

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA DE LA SELVA

FACULTAD DE AGRONOMÍA



TESIS

**“INDUCCIÓN DE CALLOS EMBRIOGÉNICOS EN
ESTAMINODIOS DE CACAO (*Theobroma cacao* L.) DE LOS
CLONES ICS-1 e IMC-67”**

Para obtener el título profesional de

INGENIERO AGRÓNOMO

Elaborado por

JIMMY SALDAÑA RUIZ

TINGO MARÍA – PERÚ

2017



UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA DE LA SELVA
Tingo María
FACULTAD DE AGRONOMÍA



Av. Universitaria Km 1.5 Telf. (062) 562341 (062) 561136 Fax. (062) 561156 E.mail: fagro@unas.edu.pe

"Año del buen servicio al ciudadano"

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

N° 021-2017-FA-UNAS

BACHILLER : SALDAÑA RUÍZ, Jimmy

TÍTULO : "INDUCCIÓN DE CALLOS EMBRIOGÉNICOS EN ESTAMINODIOS DE CACAO (*Theobroma cacao* L.) DE LOS CLONES ICS-1 E IMC-67"

JURADO CALIFICADOR

PRESIDENTE : Ing. M.Sc. DAVID GUARDA SOTELO
VOCAL : Ing. M.Sc. LUIS FERNANDO GARCÍA CARRIÓN
VOCAL : Ing. JAIME JOSEPH CHÁVEZ MATIAS

ASESOR : Blgo. M.Sc. JULIO ALFONSO CHIA WONG

FECHA DE SUSTENTACIÓN : 13 DE OCTUBRE DE 2017

HORA DE SUSTENTACIÓN : 11:00 A.M.

LUGAR DE SUSTENTACIÓN : SALA DE AUDIOVISUALES DE LA FACULTAD DE AGRONOMÍA

CALIFICATIVO : BUENO

RESULTADO : APROBADO

OBSERVACIONES A LA TESIS : EN HOJA ADJUNTA

TINGO MARÍA, 13 DE OCTUBRE DE 2017.

ING. M.Sc. DAVID GUARDA SOTELO
PRESIDENTE



Ing. M.Sc. LUIS FERNANDO GARCÍA CARRIÓN
VOCAL

Ing. JAIME JOSEPH CHÁVEZ MATIAS
VOCAL

Blgo. M.Sc. JULIO ALFONSO CHIA WONG
ASESOR

DEDICATORIA

A Dios por darme fuerza y sabiduría para enfrentar obstáculos y seguir adelante aun en los momentos más difíciles.

A mis padres Lilia Ruíz Alvarado y Raúl Saldaña Velásquez por los consejos y valores que hicieron de mí una persona de bien.

A mis hermanos Charles y Percy, a mi abuela Concesa, a tío Reicer y a todos mis familiares que contribuyeron a formarme una persona con una carrera profesional.

AGRADECIMIENTO

- A la Universidad Nacional Agraria de la Selva, en especial a los docentes de la Facultad de Agronomía que contribuyeron a mi formación profesional.
- Al laboratorio de biotecnología de la Universidad Nacional Agraria de la Selva.
- Al Blgo. M. Sc. Julio Alfonso Chía Wong, por su valiosa orientación y supervisión de la tesis como asesor en el trabajo de investigación.
- Al Ing. M. Sc. Walter Panduro Calderón, por su valiosa orientación, colaboración y supervisión de la tesis como co-asesor en el trabajo de investigación.
- A los miembros del jurado: Ing. M. Sc. David Guarda Sotelo, Ing. M. Sc. Luis Fernando García Carrión y al Ing. Jaime Josseph Chávez Matías por su asesoramiento en la redacción de la presente tesis.
- A Katia del Castillo del Castillo mi compañera incondicional, que siempre estuvo apoyándome para lograr mi objetivo.
- A todas aquellas personas que directa o indirectamente hicieron posible la culminación del presente trabajo.

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
I. INTRODUCCIÓN.....	14
II. REVISIÓN DE LITERATURA	16
2.1. Aspectos generales del cacao.....	16
2.1.1. Origen.....	16
2.1.2. Clasificación taxonómica	16
2.1.3. Distribución geográfica del cultivo de cacao	16
2.1.4. Descripción botánica	17
2.1.5. Morfología de la flor	17
2.2. Biotecnología	20
2.2.1. El cultivo de tejidos	20
2.2.2. Aplicaciones de la embriogénesis somática.....	25
2.2.3. Células pro embriogénicas	25
2.2.4. Obtención de embriones somáticos	26
2.2.5. Factores que influyen en la adquisición de capacidad embriogénica	26
2.3. Ensayos en embriogénesis somática	29
2.3.1. Otros ensayos realizados en tingo maría.....	31
III. MATERIALES Y MÉTODOS	32
3.1. Ubicación del campo experimental.....	32
3.2. Materiales	32
3.2.1. Material vegetal	32
3.2.2. Equipos	33

3.2.3. Reactivos.....	33
3.2.4. Materiales e insumos	33
3.3. Factores en estudio.....	34
3.3.1. Factor a: reguladores hormonales	34
3.3.2. Factor b: dosis de malta merck®	34
3.4. Tratamiento en estudio.....	34
3.5. Diseño experimental.....	35
3.6. Ejecución del experimento	36
3.6.1. Obtención del material vegetativo	36
3.6.2. Preparación del medio de cultivo	37
3.6.3. Descripción de los ensayos experimentos de inducción de callos	39
3.7. Características evaluadas	40
3.7.1. Tamaños de callos embriogénicos.....	40
3.7.2. Tiempo de aparición callos embriogénicos	40
3.7.3. Número de estructuras pro embriogénicas	40
3.7.4. Tiempo de aparición de embriones somáticos	40
3.7.5. Contaminación.....	40
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	41
4.1. Tamaño de callos.....	41
4.2. Tiempo de aparición de callos embriogénicos	54
4.3. Número de estructuras pro embriogénicas.....	65
4.4. Tiempo de aparición de embriones somáticos	78
4.5. Contaminación	91

V.	CONCLUSIONES.....	94
VI.	RECOMENDACIONES.....	95
VII.	RESUMEN	96
	ABSTRACT	97
VIII.	BIBLIOGRAFÍA	98
IX.	ANEXO.....	107

ÍNDICE DE CUADROS

	Pág.
1. Grupos de cacao y su distribución geográfica	17
2. Características importantes de los clones estudiados.	32
3. Descripción de los tratamientos en estudio.....	35
4. Medio con sales y vitaminas DKW.....	38
5. Medio NT1 (Laboratorio de la Nestlé) formulado con sales y vitaminas DKW.....	39
6. Resumen del análisis de variancia para el tamaño de callos en los clones ICS-1 e IMC-67.	41
7. Prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) para tratamientos en el tamaño de callo del clon ICS-1.....	42
8. Prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) para tratamientos en el tamaño de callo del IMC-67.	43
9. Prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) para los efectos principales (A y B), para tratamientos en el tamaño de callo del ensayo I (ICS-1).....	45
10. Prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) para los efectos principales (A y B), para tratamientos en el tamaño de callo del ensayo II (IMC-67).	45
11. Análisis de variancia para los efectos simples para el factor A (reguladores hormonales) y factor B (malta) en el tamaño de callos del ensayo I y ensayo II.....	46
12. Prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) para los efectos simples del Factor A en b, en el tamaño de callos en el clon ICS-1.....	47
13. Prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) para los efectos simples del Factor A en b,	

en el tamaño de callos en el clon IMC-67.	48
14. Prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) para los efectos simples del Factor B en a, en el tamaño de callos en el clon ICS-1.....	51
15. Prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) para los efectos simples del Factor B en a, en el tamaño de callos en el clon IMC-67.	52
16. Análisis de variancia para el tiempo de formación de callos en cada ensayo de inducción.	54
17. Prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) para tratamientos en el tiempo de formación de callo del ensayo I (ICS-1).....	55
18. Prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) para tratamientos en el tiempo de formación de callos del ensayo II (IMC-67).....	56
19. Prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) para los efectos principales (A y B), en el tiempo de formación de callo del ensayo I (ICS-1).....	57
20. Prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) para los efectos principales (A y B), en el tiempo de formación de callo del ensayo II (IMC-67).	58
21. Análisis de variancia para los efectos simples para el factor A (reguladores hormonales) y factor B (malta) en el Tiempo de formación de callos del ensayo I y ensayo II.....	58
22. Prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) para los efectos simples (A en b_1 y A en b_2), en el tiempo de formación de callos del ensayo I (ICS-1) y ensayo II (IMC-67).	59
23. Prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) para los efectos simples del Factor B en a, en el tiempo de formación de callos en el clon ICS-I.	62
24. Prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) para los efectos simples del Factor B en a,	

en el tiempo de formación de callos en el clon IMC-67.....	63
25. Análisis de variancia para el numero de estructuras proembriogénicas del ensayo I (ICS-I) y ensayo II (IMC-67).....	65
26. Prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) para el número de estructuras proembriogénicas del ensayo I (ICS-1).....	66
27. Prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) para el número de estructuras proembriogénicas en el ensayo II (IMC-67).	67
28. Prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) para los efectos principales (A y B), para el número de estructuras del ensayo I (ICS-1).	68
29. Prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) para los efectos principales (A y B), para el número de estructuras del ensayo II (IMC-67).....	68
30. Análisis de variancia para los efectos simples en el número de estructuras proembriogénicas para el factor A (reguladores hormonales) y factor B (malta) del ensayo I y ensayo II.	69
31. Prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) para los efectos simples del Factor A en b, para el número de estructuras proembriogénicas del clon ICS-1.....	70
32. Prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) para los efectos simples del Factor A en b, para el número de estructuras proembriogénicas del clon IMC-67.....	71
33. Prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) para los efectos simples del Factor B en a, en el número de estructuras proembriogénicas en el clon ICS-1.	75
34. Prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) para los efectos simples del Factor B en a, en el número de estructuras proembriogénicas del clon IMC-67.	76
35. Análisis de variancia para el tiempo de aparición de embriones	

somáticos del ensayo I (ICS-I) y ensayo II (IMC-67).....	78
36. Prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) para tratamientos en el tiempo de aparición de embriones somáticos del ensayo I (ICS-1).	79
37. Prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) para tratamientos en el tiempo de aparición de embriones somáticos del ensayo II (IMC-67).....	80
38. Prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) para los efectos principales (A y B), para tratamientos en el tiempo de aparición de embriones somáticos del clon ICS-1.....	81
39. Prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) para los efectos principales (A y B), para tratamientos en el tiempo de aparición de embriones somáticos del clon IMC-67.....	82
40. Análisis de variancia para los efectos simples para el factor A (reguladores hormonales) y factor B (malta) en el Tiempo de aparición de embriones del ensayo I y ensayo II.....	83
41. Prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) para los efectos simples del Factor A en b, en el tiempo de aparición de embriones en el clon ICS-1.	84
42. Prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) para los efectos simples del Factor A en b, en el tiempo de aparición de embriones en el clon IMC-67.....	85
43. Prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) para los efectos simples del Factor B en a, en el tiempo de aparición de embriones en el clon ICS-I.	88
44. Prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) para los efectos simples del Factor B en a, en el tiempo de aparición de embriones somáticos en el clon IMC-67.	89
45. Datos originales del tamaño de callos por tratamiento en el primer ensayo.....	108

46.	Datos originales del tamaño de callos por tratamiento en el segundo ensayo.....	109
47.	Datos del tiempo de aparición de callos por tratamiento en el primer ensayo.....	110
48.	Datos del tiempo de aparición de callos por tratamiento en el segundo ensayo.....	111
49.	Datos del tiempo de aparición de estructuras proembriogénicas por tratamiento en el primer ensayo.	112
50.	Datos del tiempo de aparición de estructuras proembriogénicas por tratamiento en el segundo ensayo.....	113
51.	Datos del número de estructuras pro-embriogénicas por tratamiento en el primer ensayo.	114
52.	Datos del número de estructuras pro-embriogénicas por tratamiento en el segundo ensayo.	115

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
1. Partes de la flor de cacao	19
2. Efectos simples del Factor A en b, en el tamaño de callo en el clon ICS-1.....	49
3. Efectos simples del Factor A en b, en el tamaño de callo en el clon IMC-67.	49
4. Efectos simples del Factor B en a, en el tamaño de callo en el clon ICS-1.....	53
5. Efectos simples del Factor B en a, en el tamaño de callo en el clon IMC-67.	53
6. Efectos simples A en b_2 , en el tiempo de formación de callos en el clon ICS-1.....	60
7. Efectos simples A en b_2 , en el tiempo de formación de callos en el clon IMC-67.	60
8. Efectos simples A en b_2 , en el tiempo de formación de callos en el clon ICS-1.....	64
9. Efectos simples A en b_2 , en el tiempo de formación de callos en el clon IMC-67.	64
10. Efectos simples del Factor A en b, para el número de estructuras proembriogénicas en el clon ICS-1.....	72
11. Efectos simples del Factor A en b, para el número de estructuras proembriogénicas en el clon IMC-67.	72
12. Efectos simples del Factor B en a, para el número de estructuras	

proembriogénicas en el clon ICS-1.....	77
13. Efectos simples del Factor B en a, para el número de estructuras proembriogénicas en el clon IMC-67.	77
14. Efectos simples del Factor A en b, en el tiempo de aparición de embriones en el clon ICS-1.	86
15. Efectos simples del Factor A en b, en el tiempo de aparición de embriones en el clon IMC-67.	86
16. Efectos simples del Factor B en a, en el tiempo de aparición de embriones somáticos en el clon ICS-I.....	90
17. Efectos simples del Factor B en a, en el tiempo de aparición de embriones somáticos en el clon IMC-67.	90
18. Porcentaje de contaminación de los tratamientos del ensayo I (clon ICS-I).....	92
19. Porcentaje de contaminación de los tratamientos del ensayo II (clon IMC-67).	93
20. Conteo del número de estructuras pro embriogénicas por efecto de las dosis de malta y hormonas.	116
21. Evaluación del tamaño de callo de los estaminodios de cacao.....	116
22. Explantes del clon IMC-67 con sus diferentes tratamientos.....	117
23. Explantes del clon ICS-1 con sus diferentes tratamientos.	118
24. Formación de callo del clon ICS-1 con estructuras pro embriogénicas presentes.....	118
25. Formación de callo del clon IMC-67 con presencia de embriones somáticos.	118

