de sacarosa y 10% de DMSO).
4. Enfriar los embriones por un periodo adicional de 30 min y transferirlos a crioviales de 2 ml.
5. Congelar a una tasa de 0.4 °C/min bajo -35 °C y rápidamente transferir los viales a nitrógeno líquido.
6. Para descongelar, remover los viales del nitrógeno líquido y transferirlos inmediatamente a baño maría a 40 °C por 2 min.
7. Transferir los embriones descongelados a un medio de recuperación de sales y compuestos orgánicos MS, 1 mg/L de caseína hidrolizada, 10% de agua de coco, 3 mg/L de ANA, 0.05% de carbón, 0.2 % de Phytigel para iniciar el crecimiento de las células sobrevivientes.