I. INTRODUCCIÓN

En el Alto Huallaga y específicamente en la región de Tingo María, el cacao (*Theobroma cacao* L.) ha sido un cultivo colonizador, Por tales motivos, el cacao en el Perú, es una actividad de gran importancia social y económica que ha registrado durante los últimos años una dinámica comercial y productiva creciente Sin embargo, el panorama cacaotero presenta grandes limitaciones entre ellos: el problema de calidad, bajos rendimientos, inadecuada densidad de plantaciones, presencia de enfermedades como “escoba de bruja”, “moniliasis”, “pudrición parda”, entre otras y recursos genéticos limitados (ADRIAZOLA *et al.*, 2007; APPCACAO, 2010; MORALES *et al.*, 2015). Desafortunadamente, el cultivo del cacao no ha podido desarrollarse en toda su magnitud por lo que existe un déficit de producción, debido al bajo potencial productivo de los materiales sembrados y a la falta de híbridos adaptados a las zonas cacaoteras; asociado a la edad avanzada de las plantaciones, bajas densidades de siembra, la alta incidencia de enfermedades fungosas, las condiciones adversas de cultivo y los bajos precios del producto en el mercado (HERNÁNDEZ *et al.*, 2015; PARA CACAO, 2017; BARREZUETA, 2018). La embriogénesis somática (ES) es un sistema que permite obtener clones con una arquitectura dimórfica normal y un sistema radical de gran anclaje, además de los otros potenciales que esta técnica presenta para el mejoramiento genético, intercambio y conservación de material (BROWN y THORPE, 1995; HARLANDER, 2002; CONICYT, 2007; SOLANO, 2008). La embriogénesis somática en cacao ha sido trabajada desde la década de los 70; sin embargo, los resultados no fueron muy satisfactorios. Se han utilizado diferentes tipos de explantes (florales y foliares), genotipos y mezclas

de medios de cultivo a fin de lograr regenerar clones que mantuvieran sus características genéticas en el tiempo (HARLANDER, 2002; FREIRE, 2003; MATA, 2013; MONTILLA, 2017).

El desarrollar un protocolo eficiente de regeneración de cultivos celulares de clones de cacao vía embriogénesis abre la posibilidad de poder resolver con mayor rapidez y eficacia algunos problemas de este cultivo. Además, traería beneficios indirectos como el poder realizar rescate de embriones, para especies cuyas semillas demoran mucho tiempo en producirse o de aquellos cruces de especies cuyos embriones no se desarrollan, para la conservación de especies en riesgo de erosión genética, para producir semillas con características de buena producción en la menor área y tolerantes a enfermedades y plagas. Por lo tanto, el presente trabajo tiene como objetivo principal desarrollar el proceso de inducción de callos embriogénicos en estaminodios de dos clones de cacao (ICS-1 e IMC – 67), utilizando dosis de kinetina, reguladores hormonales y malta, y como objetivo específico:

- Determinar la mejor respuesta de los reguladores hormonales (2,4 D + Kinetina) en combinación con extracto de malta en la formación de callos embriogénicos de estaminodios de cacao .

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Aspectos generales del cacao

2.1.1. Origen

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

2.1.2. Clasificación taxonómica

IICA (2006), clasifica al cacao de la forma siguiente:

- Reino : Plantae
- División : Spermatophyta
- Clase : Angiospermae
- Sub-Clase : Dicotyledoneae
- Orden : Malvales
- Sub-Orden : Malvinae
- Familia : Malvaceae
- Tribu : Byttnerieae
- Género : Theobroma
- Especie : Theobroma cacao L.

2.1.3. Distribución geográfica del cultivo de cacao

Según GARCÍA (2000), en cuanto a la distribución geográfica las mayores concentraciones de áreas de cacao están entre los 10° de latitud norte y sur del Ecuador, distribuidos en el oeste africano, América Latina y sudeste de

Asia. Lachenaud (1997), citado por GARCÍA (2000), sobre la base de estudios moleculares y argumentos paleográficos y geobotánicos propuso 4 grupos o compuestos germoplásmicos naturales, con su correspondiente distribución geográfica como se señala en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Grupos de cacao y su distribución geográfica

Grupo de cacao	Distribución geográfica
A Criollo	América Central, Colombia y Venezuela
B Amazonas, Forasteros del alto Amazonas	Perú, Ecuador, Colombia, Bolivia y Brasil
C Guyanas o Forasteros del bajo Amazonas	Meseta de las Guyanas, Venezuela, Surinam, Guyana Francesa y Brasil
D Nacional	Zona Costera del Ecuador

Fuente: LACHENAUD (1997)

2.1.4. Descripción botánica

Theobroma cacao fue el nombre dado por Linnaeus al árbol de cacao en la primera edición de *Species Plantarum*. La primera palabra del nombre de esta especie significa “alimento de los dioses” (BAKER, 1891, TOXOPEUS, 1985). El género *Theobroma* se divide en seis secciones que contienen 22 especies, de estas *T. cacao* es la única que es cultivada ampliamente. El hábitat natural del género *Theobroma* está en el más bajo estrato del bosque lluvioso siempre verde. Todas las especies silvestres del género se encuentran en los bosques lluviosos del hemisferio occidental, desde

los 18° N a los 15° S, es decir desde México, hasta el sur de la Amazonía en Brasil y Bolivia (TOXOPEUS, 1985).

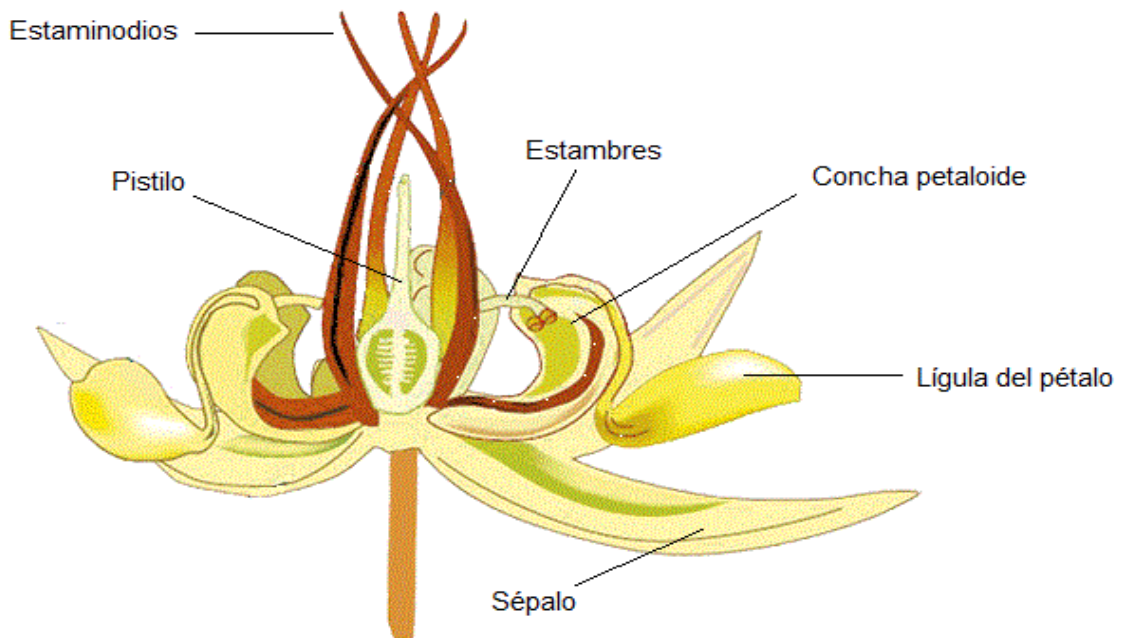
El cacao es un cultivo estrictamente tropical, pero se elabora y consume más en regiones templadas, principalmente como bebida estimulante y como alimento energético (chocolate) por su contenido de teobromina y trazas de cafeína. La grasa es un subproducto importante en la preparación de cosméticos y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

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

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

2.1.5. Morfología de la flor

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



Fuente: CATIE 2010

Figura 1. Partes de la flor de cacao

En el cacao los estaminodios protegen la parte femenina de la flor y atraen a las mosquitas polinizadoras. En botánica, un estaminodio es a menudo

un estambre rudimentario, estéril o abortado. Esto significa que no produce polen. Los estaminodios están frecuentemente disimulados y parecen estambres, normalmente ocurre en el verticilo interior de la flor (GOLA, 1965).

2.2. Biotecnología

El término biotecnología se utilizó y utiliza ampliamente, sobre todo enfocado en mayor medida a las técnicas moleculares usadas para modificar la composición genética de una planta. También, se ha descrito como el uso de organismos vivos o procesos biológicos para producir sustancias o procesos útiles para el hombre. La biotecnología agrícola permite tener un gran potencial para el desarrollo de prácticas agrícolas más sustentables, como: plantas que puedan expresar proteínas con un efecto insecticida, reduciendo sustancialmente el uso de insecticidas comerciales. Además, la biotecnología permite el uso de la ingeniería genética en plantas, que puede ser una importante herramienta para producir variedades, que expresen uno o más genes de resistencia a diferentes factores como: climas, tolerancia a sales y pH bajos, ataque de plagas y enfermedades etc., y de esta manera incrementar al abasto mundial de alimentos (BROWN y THORPE, 1995; HARLANDER, 2002).

2.2.1. El cultivo de tejidos

El cultivo de tejidos dentro de la biotecnología, se define como el cultivo de todo tipo de órganos, tejidos, células, embriones y protoplastos bajo condiciones asepticas adecuadas. El cultivo de tejidos comprende una gama de técnicas, métodos y estrategias in vitro que son parte del grupo de tecnologías llamadas biotecnología de plantas. El cultivo de tejido ha sido utilizado para crear

variabilidad genética, mejorar la sanidad y para incrementar el germoplasma disponible (CONICYT, 2007).

Actualmente, los protocolos de cultivo de tejidos están disponibles para la mayoría de las especies, aunque continúa optimizándose. Las técnicas de cultivos de tejidos en combinación con técnicas moleculares han sido utilizadas para incorporar características a las plantas a través de la transformación genética. Las técnicas *in vitro* para el cultivo de protoplastos, anteras, micro-esporas, óvulos y embriones han sido utilizadas para crear una mayor variabilidad genética y generalmente para la producción de haploides. El cultivo de tejidos de plantas tiene un importante rol en estudios básicos y aplicados, incluyendo el mejoramiento genético y junto con otros métodos biotecnológicos, permiten modificar y mejorar las plantas cultivadas (BROWN y THORPE, 1995). Dentro de las técnicas de cultivo de tejidos se encuentran :

a. Cultivo de embriones

Es una de las primeras técnicas de cultivo de tejidos aplicadas al mejoramiento de plantas, consiste en extraer el embrión de una semilla y posteriormente desarrollarlo bajo condiciones asépticas e *in vitro* hasta que desarrolle una planta completa para poder trasplantarlo. El principal propósito del cultivo de embriones, es el de recuperar plantas (embriones) durante pruebas de hibridación sexual entre plantas de variedades cultivadas y especies distantes entre sí (HARLANDER, 2002).

b. Embriogénesis somática

En varias especies de plantas, en complemento con la formación de embriones sexuales (embriogénesis cigótica), existe otra

alternativa posible, la formación de embriones a partir de células somáticas (embriogénesis somática). Varios tipos de embriogénesis han sido definidos: I) Androgénesis: embriones originados de microesporas; II) Partenogénesis: embriones originados de células sexuales femeninas no fecundadas; III) Ginogénesis: embriones originados de óvulos fecundados pero cuyo cromosoma no se ha unido (SHARP *et al.*, 1982).

La embriogénesis *in vitro* tiene gran potencial en estudios experimentales y es ampliamente usada en la investigación cuando se necesita resolver problemas genéticos de plantas, ingeniería genética, prácticas de mejoramiento, para estudiar la modulación de la expresión de los genes requeridos en el desarrollo de embriones en estado temprano para investigar los procesos de diferenciación que se dan en la formación de plantas completas a partir de una célula (FEHER *et al.*, 2003). La embriogénesis somática *in vitro* también se ha considerado como un avance en las técnicas de micropropagación, aunque todavía presenta problemas en la reconversión a planta comparada con la organogénesis (CONICYT, 2007).

El poder de las técnicas de clonación de embriones y su explotación para: propagación, producción de metabolitos, o transformación genética tienen como base la embriogénesis recurrente o también llamada repetitiva, accesoria, proliferante o secundaria. Esta ocurre cuando embriones somáticos primarios fallan, para madurar normalmente hasta plántulas y originan a ciclos sucesivos de embriones somáticos, que provienen comúnmente de células superficiales de los cotiledones hipocotíleo. Fases de la embriogénesis somática: I) Inducción de embriogénesis somática, II) Proliferación y

mantenimiento de embriones somáticos, III) Maduración de embriones somáticos, IV) Germinación de embriones somáticos (MERKLE *et al.*, 1990).

La embriogénesis somática fue descrita por primera vez en plantas de zanahoria, cuando se observó el desarrollo de estructuras embriogénicas *in vitro*. Comenzando con el desarrollo globular de embriones somáticos, que después se transformaron en embriones en estado de corazón, posteriormente estado de torpedo y finalmente germinaron produciendo plantas fértiles. Los factores que afectan esta frecuencia de eventos fueron estudiados en detalles y optimizados, resultando protocolos con alta producción de embriones bien desarrollados. Debido a la perfección del protocolo, el cultivo en suspensión de células somáticas de zanahoria se usó como el modelo favorito en el estudio de mecanismos embriogénicos (FREIRE, 2003; FEHER *et al.*, 2003).

Morfología de la embriogénesis somática. En el caso de las dicotiledóneas, un embrión somático es morfológicamente similar a un embrión cigótico, sobre todo en su desarrollo evolutivo desde pro-embrión, fase globular, corazón, torpedo y fase cotiledonal o embrión maduro (LI *et al.*, 1998). En los estados iniciales, el suspensor está en menor desarrollo en embriones somáticos (puede ser quizás un reflejo de inutilidad bajo condiciones *in vitro*). Otra diferencia importante es que el embrión cigótico forma un eje embrional con el meristemo apical, preparándose para la dormancia. Mientras que el embrión somático no sufre desecación ni dormancia, así la embriogénesis somática se dirige a formar de una célula, una planta sin interrupción (MERKLE *et al.*, 1990).

c. Embriones somáticos

Son estructuras bipolares que cuentan con un eje radical y otro apical, cotiledones, no poseen conexión vascular con el tejido materno y presentan bandas procambiales entre los ápices (FREIRE, 2003). Su desarrollo es nutrido por células vecinas a través de conexiones protoplasmáticas. Estas estructuras bipolares son capaces de crecer y formar plantas normales, debido a la naturaleza bipolar del embrión (SHARP *et al.*, 1982).

d. Embriogénesis somática directa

Especialmente en ausencia de auxinas exógenas, está asociada con un período relativamente corto entre el tiempo de la iniciación cotiledonal y el comienzo de la maduración de los embriones. Durante este tiempo, en el explante aparece una clonación directa, desarrollándose así células embriogénicas en un estado temprano. Del amplio espectro de aplicaciones y condiciones asociadas con la embriogénesis, se busca enfatizar más, en sistemas basados en embriones cigóticos con embriogénesis somática directa. Este proceso es conocido como clonación embrionaria. Se supone que estos explantes están compuestos principalmente de células que requieren una menor epigenética para programar la expresión al estado embriogénico (MERKLE *et al.*, 1990). Dentro de los factores que limitan la embriogénesis directa se encuentra la plasmólisis de las células ex-plantadas. Este factor se cree que afecta el estado epigénico de las células y puede ser explicado por su capacidad de interrumpir las interacciones célula-célula requerida para mantener coordinados los patrones de desarrollo (FLORES y ABDELNOUR, 2000).

2.2.2. Aplicaciones de la embriogénesis somática

La embriogénesis somática es un modelo que nos permite estudiar y entender las bases moleculares y celulares de plantas, así como estudiar la capacidad embriogénica de células somáticas. En los últimos años se ha utilizado para estudiar la capacidad embriogénica de células somáticas utilizando como modelo embriogénesis de mutantes de *Arabidopsis* (HARLANDER, 2002).

Ahora la manipulación genética de células tiene un alcance tal que el alto nivel de refinamiento de las técnicas regeneración de plantas a partir de cultivos celulares es extremadamente importante. En este respecto, la embriogénesis somática tiene muchas ventajas sobre la organogénesis debido a los siguientes parámetros: I) Embriones a diferencia de brotes se originan de una célula individual. II) Los cultivos embriogénicos pueden ser sincronizados y purificados. III). Se pueden tener cultivos de material homogéneo. Los cultivos embriogénicos de especies tropicales y subtropicales usados para propagación, selección in vitro a factores bióticos y abióticos, aislamiento y cultivo de protoplastos, transformación genética y para estudios de conservación de germoplasma. Actualmente se está implementando el uso de biorreactores de inmersión temporal, en especies leñosas, los cuales representan una alternativa para la producción de semillas artificiales (LITZ *et al.*, 1998).

2.2.3. Células pro embriogénicas

Un tejido explantado in vitro consiste de varios tipos de células. Los explantes al ser tratados con reguladores de crecimiento sus células comienzan a diferenciarse y proliferar. Para la inducción del estado embriogénico los explantes requieren de extensos ciclos de células proliferando desorganizadamente

la muerte o pérdida de explantes celulares circundantes, y/o altos niveles de auxina sintética. En presencia de auxinas endógenas, después de varios días (a veces semanas) una población de pequeñas células compactas emerge. Esas pequeñas y compactas células divididas en forma asimétrica y sus células hermanas junto con ellas, se amontonan como un típico grupo de células acumuladas, las cuales se conocen como: masas proembriónicas o agrupamiento embriónico. Sobre estas masas se desarrollan los embriones somáticos (FREIRE, 2003).

2.2.4. Obtención de embriones somáticos

En los embriones somáticos en estado temprano, un alejamiento o disminución de la concentración de auxinas en el medio de cultivo puede romper el ciclo de continua proliferación de masas pro embriónicas y permitir a los embriones el desarrollo y maduración. Debido a que este alejamiento de auxinas ejerce un efecto de disminuirla friabilidad aumentando los contactos célula-célula y permitiendo un incremento en la polaridad dentro del grupo de células embriónicas (MERKLE *et al.*, 1990).

2.2.5. Factores que influyen en la adquisición de capacidad embriónica

La adquisición de capacidad embriónica en plantas mayores se debe a varios factores intra y extracelular (ROCA y MROGINSKI, 1991). Se conocen diferentes factores químicos y ambientales que influyen en la embriogénesis somática .

a. Tipo de explante

La embriogénesis somática es inducida por una gran variedad de explantes de plantas, generalmente de embriones cigóticos, semillas

germinadas, embriones inmaduros, cotiledones, brotes meristemáticos, inflorescencias inmaduras, microesporas, hojas, estigma, estilo, células de raíz, embriones somáticos inmaduros y especies a partir de nucelas (LITZ, 1986).

b. Hormonas

La adquisición de totipotencia es el paso más crítico en la embriogénesis somática y el factor más importante que la afecta, es la aplicación de hormonas endógenas, debido a que el uso de auxinas a altas concentraciones es necesario para causar la desdiferenciación y la estimulación de la totipotencia, varias auxinas han sido usadas para este propósito: la auxina natural Acido indol acético (AIA) y otras sintéticas como el ácido naphtalenacetico (ANA), plicoram, ácido picolínico y cinetina. El ácido diclorofenoxiacético (2,4-D) no es considerada químicamente una auxina, pero tiene un comportamiento auxínico (LITZ *et al.*, 1998). El 2,4 -D es la auxina más eficiente y la más comúnmente usada para la promoción de embriogénesis somática ya que estimulan una rápida división celular, estimulan una división celular sincronizada que da como resultado células proembriogénicas y estimulan la proliferación de células proembriogénicas (LITZ, 1986).

- **Kinetina:** Es un regulador de crecimiento del tipo citoquininas, promueve la división celular. En algunos casos actúa junto con otras hormonas auxiliares del crecimiento como el ácido indol acético (IIA). Induce la formación de callos y regenera los tejidos de brotes a partir de callos. Puede ser usada en la producción de nuevas plantas a partir de cultivos de tejidos. Puede retrasar las características de envejecimiento, tales como velocidad de crecimiento celular y tamaño. Su fórmula molecular es $C_{10}H_9N_5O$ (SIGMA, 2018).

- **2,4-D (ácido diclorofenoxiacético):** Es un herbicida que se excreta por la vía renal de manera inalterada o, en baja proporción, en sus formas conjugadas en el sitio de adhesión de las cepas de *Escherichia coli* productoras de pielonefritis. Las bacterias que exitosamente infectan el tracto urinario poseen una constelación de factores que contribuyen a la virulencia. La adherencia bacteriana es un prerrequisito de patogenicidad, dado que el sistema de flujo continuo de orina elimina permanentemente los microorganismos. Colonizar a los túbulos renales a través de interacciones adhesina; es receptor requiere de la presentación de diversos tipos de adhesinas y/o de una regulación estricta de su expresión (BALAGUÉ y EVANGELISTA, 2006).

c. Genotipo y tipo de tejido

El genotipo, tipo de tejido y estado de desarrollo pueden ser factores determinantes en la habilidad de respuesta comparativa a las auxinas o citocininas (MERKLE *et al.*, 1990). Así también ENDEMANN y WILHELM (1999), describieron que el estado de desarrollo del explante, así como la influencia de la estacionalidad, debe de ser considerados como factores importantes en la inducción de embriogénesis somática .

d. Otros factores

Por otra parte, la densidad celular es también otro factor importante, que afecta le embriogénesis somática al igual que las concentraciones de oxígeno (MERKLE *et al.*, 1990).

- Extracto de malta

Es un ingrediente nutricional en la preparación de medios usados para el cultivo de hongos y levaduras. Es un jarabe de consistencia

viscosa de color café oscuro de aroma y sabor dulce propio de maltas especiales, producto de la hidrólisis controlada de cereales y cebada malteada, obtenido bajo Buenas Prácticas de Manufactura. Libre de impurezas y materia extraña. Su pH va de 4,5 a 5,5; su pérdida por desecación a 105°C es 6 %; su residuo de calcinación (en SO₄) es 3,5 % (MERCK, 2018).

2.3. Ensayos en embriogénesis somática

CHANATASIG (2004), en Costa Rica realizó inducción de embriogénesis somática en clones superiores de cacao (*Theobroma cacao* L.), con resistencia a enfermedades fungosas donde ensayo la respuesta de inducción a la formación de callos embriogénicos y embriones somáticos de tres clones de cacao PA169, SCA6 y UF273, bajo diferentes condiciones de cultivos. La respuesta a la inducción de callo varió de acuerdo a los clones, tipo de explante y condiciones de cultivo, con estrecha dependencia de la acción conjunta de todos los factores. Los clones PA169 y SCA6 mostraron un mayor desarrollo del callo que UF273; sin embargo, no estuvo relacionado con su aptitud embriogénica, ya que sólo los clones SCA6 y UF273 produjeron embriones somáticos y no así PA169.

Solamente 11 en UF273 y 18 en SCA6 produjeron respuesta a la embriogénesis. Se puede considerar que el mejor tratamiento para UF273 utiliza como explante el estaminoide, como fuente de carbono la sacarosa a 40 g/l y como fuente de citocinina la BAP, con una permanencia de 28 días en el medio PCG. Estas condiciones permitieron una frecuencia embriogénica del 12 % y un número promedio de embriones por explante de 6,67; lo que da la posibilidad de obtener alrededor de 80 embriones de 100 explantes. Mientras que para SCA6

en el mejor tratamiento se utiliza pétalos, glucosa a 30 g/l con un tiempo de permanencia de 14 días en medio PCG, utilizando la BAP, con el que se logró una frecuencia embriogénica de 12 % y promedio de embriones por explante de 5,75; lo cual permitiría obtener 69 embriones de 100 explantes. Con excepción de la fuente de citocinina, ningún otro factor es coincidente entre los mejores tratamientos de los dos clones, lo que destaca el papel que juega el factor genotípico y su interacción con los otros factores estudiados .

MATA (2013), en Costa Rica; evaluaron los protocolos de Nestlé (NT) y Penn State University (PSU) para inducir la formación de embriones somáticos en los clones de cacao: CATIE-R1, CATIE-R4, CATIE-R6, CC-137, ICS-95 T1, PMCT-58 y UF- 273 T1, con el objetivo de definir una estrategia eficiente de obtención de plantas. Para esto se colectaron botones florales cerrados y se extrajeron los pétalos y los estaminoides para utilizarlos como explantes. Se observó que los pétalos mostraron mayor reactividad en el protocolo NT, mientras que los estaminoides reaccionaron mejor en el protocolo PSU. Se observó un 100 % de callogénesis en los clones CATIE-R1 y PMCT-58 en el protocolo NT con pétalo como explante, al igual que en los clones CATIE-R1 y CATIE-R4 en el protocolo PSU con explante estaminoide. A los cuatro meses se evaluó la capacidad embriogénica y siendo el cultivo de estaminoides en el protocolo NT la combinación más exitosa, con la cual se obtuvo una capacidad embriogénica de 46% de explantes de CATIE-R6 y 42,6 % de CATIE-R1. Para el número de embriones producidos por explante, se encontraron diferencias significativas entre las combinaciones clon-protocolo y clon-tipo de explante, siendo la más exitosa el cultivo de estaminoides en el protocolo NT para los

clones CATIE-R1 y UF-273 T1 con un promedio de 6,32 y 3,00 embriones, respectivamente.

FERNÁNDEZ *et al.* (2015), evaluaron la aplicación de kinetina ribósido como estimulador de la germinación in vitro de esporas de *Glomus clarum*, concluyendo que la aplicación de kinetina ribósido de 0,07 mg/L al medio E estimula la germinación de esporas de *G. clarum*, alcanzándose valores de germinación del 100 %. Sin embargo, las concentraciones de AIA utilizadas (0,05 mg/L y 0,07 mg/L) en el mismo medio (E), tuvieron un efecto inhibitorio, tanto sobre la germinación como sobre el crecimiento de los tubos germinativos de las esporas. Los mayores valores de longitud de los tubos germinativos se obtuvieron en el medio SRM, comúnmente utilizado para el cultivo in vitro de los HMA.

2.3.1. Otros ensayos realizados en Tingo María

ESTRELLA (2012), en su trabajo titulado “Inducción de callogénesis en estaminodios de cacao (*Theobroma cacao* L.) ICS- 1 mediante reguladores hormonales”, halló que los mayores porcentajes de callogénesis en cacao (100%) se presentaron en los tratamientos a2b2 (0.25 mg/L 2,4-D + 0.25 mg/L KIN), a4b4 (1 mg/L 2,4-D + 1 mg/L KIN) y a5b3 (2 mg/L 2,4-D + 0.5 mg/L KIN) del ensayo 1, mientras que para el ensayo 2 fue el tratamiento a5c3 (2 mg/L de 2,4-D + 0.5 mg/L BAP) y para el ensayo 3 los tratamientos a3d3 (0.5 mg/L 2,4-D + 0.5 mg/L AIA) y a4d4 (1 mg/L 2,4-D + 1 mg/L AIA).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Ubicación del campo experimental

El presente trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Micropropagación in vitro de la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional Agraria de la Selva, ubicado en el km 1.5 carretera Tingo María, distrito de Rupa-Rupa, provincia de Leoncio Prado, departamento de Huánuco, cuyas coordenadas (UTM) son: 390514.9524 este, 8970048.3926 norte y altitud 670 m.s.n.m.

3.2. Materiales

3.2.1. Material vegetal

Para este estudio se utilizaron los estaminodios obtenidos de los botones florales de dos genotipos de cacao: ICS-1 e IMC-67, colectados de árboles seleccionados del Banco de Germoplasma de Cacao de la Universidad Nacional Agraria de la Selva.

Cuadro 2. Características importantes de los clones estudiados.

Características	ICS1	IMC67
Tipo Genético	Trinitario	Forastero
Compatibilidad	Auto compatible	Auto incompatible
Color fruto	Rojo	Verde
Producción	Media	Media
Resistencia a <i>Phytophthora</i>	Susceptible	Moderadamente susceptible
Resistencia a Escoba de bruja	Moderadamente resistente	Moderadamente resistente
Resistencia a Monilia	Moderadamente susceptible	Moderadamente susceptible

Fuente: GARCÍA (2000).

3.2.2. Equipos

- Cámara de flujo laminar.
- Balanza analítica.
- Agitador.
- Destilador de agua.
- Refrigerador.
- Potenciómetro.
- Autoclave.
- Cámara digital.

3.2.3. Reactivos

- Medio basal DKW (Driver y Kuniyuki (1984) y Tulecke y McGrahan (1985)).
- Reguladores de crecimiento: 2,4-D (ácido diclorofenoxiacético) SIGMA® y kinetina SIGMA®.
- Extracto de malta MERCK®
- Agentes desinfectantes: Alcohol medicinal, hipoclorito de sodio.

3.2.4. Materiales e insumos

- Mangos y hojas de bisturí N° 10
- Espátulas
- Mecheros de alcohol
- Tijera de podar
- Regla graduada
- Frascos de vidrio

- Placas petri (100 mm)
- Cinta de sellado Parafilm
- Marcadores de vidrio
- Gradillas
- Tubos de ensayo (25 x 150 mm)
- Tapas de tubos (25 mm diámetro)
- Micropipeta
- Papel aluminio
- Filtros milipore

3.3. Factores en estudio

3.3.1. Factor A: Reguladores hormonales

$a_1 = 0 \text{ mg/L de 2,4-D} + 0 \text{ mg/L de Kinetina (Testigo).}$

$a_2 = 0.25 \text{ mg/L de 2,4-D} + 0.25 \text{ mg/L de Kinetina.}$

$a_3 = 0.50 \text{ mg/L de 2,4-D} + 0.50 \text{ mg/L de Kinetina.}$

$a_4 = 1.0 \text{ mg/L de 2,4-D} + 1.0 \text{ mg/L de Kinetina.}$

$a_5 = 2.0 \text{ mg/L de 2,4-D} + 2.0 \text{ mg/L de Kinetina.}$

3.3.2. Factor B: Dosis de malta MERCK®

$b_1 = 0 \text{ mg/L de Malta.}$

$b_2 = 100 \text{ mg/L de Malta.}$

$b_3 = 200 \text{ mg/L de Malta.}$

3.4. Tratamiento en estudio

A continuación, se detallan la combinación de tratamientos ensayados para estaminodios del clon ICS1 y estaminodios del clon IMC67 (Cuadro 3).

Cuadro 3. Descripción de los tratamientos en estudio.

Tratamientos		Descripción (ensayo 1 y ensayo 2)
Clave	Interacción	
T ₁	a ₁ b ₁	(2,4 D 0 mg/L + Kinetina 0 mg/L) + (0 mg/L Malta)
T ₂	a ₂ b ₁	(2,4 D 0.25 mg/L + Kinetina 0.25 mg/L) + (Malta 0 mg/L)
T ₃	a ₃ b ₁	(2,4 D 0.5 mg/L + Kinetina 0.5 mg/L) + (Malta 0 mg/L)
T ₄	a ₄ b ₁	(2,4 D 1.0 mg/L + Kinetina 1.0 mg/L) + (Malta 0 mg/L)
T ₅	a ₅ b ₁	(2,4 D 2.0 mg/L + Kinetina 2.0 mg/L) + (Malta 0 mg/L)
T ₆	a ₁ b ₂	(2,4 D 0 mg/L + Kinetina 0 mg/L) + (Malta 100 mg/L)
T ₇	a ₂ b ₂	(2,4 D 0.25 mg/L + Kinetina 0.25 mg/L) + (Malta 100 mg/L)
T ₈	a ₃ b ₂	(2,4 D 0.5 mg/L + Kinetina 0.5 mg/L) + (Malta 100 mg/L)
T ₉	a ₄ b ₂	(2,4 D 1.0 mg/L + Kinetina 1.0 mg/L) + (Malta 100 mg/L)
T ₁₀	a ₅ b ₂	(2,4 D 2.0 mg/L + Kinetina 2.0 mg/L) + (Malta 100 mg/L)
T ₁₁	a ₁ b ₃	(2,4 D 0 mg/L + Kinetina 0 mg/L) + (Malta 200 mg/L)
T ₁₂	a ₂ b ₃	(2,4 D 0.25 mg/L + Kinetina 0.25 mg/L) + (Malta 200 mg/L)
T ₁₃	a ₃ b ₃	(2,4 D 0.5 mg/L + Kinetina 0.5 mg/L) + (Malta 200 mg/L)
T ₁₄	a ₄ b ₃	(2,4 D 1.0 mg/L + Kinetina 1.0 mg/L) + (Malta 200 mg/L)
T ₁₅	a ₅ b ₃	(2,4 D 2.0 mg/L + Kinetina 2.0 mg/L) + (Malta 200 mg/L)

3.5. Diseño experimental

Para el análisis estadístico de cada ensayo se usó el diseño completamente al azar (DCA), con 15 tratamientos y 5 repeticiones cada una, con un total de 75 unidades experimentales. El modelo aditivo lineal correspondiente a este diseño experimental es el siguiente.

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

Dónde:

Y_{ijk} = Reacción del estaminodio en la k-ésima repetición sujeto a la aplicación a la j-ésimo dosis de reguladores hormonales en el j-ésimo dosis de Malta.

μ = Efecto de la media general.

α_i = Efecto de i-ésima dosis de reguladores hormonales.

β_j = Efecto del j-ésimo dosis de Malta.

$(\alpha\beta)_{ij}$ = Es el efecto de la interacción entre el i-ésima dosis de reguladores hormonales y la j-ésimo dosis de Malta.

ε_{ijk} = Efecto aleatorio del error experimental obtenido en la k-ésima repetición sujeto a la aplicación la i-ésima dosis de reguladores hormonales con la j-ésimo dosis de Malta.

Para:

i = 1, 2,... 5 dosis de reguladores hormonales.

j = 1, 2,... 3 suplementos orgánicos.

k = 1, 2,... 5 repetición.

3.6. Ejecución del experimento

3.6.1. Obtención del material vegetativo

Se eligió los clones ICS1 e IMC-67 con fines de investigación, obtenidos del Banco de Germoplasma de la Universidad Nacional Agraria de la Selva. Siempre buscando las plantas mejores constituidas, con las siguientes características: a) Ser representativo del clon, b) Tener buena estructura (en desarrollo y conformación), c) Libres de plagas y enfermedades, d) No presentar deficiencias nutricionales, e) Tener de 8 a 20 años (edad de máxima producción).

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

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

delicado de los botones en agua destilada, seguido de la inmersión de ceftriaxona al 0,1 % (w/v) en el mismo recipiente que el hipoclorito de sodio (NaOCl) de 20 a 30 % (v/v) durante diez minutos y de tres enjuagues con agua destilada estéril. Se removió con pinzas estériles los botones florales para obtener los estaminodios, haciendo cortes en la base del estaminodio para separarlos del botón floral.

Los estaminodios se esterilizaron con alcohol (96 % puro) por tres minutos, luego en una solución de hipoclorito de sodio al 1 % y ceftriaxona al 0,1 %, por diez minutos, se enjuago tres veces con agua destilada. Todos los medios de cultivo usados en fueron semisólidos a un pH de 5,8. Los cultivos fueron mantenidos en la oscuridad a aproximadamente 25°C desde su implantación en los tubos de ensayos hasta la expresión de las estructuras pro-embionaria.

3.6.2. Preparación del medio de cultivo

Para la preparación del medio de cultivo DKW (Cuadro 4), suplementado solo con extracto de malta para ambos ensayos 1 y 2 (estaminodios de 2 clones de cacao), se utilizó el medio de inducción de callos embriogénicos NT1 (Cuadro 5) suplementado con diferentes combinaciones de reguladores hormonales y extracto de malta. En la referencia se recoge la formulación estándar mostrados para un litro de medio de cultivo.

Obtenidas las concentraciones requeridas para la preparación de medio de cultivo DKW, para los dos ensayos se procedió a agregar las concentraciones de reguladores hormonales y extracto de malta, que se constituyó en los tratamientos para la inducción de los callos embriogénicos, luego se enrazó a volumen requerido con agua destilada. Se agregó y disolvió

agar en cada frasco de los respectivos ensayos, se ajustó el pH a 5,8 previo al autoclavado y se sellaron con papel aluminio.

Se llevaron los frascos con los tratamientos a una cámara de flujo laminar encendida y se dispensó el medio de cultivo en tubos de ensayos en la cantidad de repeticiones necesaria. Se esterilizaron los tubos de ensayo en una autoclave a 15 libras de presión por 15 a 20 minutos y una temperatura de 121°C. Después de 24 horas, se realizó la siembra de los estaminodios de cacao en una cámara de flujo laminar con todos los procedimientos de asepsia, luego se sellaron con cinta parafina.

Cuadro 4. Medio con sales y vitaminas DKW.

Componentes	Elementos	Cantidad
A. Macroelemento DKW 10 x (1 L)	NH ₄ NO ₃	14.6 g
	CA(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	19.69 g
	CaCl ₂ .2H ₂ O	1.49 g
	K ₂ SO ₄	15.59 g
	MgSO ₄ .7H ₂ O	7.40 g
	KH ₂ PO ₄	2.65 g
B. Microelementos DKW 100 x (1 L)	Zn(NO ₃) ₂	1.700 g
	MnSO ₄ . H ₂ O	3.340 g
	CuSO ₄ . 5H ₂ O	0.025 g
	H ₃ BO ₃	0.480 g
	Na ₂ Mo. 2H ₂ O	0.039 g
	FeSO ₄ . 7H ₂ O	3.380 g
	Na-EDTA	4.540 g
C. Vitaminas DKW 1000 x (100 mL)	Myo-inositol	10.0 g
	Tiamina-HCL	0.2 g
	Acido nicotínico	0.1 g
	Glicina	0.2 g
D. Vitaminas B5 1000 x (100 mL)	Myo-inositol	5.0 mg
	Ácido nicotínico	50.0 mg
	Piridoxina	50.0 mg
	Tiamina	500.0 mg
E. Solución Stock de Aminoácidos 1000 x (100 mL)	Arginina	43.55 mg
	Glicina	18.76 mg
	Leucina	32.80 mg
	Lisina	45.65 mg
	Triptófano	51.05 mg.

Fuente: CHANATASIG (2004).

Cuadro 5. Medio NT1 (Laboratorio de la Nestlé) formulado con sales y vitaminas DKW.

Medio	NT1
Macro DKW (A)(10X)	100 mL
Macro DKW (B)(10X)	100 mL
Micro DKW (100X)	10 mL
Vitaminas DKW (200X)	5 mL
Aminoácidos (1000X)	1 mL
2,4-D (1 mg/mL)	1 mL
Kinetina (1 mg/mL)	0.25 mL
Glucosa	30 g
pH	5.8
Phytigel o agar	3 g

Fuente: SOLANO (2008).

3.6.3. Descripción de los ensayos experimentos de inducción de callos

a. Ensayo de inducción I

Se utilizó como explantes los estaminodios de flores en perfectas condiciones del clon ICS-1 sembradas en 15 tratamientos distintos, con sus respectivas cinco repeticiones, cada repetición estuvo conformada de una placa Petri con cinco estaminodios.

b. Ensayo de inducción II

Se utilizó como explantes los estaminodios de flores en perfectas condiciones del clon IMC-67, sembradas en 15 tratamientos distintos, con sus respectivas cinco repeticiones, cada repetición estuvo conformada de una placa petri con cinco estaminodios.

3.7. Características evaluadas

3.7.1. Tamaños de callos embriogénicos

Se evaluó dimensiones (diámetro) que alcanza cada callo embriogénico en los tratamientos.

3.7.2. Tiempo de aparición callos embriogénicos

Se evaluó el tiempo que demora la aparición de callos en cada tratamiento de cada bloque, contabilizando por días

3.7.3. Número de estructuras pro embriogénicas

Se evaluó el número de estructuras pro embriogénicas que alcanzó cada callo en los tratamientos.

3.7.4. Tiempo de aparición de embriones somáticos

se evaluó el tiempo de aparición de embriones somáticos, en cada tratamiento.

3.7.5. Contaminación

Se evaluó la posible contaminación bacteriana o fúngica, contabilizándolos como presencia o ausencia. Sin embargo, se trató en la medida de minimizarla.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Tamaño de callos

Para el tamaño de callos (mm), se tomó las medidas a los explantes de cada clon de cacao que se observa en el Cuadro 6. Donde se muestra que existe diferencia estadística altamente significativa tanto para los tratamientos, los factores (A y B) y como para la interacción de A x B. Por lo que al menos uno de las interacciones tuvo un efecto diferente de los demás. El coeficiente de variabilidad para el clon ICS-1 de 14.84 y 14.64 % para el IMC-67 respectivamente, indicando que existe una buena homogeneidad en la respuesta de los medios de cultivo y los diferentes compuestos orgánicos.

Cuadro 6. Resumen del análisis de variancia para el tamaño de callos en los clones ICS-1 e IMC-67.

Fuente de variación	GL	Ensayo I (ICS-1)		Ensayo II (IMC-67)	
		CM		CM	
Tratamientos	14	56.07	AS	31.1	AS
A Dosis (reguladores hormonales)	4	15.74	AS	10.41	AS
B Dosis (Malta)	2	290.02	AS	185.44	AS
A x B	8	17.75	AS	2.96	AS
Error experimental	60	0.87		0.55	
Total	74				
C.V. (%)		14.84		14.64	

AS = Altamente significativo (Existen diferencias estadísticas altamente significativas)

Al realizar la comparación de medias para el tamaño de callos, podemos ver en el Cuadro 7 que para los estaminodios del clon ICS -1 el tratamientos T₁₄ (a₄b₃), resulto con mayor tamaño de callos con un valor de 13.84 mm, diferenciándose estadísticamente de los demás tratamientos, asimismo los tratamientos T₁₂ (a₂b₃) de valor 10.72 y T₁₁ (a₁b₃) de valor 10.7 mm presentaron

tamaños de callo bastante significativos después del tratamiento T₁₄ al presentar valores de 10.72 y 10.7 mm “respectivamente”.

Cuadro 7. Prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) para tratamientos en el tamaño de callo del clon ICS-1.

Clave	Tratamiento	Tamaño (mm)	Significación			
T ₁₄	a ₄ b ₃	13.84	a			
T ₁₂	a ₂ b ₃	10.72	b			
T ₁₁	a ₁ b ₃	10.70	b			
T ₁₀	a ₅ b ₂	8.04		c		
T ₁₅	a ₅ b ₃	7.90		c		
T ₁₃	a ₃ b ₃	6.78		c	d	
T ₉	a ₄ b ₂	5.80			d	e
T ₈	a ₃ b ₂	4.94			d	e f
T ₇	a ₂ b ₂	4.62				e f g
T ₆	a ₁ b ₂	4.30				e f g
T ₅	a ₅ b ₁	3.92				e f g
T ₄	a ₄ b ₁	3.78				e f g
T ₃	a ₃ b ₁	3.40				f g
T ₁	a ₁ b ₁	2.80				g
T ₂	a ₂ b ₁	2.58				g

Tratamientos unidos por la misma letra en columna no existe diferencia

a₁ = 0 mg/L de 2,4-D + 0 mg/L de Kinetina (Testigo)
a₂ = 0.25 mg/L de 2,4-D + 0.25 mg/L de Kinetina
a₃ = 0.50 mg/L de 2,4-D + 0.50 mg/L de Kinetina
a₄ = 1.0 mg/L de 2,4-D + 1.0 mg/L de Kinetina
a₅ = 2.0 mg/L de 2,4-D + 2.0 mg/L de Kinetina

b₁ = 0 mg/L de Malta
b₂ = 100 mg/L de Malta
b₃ = 200 mg/L de Malta

Mientras en el Cuadro 8 que para el clon IMC-67 los tratamientos que mostraron mayor efecto en el tamaño de callos fueron los tratamientos T₁₄ (a₄b₃) de valor 9.56 mm y T₁₃ (a₃b₃) de valor 8.04 mm respectivamente, los cuales no se diferencian estadísticamente, Por otra parte, los tratamientos T₃, T₆, T₅, T₂, T₁ no se diferencian estadísticamente, alcanzando los menores tamaños de callos para ambos clones. En la inducción de la embriogénesis somática de cacao, varios autores han estudiado la respuesta de explantes florales a la callogénesis, obteniendo diferentes resultados de acuerdo con la metodología aplicada (SONDAHL *et al.*, 1993; PENCE, 1995; LI *et al.*, 1998; LÓPEZ *et al.*, 2001).

Cuadro 8. Prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) para tratamientos en el tamaño de callo del IMC-67.

Clave	Tratamiento	Tamaño (mm)	Significación			
T ₁₄	a ₄ b ₃	9.56	a			
T ₁₃	a ₃ b ₃	8.04	a b			
T ₁₂	a ₂ b ₃	7.76	b			
T ₁₅	a ₅ b ₃	7.48	b			
T ₁₁	a ₁ b ₃	7.40	b			
T ₁₀	a ₅ b ₂	6.50	b c			
T ₉	a ₄ b ₂	5.14	c d			
T ₈	a ₃ b ₂	4.56	d e			
T ₄	a ₄ b ₁	3.64	d e f			
T ₇	a ₂ b ₂	3.46	e f			
T ₃	a ₃ b ₁	3.00	e f g			
T ₆	a ₁ b ₂	2.98	e f g			
T ₅	a ₅ b ₁	2.78	f g			
T ₂	a ₂ b ₁	2.34	f g			
T ₁	a ₁ b ₁	1.68	g			

Tratamientos unidos por la misma letra en columna no existe diferencia estadística significativa.

a₁ = 0 mg/L de 2,4-D + 0 mg/L de Kinetina (Testigo)
a₂ = 0.25 mg/L de 2,4-D + 0.25 mg/L de Kinetina
a₃ = 0.50 mg/L de 2,4-D + 0.50 mg/L de Kinetina
a₄ = 1.0 mg/L de 2,4-D + 1.0 mg/L de Kinetina
a₅ = 2.0 mg/L de 2,4-D + 2.0 mg/L de Kinetina

b₁ = 0 mg/L de Malta
b₂ = 100 mg/L de Malta
b₃ = 200 mg/L de Malta

De igual manera, en el presente trabajo a pesar de que todos los tratamientos indujeron callogénesis, en estaminodios, la respuesta varió, dependiendo de los clones, tipo de explante y condiciones de cultivo. Este hecho se puede ver en el Cuadro 7 y Cuadro 8, donde para el caso de la aplicación del tratamiento T₁₄ los estaminodios del clon ICS-1 resulto con una mayor longitud (13.85 mm) de callos que los producidos por los estaminodios del clon IMC-67 que solo alcanzó 9.56, en forma general las mayores longitudes de callos fueron producidos por los estaminodios del clon ICS – I.

Respuestas similares han sido reportadas en *Coffea ssp.* (café), *Cydonia oblonga* Miller (Quince) y *Robinia pseudoacacia* L. (Frisia), entre otros cultivos (SREENATH *et al.*, 1995; ETIENNE *et al.*, 1999; HAN y PARK, 1999;

FISICHELLA *et al.*, 2000). Podemos observar en el Cuadro 9, que de acuerdo a la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) el efecto principal de los factores A (dosis de reguladores hormonales) y B (dosis de malta), para el clon ICS-1, los niveles del factor A (dosis de reguladores hormonales) mostraron diferencias estadísticas significativas siendo el nivel a_4 (2,4-D 1mg/L + Kinetina 1 mg/L), quien obtuvo mayor tamaño, diferenciándose estadísticamente de los demás tratamientos al presentar un valor de 7.81 mm. Asimismo, en los niveles del factor B (dosis de malta), existió diferencias estadísticas significativas entre los niveles, siendo el nivel b_3 quien ocupó el primer lugar al presentar un tamaño de 9.99 mm. Mientras que el nivel b_1 ocupó el último lugar al presentar un tamaño de callo de 3.3 mm.

Por otro lado, el Cuadro 10, para el clon IMC-67, el factor A dosis (de reguladores hormonales) obtuvo resultados altamente significativos siendo los niveles a_4 y a_5 los que alcanzaron mayor tamaño de callo, al presentar un valor de 6.11 y 5.59 mm respectivamente, sin diferenciarse estadísticamente. Mientras que para el factor B, los niveles resultaron con alta significancia estadística, siendo el nivel b_3 quien alcanzó el mayor tamaño de callo al presentar un valor de 8.05 mm. Mientras que el nivel b_1 ocupó el último lugar al presentar un tamaño de callo de 2.69 mm.

Para el ensayo I en el Cuadro 11, de acuerdo al análisis de variancia de efectos simples para el factor A (reguladores hormonales) En el tamaño de callos, se obtuvo que la diferencia de la dosis del factor A (reguladores hormonales), solo se observa cuando se aplica la segunda y tercera dosis del factor B (malta). Mas no así en el primer nivel de B (malta); por otro lado, la diferencia entre las dosis del factor B (malta), se observa en cada uno de la dosis

del factor A (reguladores hormonales). Con respecto al ensayo II, de acuerdo con el análisis de variancia de efectos simples del factor A (reguladores hormonales), se encontró que la diferencia de A (reguladores hormonales), se presenta en cada uno de los niveles del factor B (malta).

Cuadro 9. Prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) para los efectos principales (A y B), para tratamientos en el tamaño de callo del ensayo I (ICS-1).

Factor A (reguladores hormonales)			Factor B (malta)		
Dosis	Tamaño (mm)	Sig.	Dosis	Tamaño (mm)	Sig.
a ₄	7.81	a	b ₃	9.99	a
a ₅	6.62	b	b ₂	5.54	b
a ₂	5.97	b c	b ₁	3.30	c
a ₁	5.93	b c			
a ₃	5.04	c			

Tratamientos unidos por la misma letra en columna no existe diferencia estadística significativa.

a₁ = 0 mg/L de 2,4-D + 0 mg/L de Kinetina (Testigo)
a₂ = 0.25 mg/L de 2,4-D + 0.25 mg/L de Kinetina
a₃ = 0.50 mg/L de 2,4-D + 0.50 mg/L de Kinetina
a₄ = 1.0 mg/L de 2,4-D + 1.0 mg/L de Kinetina
a₅ = 2.0 mg/L de 2,4-D + 2.0 mg/L de Kinetina

b₁ = 0 mg/L de Malta
b₂ = 100 mg/L de Malta
b₃ = 200 mg/L de Malta

Cuadro 10. Prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) para los efectos principales (A y B), para tratamientos en el tamaño de callo del ensayo II (IMC-67).

Factor A (reguladores hormonales)			Factor B (malta)		
Dosis	Tamaño (mm)	Sig.	Dosis	Tamaño (mm)	Sig.
a ₄	6.11	a	b ₃	8.05	a
a ₅	5.59	a b	b ₂	4.53	b
a ₃	5.20	b c	b ₁	2.69	c
a ₂	4.52	c d			
a ₁	4.02	d			

Tratamientos unidos por la misma letra en columna no existe diferencia estadística significativa.

a₁ = 0 mg/L de 2,4-D + 0 mg/L de Kinetina (Testigo)
a₂ = 0.25 mg/L de 2,4-D + 0.25 mg/L de Kinetina
a₃ = 0.50 mg/L de 2,4-D + 0.50 mg/L de Kinetina
a₄ = 1.0 mg/L de 2,4-D + 1.0 mg/L de Kinetina
a₅ = 2.0 mg/L de 2,4-D + 2.0 mg/L de Kinetina

b₁ = 0 mg/L de Malta
b₂ = 100 mg/L de Malta
b₃ = 200 mg/L de Malta

Cuadro 11. Análisis de variancia para los efectos simples para el factor A (reguladores hormonales) y factor B (malta) en el tamaño de callos del ensayo I y ensayo II.

F. de variación	GL	Ensayo I (ICS-1)		Ensayo II (IMC-67)	
		CM		CM	
A en b ₁	4	1.74	NS	2.69	AS
A en b ₂	4	11.33	AS	9.75	AS
A en b ₃	4	38.16	AS	3.89	AS
B en a ₁	2	88.02	AS	44.95	AS
B en a ₂	2	89.69	AS	40.93	AS
B en a ₃	2	14.32	AS	33.29	AS
B en a ₄	2	141.61	AS	47.36	AS
B en a ₅	2	27.36	AS	30.74	AS
Error experimental	60	0.87		0.55	

N.S. = No existe significación estadística.

A.S. = Altamente significativo (Existen diferencias estadísticas altamente significativas).

a₁ = 0 mg/L de 2,4-D + 0 mg/L de Kinetina (Testigo)

a₂ = 0.25 mg/L de 2,4-D + 0.25 mg/L de Kinetina

a₃ = 0.50 mg/L de 2,4-D + 0.50 mg/L de Kinetina

a₄ = 1.0 mg/L de 2,4-D + 1.0 mg/L de Kinetina

a₅ = 2.0 mg/L de 2,4-D + 2.0 mg/L de Kinetina

b₁ = 0 mg/L de Malta

b₂ = 100 mg/L de Malta

b₃ = 200 mg/L de Malta

Las comparaciones múltiples según la prueba Tukey ($\alpha=0.05$) mostrada en los Cuadros 12 y 13. Analizando desde superior izquierda hacia la derecha, de acuerdo con el efecto simple de A en b₁; en el ensayo I (ICS-1) todos presentan una diferencia estadísticamente muy significativa entre las cinco combinaciones, mientras que en el ensayo II (IMC-67) el tratamiento de a₄b₁ y a₁b₁ muestran una diferencia estadísticamente significativa con tamaño de 3.64 y 1.68 mm, mostrando contrariamente en los tratamientos restantes.

Cuadro 12. Prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) para los efectos simples del Factor A en b, en el tamaño de callos en el clon ICS-1.

Ensayo I (ICS-1)		
Factor A en b₁ (0 mg/L de Malta)		
Tratamiento	Tamaño (mm)	Sig.
a ₅ : 2.0 mg/L de 2,4-D + 2.0 mg/L de Kinetina	3.92	a
a ₄ : 0 mg/L de 2,4-D + 1.0 mg/L de Kinetina	3.78	a
a ₃ : 0.50 mg/L de 2,4-D + 0.50 mg/L de Kinetina	3.40	a
a ₁ : 0 mg/L de 2,4-D + 0 mg/L de Kinetina	2.80	a
a ₂ : 0.25 mg/L de 2,4-D + 0.25 mg/L de Kinetina	2.58	a
Factor A en b₂ (100 mg/L de Malta)		
Tratamiento	Tamaño (mm)	Sig.
a ₅ : 0 mg/L de 2,4-D + 2.0 mg/L de Kinetina	8.04	a
a ₄ : 0 mg/L de 2,4-D + 1.0 mg/L de Kinetina	5.80	b
a ₃ : 0.50 mg/L de 2,4-D + 0.50 mg/L de Kinetina	4.94	b
a ₁ : 0 mg/L de 2,4-D + 0 mg/L de Kinetina	4.62	b
a ₂ : 0.25 mg/L de 2,4-D + 0.25 mg/L de Kinetina	4.30	b
Factor A en b₃ (200 mg/L de Malta)		
Tratamiento	Tamaño (mm)	Sig.
a ₄ : 0 mg/L de 2,4-D + 1.0 mg/L de Kinetina	13.84	a
a ₂ : 0.25 mg/L de 2,4-D + 0.25 mg/L de Kinetina	10.72	b
a ₁ : 0 mg/L de 2,4-D + 0 mg/L de Kinetina	10.70	b
a ₅ : 0 mg/L de 2,4-D + 2.0 mg/L de Kinetina	7.90	c
a ₃ : 0.50 mg/L de 2,4-D + 0.50 mg/L de Kinetina	6.78	c

Tratamientos unidos por la misma letra en columna no existe diferencia estadística significativa.

- a₁ = 0 mg/L de 2,4-D + 0 mg/L de Kinetina (Testigo)
- a₂ = 0.25 mg/L de 2,4-D + 0.25 mg/L de Kinetina
- a₃ = 0.50 mg/L de 2,4-D + 0.50 mg/L de Kinetina
- a₄ = 1.0 mg/L de 2,4-D + 1.0 mg/L de Kinetina
- a₅ = 2.0 mg/L de 2,4-D + 2.0 mg/L de Kinetina

Cuadro 13. Prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) para los efectos simples del Factor A en b, en el tamaño de callos en el clon IMC-67.

Ensayo II (IMC – 67)		
Factor A en b₁ (0 mg/L de Malta)		
Tratamiento	Tamaño (mm)	Sig.
a ₄ : 1.0 mg/L de 2,4-D + 1.0 mg/L de Kinetina	3.64	a
a ₃ : 0.50 mg/L de 2,4-D + 0.50 mg/L de Kinetina	3.00	ab
a ₅ : 2.0 mg/L de 2,4-D + 2.0 mg/L de Kinetina	2.78	ab
a ₂ : 0.25 mg/L de 2,4-D + 0.25 mg/L de Kinetina	2.34	ab
a ₁ : 0 mg/L de 2,4-D + 0 mg/L de Kinetina	1.68	b
Factor A en b₂ (100 mg/L de Malta)		
Tratamiento	Tamaño (mm)	Sig.
a ₅ : 2.0 mg/L de 2,4-D + 2.0 mg/L de Kinetina	6.50	a
a ₄ : 1.0 mg/L de 2,4-D + 1.0 mg/L de Kinetina	5.14	b
a ₃ : 0.50 mg/L de 2,4-D + 0.50 mg/L de Kinetina	4.56	bc
a ₂ : 0.25 mg/L de 2,4-D + 0.25 mg/L de Kinetina	3.46	cd
a ₁ : 0 mg/L de 2,4-D + 0 mg/L de Kinetina	2.98	d
Factor A en b₃ (200 mg/L de Malta)		
Tratamiento	Tamaño (mm)	Sig.
a ₄ : 1.0 mg/L de 2,4-D + 1.0 mg/L de Kinetina	9.56	a
a ₃ : 0.50 mg/L de 2,4-D + 0.50 mg/L de Kinetina	8.04	b
a ₂ : 0.25 mg/L de 2,4-D + 0.25 mg/L de Kinetina	7.76	b
a ₅ : 2.0 mg/L de 2,4-D + 2.0 mg/L de Kinetina	7.48	b
a ₁ : 0 mg/L de 2,4-D + 0 mg/L de Kinetina	7.40	b

Tratamientos unidos por la misma letra en columna no existe diferencia estadística significativa.

a₁ = 0 mg/L de 2,4-D + 0 mg/L de Kinetina (Testigo)

a₂ = 0.25 mg/L de 2,4-D + 0.25 mg/L de Kinetina

a₃ = 0.50 mg/L de 2,4-D + 0.50 mg/L de Kinetina

a₄ = 1.0 mg/L de 2,4-D + 1.0 mg/L de Kinetina

a₅ = 2.0 mg/L de 2,4-D + 2.0 mg/L de Kinetina

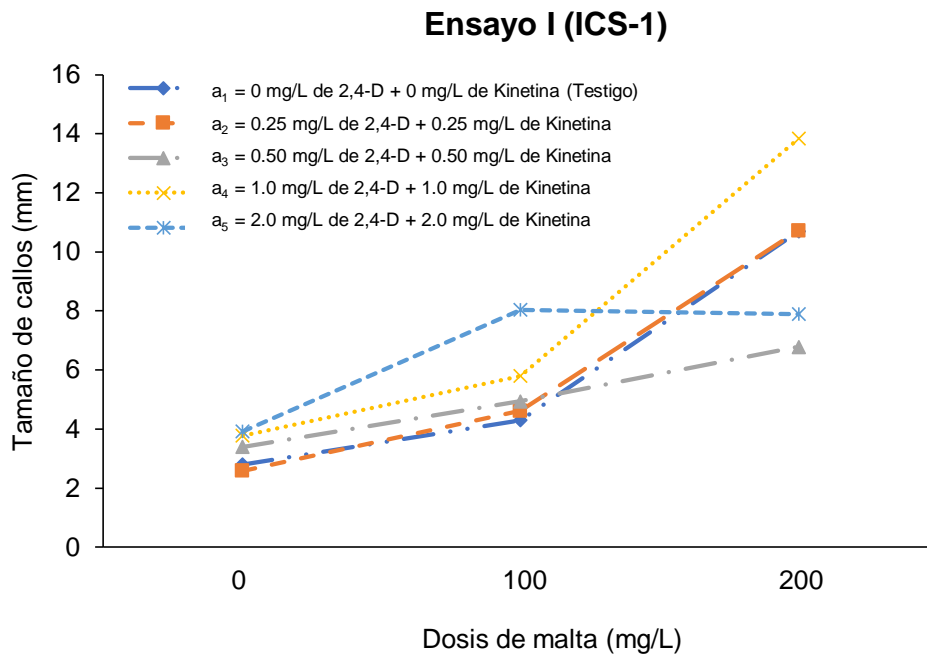


Figura 2. Efectos simples del Factor A en b, en el tamaño de callo en el clon ICS-1.

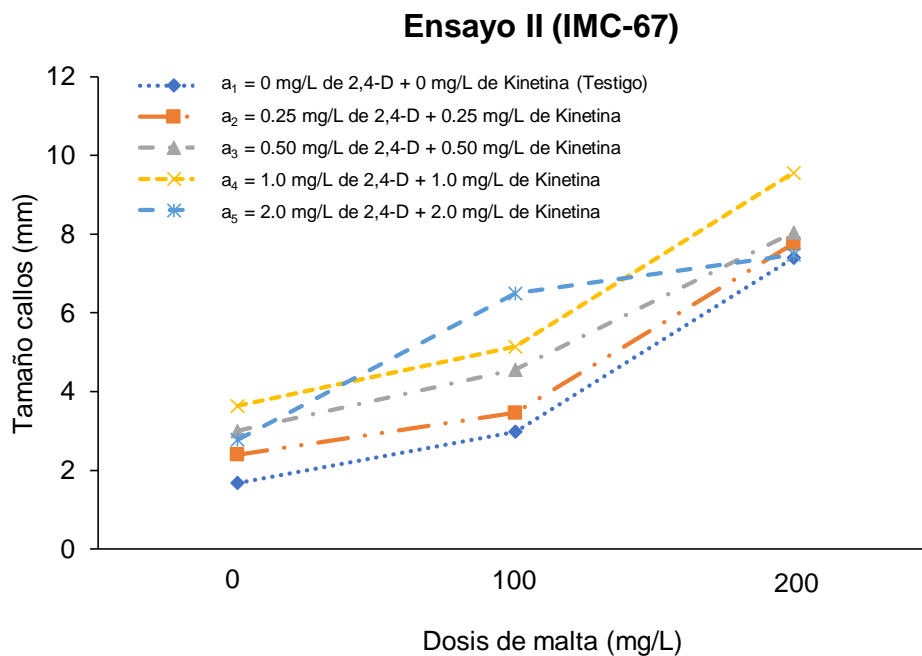


Figura 3. Efectos simples del Factor A en b, en el tamaño de callo en el clon IMC-67.

El efecto de (A) en b_2 ; en el ensayo I (ICS-1) todos los tratamientos muestran una diferencia estadística significativa para el tamaño de los callos; sin embargo, en el ensayo II (IMC-67) las diferencias se muestran en los tratamientos de a_5b_2 , a_4b_2 y a_1b_2 con tamaños de 6.50, 5.14 y 2.98 mm, respectivamente.

Para el ensayo I, los efectos de A en el nivel b_3 , todos los tratamientos muestran una diferencia estadísticamente significativa, lo propio ocurre para el ensayo II.

Mientras que el nivel b_3 estadísticamente es el que más influenció en la formación o tamaño de los callos, con respecto a la aplicación de dosis de 2,4-D, al respecto PARROT (2002), indica que cuando las concentraciones de auxina exógena se elevan a un determinado nivel, se detiene la formación de callos; es decir, esta tendencia se ha comprobado en el nivel a_4 que fue superior al nivel a_5 .

Según en los Cuadros 14 y 15, para el clon ICS-1, se encontró diferencias estadísticas significativas para el factor A (reguladores hormonales) en sus tres niveles del factor B (malta), en forma general se observa que estadísticamente el nivel b_3 , muestra mejores resultados en la formación de callos; este hecho se puede ver claramente en los tratamientos o interacción de los niveles a_1b_3 , a_2b_3 , a_3b_3 , a_4b_3 y a_5b_3 , quienes presentaron 10.7, 10.72, 6.78, 10.84 y 7.9 mm respectivamente.

Para el clon IMC-67, al igual que en el Clon ICS-1 se encontró que los tratamientos a_1b_3 , a_2b_3 , a_3b_3 , a_4b_3 y a_5b_3 resultaron los mejores tratamientos al presentar 7.4, 7.76, 8.04, 9.56 y 7.48 mm respectivamente.

Cuadro 14. Prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) para los efectos simples del Factor B en a, en el tamaño de callos en el clon ICS-1.

Ensayo I (ICS-1)		
Factor B (dosis de malta) en a₁ (0 mg/L de 2,4-D + 0 mg/L de Kinetina)		
Tratamiento	Tamaño (mm)	Significación
b ₃ : 200 mg/L de Malta	10.70	a
b ₂ : 100 mg/L de Malta	4.30	b
b ₁ : 0 mg/L de Malta	2.80	b
Factor B (dosis de malta) en a₂ (0.25 mg/L de 2,4-D + 0.25 mg/L de Kinetina)		
Tratamiento	Tamaño (mm)	Significación
b ₃ : 200 mg/L de Malta	10.72	a
b ₂ : 100 mg/L de Malta	4.62	b
b ₁ : 0 mg/L de Malta	2.58	c
Factor B (dosis de malta) en a₃ (0.50 mg/L de 2,4-D + 0.50 mg/L de Kinetina)		
Tratamiento	Tamaño (mm)	Significación
b ₃ : 200 mg/L de Malta	6.78	a
b ₂ : 100 mg/L de Malta	4.94	b
b ₁ : 0 mg/L de Malta	3.40	c
Factor B (dosis de malta) en a₄ (1.0 mg/L de 2,4-D + 1.0 mg/L de Kinetina)		
Tratamiento	Tamaño (mm)	Significación
b ₃ : 200 mg/L de Malta	13.84	a
b ₂ : 100 mg/L de Malta	5.80	b
b ₁ : 0 mg/L de Malta	3.78	c
Factor B (dosis de malta) en a₅ (2.0 mg/L de 2,4-D + 2.0 mg/L de Kinetina)		
Tratamiento	Tamaño (mm)	Significación
b ₂ : 100 mg/L de Malta	8.04	a
b ₃ : 200 mg/L de Malta	7.90	a
b ₁ : 0 mg/L de Malta	3.92	b

Tratamientos unidos por la misma letra en columna no existe diferencia estadística significativa.

b₁ = 0 mg/L de Malta
b₂ = 100 mg/L de Malta
b₃ = 200 mg/L de Malta

Cuadro 15. Prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) para los efectos simples del Factor B en a, en el tamaño de callos en el clon IMC-67.

Ensayo II (IMC – 67)		
Factor B en a₁ (0 mg/L de 2,4-D + 0 mg/L de Kinetina)		
Tratamiento	Tamaño (mm)	Significación
b ₃ : 200 mg/L de Malta	7.4	a
b ₂ : 100 mg/L de Malta	2.98	b
b ₁ : 0 mg/L de Malta	1.68	b
Factor B en a₂ (0.25 mg/L de 2,4-D + 0.25 mg/L de Kinetina)		
Tratamiento	Tamaño mm)	Significación
b ₃ : 200 mg/L de Malta	7.76	a
b ₂ : 100 mg/L de Malta	3.46	b
b ₁ : 0 mg/L de Malta	2.34	b
Factor B en a₃ (0.50 mg/L de 2,4-D + 0.50 mg/L de Kinetina)		
Tratamiento	Tamaño (mm)	Significación
b ₃ : 200 mg/L de Malta	8.04	a
b ₂ : 100 mg/L de Malta	4.56	b
b ₁ : 0 mg/L de Malta	3.00	c
Factor B en a₄ (1.0 mg/L de 2,4-D + 1.0 mg/L de Kinetina)		
Tratamiento	Tamaño (mm)	Significación
b ₃ : 200 mg/L de Malta	9.56	a
b ₂ : 100 mg/L de Malta	5.14	b
b ₁ : 0 mg/L de Malta	3.64	c
Factor B en a₅ (2.0 mg/L de 2,4-D + 2.0 mg/L de Kinetina)		
Tratamiento	Tamaño (mm)	Significación
b ₃ : 200 mg/L de Malta	7.48	a
b ₂ : 100 mg/L de Malta	6.50	a
b ₁ : 0 mg/L de Malta	2.78	b

Tratamientos unidos por la misma letra en columna no existe diferencia estadística significativa.

b₁ = 0 mg/L de Malta
b₂ = 100 mg/L de Malta
b₃ = 200 mg/L de Malta

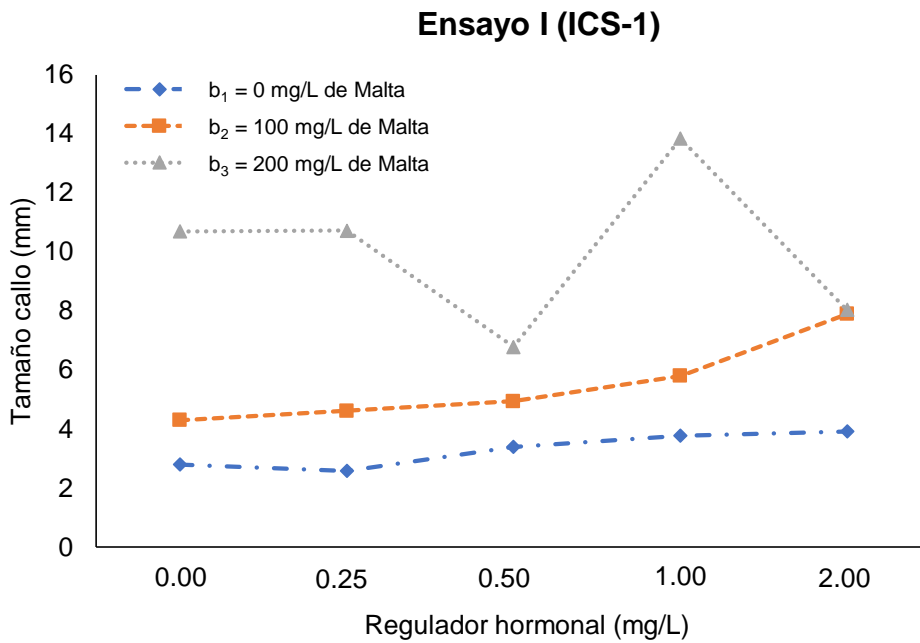


Figura 4. Efectos simples del Factor B en a, en el tamaño de callo en el clon ICS-1.

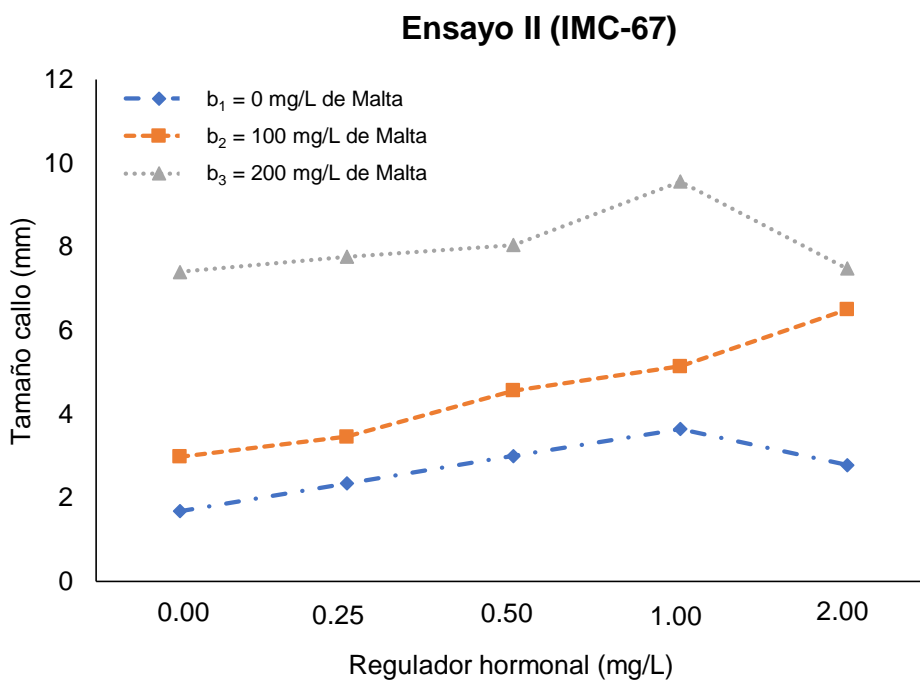


Figura 5. Efectos simples del Factor B en a, en el tamaño de callo en el clon IMC-67.

4.2. Tiempo de aparición de callos embriogénicos

Para el tiempo (días) que tomó a cada tratamiento en formar los callos en los dos clones de cacao, el Cuadro 16, muestra diferencia estadística significativa, tanto para los tratamientos como para la interacción de A x B y el factor B (malta), mientras que para el factor A (dosis de reguladores hormonales) no se encontraron diferencias estadísticas significativas. Además, muestra un coeficiente de variabilidad de 12.33 y 10.56 % para el clon ICS-1 e IMC – 67 respectivamente. Indicando que existe una buena homogeneidad en la respuesta de los medios de cultivo y los diferentes compuestos orgánicos

Cuadro 16. Análisis de variancia para el tiempo de formación de callos en cada ensayo de inducción.

Fuente de variación	GL	Ensayo I (ICS-1)	Ensayo II (IMC-67)
		CM	CM
Tratamientos	14	133.62 AS	72.48 AS
A Dosis (reguladores hormonales)	4	16.43 NS	6.88 NS
B Dosis (Malta)	2	767.69 AS	372.96 AS
A x B	8	33.69 AS	30.16 AS
Error experimental	60	7.80	7.80
Total	74		
C.V. (%)		12.32	10.55

AS = Altamente significativo (Existen diferencias estadísticas altamente significativas)

NS = no existe diferencias estadísticas significativas.

Al realizar la comparación de medias para el tiempo transcurrido hasta la formación de callos, podemos ver en el Cuadro 17, que para el clon ICS-1 los tratamientos T₁₂ (a₂b₃) T₁₃ (a₃b₃), T₁₁ (a₁b₃), T₁₄ (a₄b₃), T₁₅ (a₅b₃), requirieron menor tiempo para formar callos al presentar valores de 13.8, 14.6, 17.2, 17.8 y 19.2 días, estos a su vez no se diferenciaron estadísticamente entre sí.

Cuadro 17. Prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) para tratamientos en el tiempo de formación de callo del ensayo I (ICS-1).

Clave	Tratamiento	Tiempo (días)	Significación			
T ₁₂	a ₂ b ₃	13.80	a			
T ₁₃	a ₃ b ₃	14.60	a			
T ₁₁	a ₁ b ₃	17.20	a	b		
T ₁₄	a ₄ b ₃	17.80	a	b	c	
T ₁₅	a ₅ b ₃	19.20	a	b	c	d
T ₁₀	a ₅ b ₂	21.40		b	c	d e
T ₉	a ₄ b ₂	22.20		b	c	d e
T ₆	a ₁ b ₂	24.00			c	d e f
T ₇	a ₂ b ₂	24.60				d e f
T ₂	a ₂ b ₁	24.60				d e f
T ₄	a ₄ b ₁	26.80				e f
T ₃	a ₃ b ₁	27.00				e f
T ₁	a ₁ b ₁	28.80				f
T ₈	a ₃ b ₂	28.80				f
T ₅	a ₅ b ₁	29.20				f

Tratamientos unidos por la misma letra en columna no existe diferencia estadística significativa.

a₁ = 0 mg/L de 2,4-D + 0 mg/L de Kinetina (Testigo)
a₂ = 0.25 mg/L de 2,4-D + 0.25 mg/L de Kinetina
a₃ = 0.50 mg/L de 2,4-D + 0.50 mg/L de Kinetina
a₄ = 1.0 mg/L de 2,4-D + 1.0 mg/L de Kinetina
a₅ = 2.0 mg/L de 2,4-D + 2.0 mg/L de Kinetina

b₁ = 0 mg/L de Malta
b₂ = 100 mg/L de Malta
b₃ = 200 mg/L de Malta

Según el Cuadro 18, para el clon IMC-67 los tratamientos T₁₁(a₁b₃), T₁₂ (a₂b₃), T₁₃ (a₃b₃), T₁₄ (a₄b₃), T₁₅ (a₅b₃), T₁₀ (a₅b₂), T₆ (a₁b₂), T₃ (a₃b₁), T₉ (a₄b₂), T₇ (a₂b₂), no se diferenciaron estadísticamente y lograron un menor tiempo en la formación de callos, al presentar valores de 21.2, 21.6, 22.6, 24, 24.4, 26.8, 27, 27 y 27.2 días respectivamente.

Pese a la variación de días en la formación de callos debido al medio de cultivo, dosis de hormonas y otros factores, estos resultados se encuentran en el rango encontrado por QUIMBITA (2011), quien obtuvo a los 28 días de iniciado

el experimento un porcentaje de formación de callos con estaminodios del 12 %, y a los 40 días un 32 %.

Cuadro 18. Prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) para tratamientos en el tiempo de formación de callos del ensayo II (IMC-67).

Clave	Tratamiento	Tiempo (días)	Significación			
T ₁₁	a ₁ b ₃	21.20	a			
T ₁₂	a ₂ b ₃	21.60	a			
T ₁₄	a ₄ b ₃	22.60	a	b		
T ₁₃	a ₃ b ₃	22.60	a	b		
T ₁₅	a ₅ b ₃	24.00	a	b	c	
T ₁₀	a ₅ b ₂	24.40	a	b	c	
T ₆	a ₁ b ₂	26.80	a	b	c	d
T ₉	a ₄ b ₂	27.00	a	b	c	d
T ₃	a ₃ b ₁	27.00	a	b	c	d
T ₇	a ₂ b ₂	27.20	a	b	c	d
T ₄	a ₄ b ₁	28.20		b	c	d e
T ₂	a ₂ b ₁	28.60		b	c	d e
T ₈	a ₃ b ₂	29.40			c	d e
T ₁	a ₁ b ₁	32.80				d e
T ₅	a ₅ b ₁	33.80				e

Tratamientos unidos por la misma letra en columna no existe diferencia estadística significativa.

a₁ = 0 mg/L de 2,4-D + 0 mg/L de Kinetina (Testigo)
a₂ = 0.25 mg/L de 2,4-D + 0.25 mg/L de Kinetina
a₃ = 0.50 mg/L de 2,4-D + 0.50 mg/L de Kinetina
a₄ = 1.0 mg/L de 2,4-D + 1.0 mg/L de Kinetina
a₅ = 2.0 mg/L de 2,4-D + 2.0 mg/L de Kinetina

b₁ = 0 mg/L de Malta
b₂ = 100 mg/L de Malta
b₃ = 200 mg/L de Malta

Este hecho coincide con LI *et al.* (1998) y CHANATÁSIG (2004), quienes encontraron durante las dos semanas de cultivos, que los clones PA169 y SCA6, mostraron formación del callo en diferente intensidad, en contraste con el clon IMC-67. Los explantes mostraron un menor desarrollo y la aparición de callos se formó en un mayor tiempo, este menor desarrollo pudiera ser debido a la respuesta genotípica de los clones con el medio de cultivo, se ha comprobado en algunos trabajos que existe variación con respecto a este parámetro.

Al menos durante las dos primeras semanas de cultivo, se pudo hallar callos en algunos tratamientos en el medio de inducción, los explantes (estaminodios) de los clones ISC-1, mostraron un aumento en tamaño y volumen y se volvieron turgentes, para luego dar lugar a la formación del callo en diferente intensidad.

En el Cuadro 19, según la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$), para el clon ISC-1, los niveles del factor A no mostraron diferencias estadísticas significativas, mientras que en los niveles del factor B, existió diferencias estadísticas significativas entre los niveles, siendo el nivel b_3 (Malta 200 mg/ml), quien ocupó el primer lugar al presentar el menor tiempo (16.52 días) en formación de callos.

Cuadro 19. Prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) para los efectos principales (A y B), en el tiempo de formación de callo del ensayo I (ICS-1).

Factor A (Reguladores hormonales)			Factor B (Malta)		
Dosis	Tiempo (días)	Sig.	Dosis	Tiempo (días)	Sig.
a ₂	21.00	a	b ₃	16.52	a
a ₄	22.27	a	b ₂	24.20	b
a ₅	23.27	a	b ₁	27.28	c
a ₁	23.33	a			
a ₃	23.47	a			

Tratamientos unidos por la misma letra en columna no existe diferencia estadística significativa.

a₁ = 0 mg/L de 2,4-D + 0 mg/L de Kinetina (Testigo)
a₂ = 0.25 mg/L de 2,4-D + 0.25 mg/L de Kinetina
a₃ = 0.50 mg/L de 2,4-D + 0.50 mg/L de Kinetina
a₄ = 1.0 mg/L de 2,4-D + 1.0 mg/L de Kinetina
a₅ = 2.0 mg/L de 2,4-D + 2.0 mg/L de Kinetina

b₁ = 0 mg/L de Malta
b₂ = 100 mg/L de Malta
b₃ = 200 mg/L de Malta

Según el Cuadro 20, para el clon IMC-67, el factor A (reguladores hormonales) no obtuvo diferencias significativas entre sus niveles, mientras que para el factor B (dosis de malta), los niveles resultaron estadísticamente altamente significativos, siendo el nivel b_3 (Malta 200 mg/L) quien tardo solamente 22.4 días para formar callos.

Cuadro 20. Prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) para los efectos principales (A y B), en el tiempo de formación de callo del ensayo II (IMC-67).

Factor A (Reguladores hormonales)			Factor B (Malta)		
Dosis	Tiempo (días)	Sig.	Dosis	Tiempo (días)	Sig.
a ₂	25.80	a	b ₃	22.40	a
a ₄	25.93	a	b ₂	26.96	b
a ₃	26.33	a	b ₁	30.08	c
a ₁	26.93	a			
a ₅	27.40	a			

Tratamientos unidos por la misma letra en columna no existe diferencia estadística significativa.

a₁ = 0 mg/L de 2,4-D + 0 mg/L de Kinetina (Testigo)
a₂ = 0.25 mg/L de 2,4-D + 0.25 mg/L de Kinetina
a₃ = 0.50 mg/L de 2,4-D + 0.50 mg/L de Kinetina
a₄ = 1.0 mg/L de 2,4-D + 1.0 mg/L de Kinetina
a₅ = 2.0 mg/L de 2,4-D + 2.0 mg/L de Kinetina

b₁ = 0 mg/L de Malta
b₂ = 100 mg/L de Malta
b₃ = 200 mg/L de Malta

En el Cuadro 21, muestra que en el análisis de variancia ($\alpha=0.05$) existe significancia estadística, es decir, que al menos uno de los niveles de cada factor influencio en el tiempo de formación de callos.

Cuadro 21. Análisis de variancia para los efectos simples para el factor A (reguladores hormonales) y factor B (malta) en el Tiempo de formación de callos del ensayo I y ensayo II.

Fuente de variación	GL	Ensayo I (ICS-1)		Ensayo II (IMC-67)	
		CM		CM	
A en b ₁	4	16.86	NS	45.56	AS
A en b ₂	4	41.50	AS	15.74	NS
A en b ₃	4	25.46	NS	5.90	NS
B en a ₁	2	169.87	AS	168.27	AS
B en a ₂	2	194.40	AS	68.60	AS
B en a ₃	2	298.87	AS	59.47	AS
B en a ₄	2	101.27	AS	43.47	S
B en a ₅	2	138.07	AS	153.80	AS
Error E	60	7.80		7.80	

NS: No existen diferencias estadísticas significativas.

AS: Existen diferencias estadísticas altamente significativas

a₁ = 0 mg/L de 2,4-D + 0 mg/L de Kinetina (Testigo)
a₂ = 0.25 mg/L de 2,4-D + 0.25 mg/L de Kinetina
a₃ = 0.50 mg/L de 2,4-D + 0.50 mg/L de Kinetina
a₄ = 1.0 mg/L de 2,4-D + 1.0 mg/L de Kinetina
a₅ = 2.0 mg/L de 2,4-D + 2.0 mg/L de Kinetina

b₁ = 0 mg/L de Malta
b₂ = 100 mg/L de Malta
b₃ = 200 mg/L de Malta

En la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) para los efectos simples que se muestra en el Cuadro 22, para el clon ICS-1 el factor A en b_2 los tratamientos a_5b_2 , a_4b_2 , a_1b_2 y a_2b_2 mostró tener un mejor efecto en la formación de callos, ya que fueron los que tuvieron menor tiempo. Mientras que para el clon IMC-67 el factor A en b_1 los tratamientos a_3b_1 , a_4b_1 y a_2b_1 son los que demostraron tener un mejor efecto en la formación de callos, ya que fueron éstos los que obtuvieron menores tiempos, con 27.0, 28.2 y 28.2 días. Al igual que para el tamaño de los callos, el tiempo de aparición de los callos estuvo diferenciada por los explantes de los clones, es así que los estaminodios del clon ICS-1 tardaron menor tiempo en formar callos que los del clon IMC – 67.

Cuadro 22. Prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) para los efectos simples (A en b_1 y A en b_2), en el tiempo de formación de callos del ensayo I (ICS-1) y ensayo II (IMC-67).

Ensayo I (ICS-1)			Ensayo II (IMC - 67)		
A en b_2			A en b_1		
Trat.	Tiempo (Días)	Significación	Trat.	Tiempo (Días)	Significación
a_5b_2	21.40	a	a_3b_1	27.00	a
a_4b_2	22.20	a	a_4b_1	28.20	a b
a_1b_2	24.00	a	a_2b_1	28.20	a b
a_2b_2	24.60	a b	a_1b_1	32.80	b c
a_3b_2	28.80	b	a_5b_1	33.80	c

Tratamientos unidos por la misma letra en columna no existe diferencia estadística significativa.

a_1 = 0 mg/L de 2,4-D + 0 mg/L de Kinetina (Testigo)
 a_2 = 0.25 mg/L de 2,4-D + 0.25 mg/L de Kinetina
 a_3 = 0.50 mg/L de 2,4-D + 0.50 mg/L de Kinetina
 a_4 = 1.0 mg/L de 2,4-D + 1.0 mg/L de Kinetina
 a_5 = 2.0 mg/L de 2,4-D + 2.0 mg/L de Kinetina

b_1 = 0 mg/L de Malta
 b_2 = 100 mg/L de Malta
 b_3 = 200 mg/L de Malta

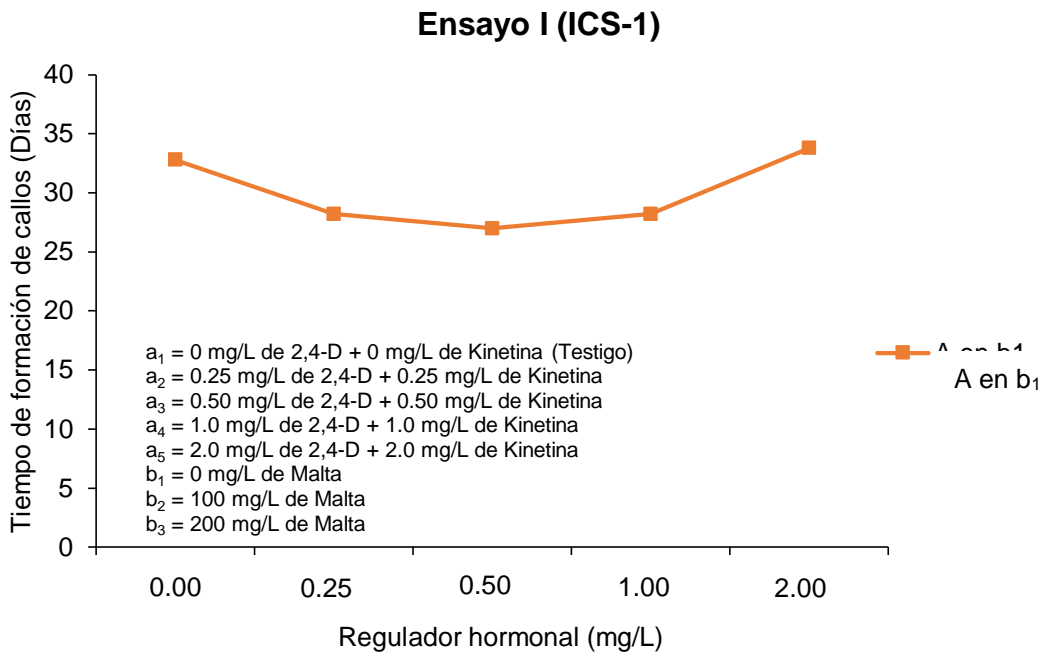


Figura 6. Efectos simples A en b_2 , en el tiempo de formación de callos en el clon ICS-1.

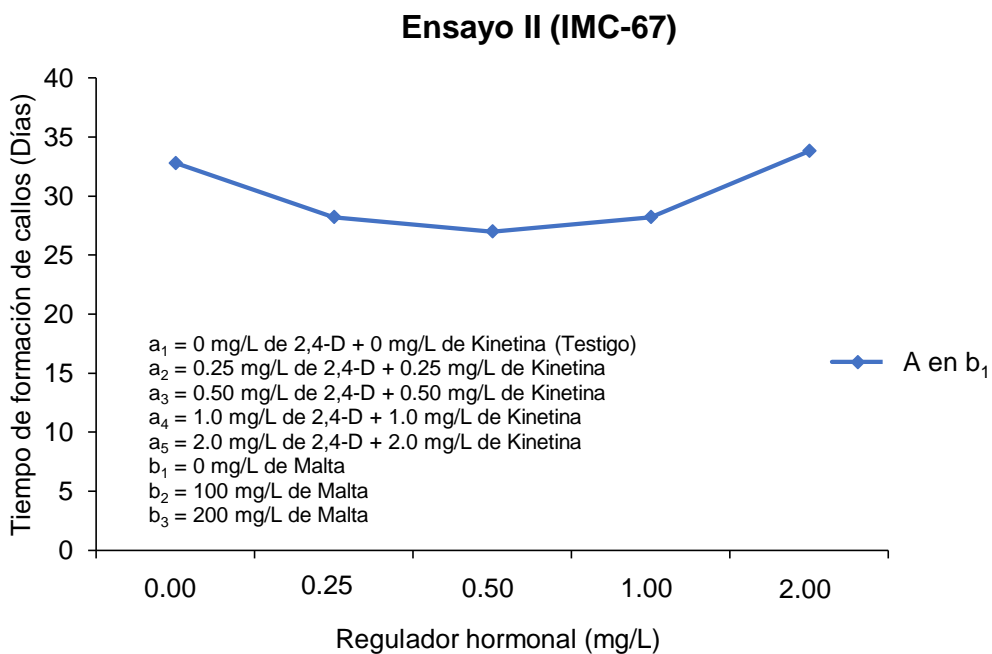


Figura 7. Efectos simples A en b_2 , en el tiempo de formación de callos en el clon IMC-67.

Sin embargo la diferenciación del tiempo de aparición de callos estuvo determinada por la dosis de (reguladores hormonales) + malta, las significancia de los efectos simples A en b_2 y A en b_1 , muestran que hay más influencia de las dosis de reguladores hormonales, debido a que no se le aplica el extracto de malta o cuando se le aplica una dosis media (100 mg/L), no obstante no se encuentra significancia cuando se aplica una dosis de 200 mg/L de malta, pero el tiempo de formación de callos es menor con respecto a las demás combinaciones entre los niveles.

Con respecto a la aplicación de reguladores hormonales ROCA y MROGINSKI (1991), destacan que en la fase de iniciación de callo se utiliza una alta concentración de auxina, normalmente 2,4-D o una combinación de auxina-citoquinina (Kinetina).

Con el objetivo de estimular la división celular e inducir en las células competencia embriogénica, por su parte GEORGE y SHERRINGTON (1984), afirma que en el proceso de embriogénesis somática frecuentemente se inicia en el medio conteniendo altos niveles de auxinas (especialmente 2,4-D) pero los embriones no desarrollarán más hasta que la concentración de auxinas es reducida.

Para poder observar el efecto simple en el tiempo de formación de callos del factor B, en los 5 niveles del factor A para los dos clones de cacao, el Cuadro 21, muestra en forma general que el factor B, con su tercera dosis de b_3 (Malta 200 mg/L), tuvo mejores respuestas en todos los niveles del factor A (a_1 , a_2 , a_3 , a_4 y a_5).

En los Cuadros 23 y 24, para el clon ICS-1 se resaltan los tratamientos con mejor respuesta, a_2b_3 (13.80 días) y a_3b_3 , (14.6 días), que muestran diferencias estadísticas significativas con cada uno de los tratamientos incluidos en los efectos de B en a_2 y B en a_3 respectivamente, mientras que para el clon IMC – 67, las mejores respuestas lo obtuvieron de las combinaciones a_1b_3 (21.2 días) y a_2b_3 (21.6 días), al mismo tiempo que presentan diferencias significativas para los efectos de B en a_1 y B en a_2 respectivamente.

Cuadro 23. Prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) para los efectos simples del Factor B en a, en el tiempo de formación de callos en el clon ICS-I.

Ensayo I (ICS-1)		
Factor B en a_1 (0 mg/L de 2,4-D + 0 mg/L de Kinetina)		
Tratamiento	Tiempo (días)	Significación
b_3 : 200 mg/L de Malta	17.20	a
b_2 : 100 mg/L de Malta	24.00	b
b_1 : 0 mg/L de Malta	28.80	b
Factor B en a_2 (0.25 mg/L de 2,4-D + 0.25 mg/L de Kinetina)		
Tratamiento	Tiempo (días)	Significación
b_3 : 200 mg/L de Malta	13.80	a
b_1 : 0 mg/L de Malta	24.60	b
b_2 : 100 mg/L de Malta	24.60	b
Factor B en a_3 (0.50 mg/L de 2,4-D + 0.50 mg/L de Kinetina)		
Tratamiento	Tiempo (días)	Significación
b_3 : 200 mg/L de Malta	14.60	a
b_1 : 0 mg/L de Malta	27.00	b
b_2 : 100 mg/L de Malta	28.80	b
Factor B en a_4 (1.0 mg/L de 2,4-D + 1.0 mg/L de Kinetina)		
Tratamiento	Tiempo (días)	Significación
b_3 : 200 mg/L de Malta	17.80	a
b_2 : 100 mg/L de Malta	22.20	a
b_1 : 0 mg/L de Malta	26.80	b
Factor B en a_5 (2.0 mg/L de 2,4-D + 2.0 mg/L de Kinetina)		
Tratamiento	Tiempo (días)	Significación
b_3 : 200 mg/L de Malta	19.20	a
b_2 : 100 mg/L de Malta	21.40	a
b_1 : 0 mg/L de Malta	29.20	b

Tratamientos unidos por la misma letra en columna no existe diferencia estadística significativa.

a_1 = 0 mg/L de 2,4-D + 0 mg/L de Kinetina (Testigo)
 a_2 = 0.25 mg/L de 2,4-D + 0.25 mg/L de Kinetina
 a_3 = 0.50 mg/L de 2,4-D + 0.50 mg/L de Kinetina
 a_4 = 1.0 mg/L de 2,4-D + 1.0 mg/L de Kinetina
 a_5 = 2.0 mg/L de 2,4-D + 2.0 mg/L de Kinetina

b_1 = 0 mg/L de Malta
 b_2 = 100 mg/L de Malta
 b_3 = 200 mg/L de Malta

Cuadro 24. Prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) para los efectos simples del Factor B en a, en el tiempo de formación de callos en el clon IMC-67.

Ensayo II (IMC – 67)		
Factor B en a₁ (0 mg/L de 2,4-D + 0 mg/L de Kinetina)		
Tratamiento	Tiempo (días)	Significación
b ₃ : 200 mg/L de Malta	21.20	a
b ₂ : 100 mg/L de Malta	26.80	b
b ₁ : 0 mg/L de Malta	32.80	c
Factor B en a₂ (0.25 mg/L de 2,4-D + 0.25 mg/L de Kinetina)		
Tratamiento	Tiempo (Días)	Significación
b ₃ : 200 mg/L de Malta	21.60	a
b ₂ : 100 mg/L de Malta	27.20	b
b ₁ : 0 mg/L de Malta	28.60	b
Factor B en a₃ (0.50 mg/L de 2,4-D + 0.50 mg/L de Kinetina)		
Tratamiento	Tiempo (días)	Significación
b ₃ : 200 mg/L de Malta	22.60	a
b ₁ : 0 mg/L de Malta	27.00	b
b ₂ : 100 mg/L de Malta	29.40	b
Factor B en a₄ (1.0 mg/L de 2,4-D + 1.0 mg/L de Kinetina)		
Tratamiento	Tiempo (días)	Significación
b ₃ : 200 mg/L de Malta	22.60	a
b ₂ : 100 mg/L de Malta	27.00	a b
b ₁ : 0 mg/L de Malta	28.20	b
Factor B en a₅ (2.0 mg/L de 2,4-D + 2.0 mg/L de Kinetina)		
Tratamiento	Tiempo (días)	Significación
b ₃ : 200 mg/L de Malta	24.00	a
b ₂ : 100 mg/L de Malta	24.40	a
b ₁ : 0 mg/L de Malta	33.80	b

Tratamientos unidos por la misma letra en columna no existe diferencia estadística significativa.

a₁ = 0 mg/L de 2,4-D + 0 mg/L de Kinetina (Testigo)
a₂ = 0.25 mg/L de 2,4-D + 0.25 mg/L de Kinetina
a₃ = 0.50 mg/L de 2,4-D + 0.50 mg/L de Kinetina
a₄ = 1.0 mg/L de 2,4-D + 1.0 mg/L de Kinetina
a₅ = 2.0 mg/L de 2,4-D + 2.0 mg/L de Kinetina

b₁ = 0 mg/L de Malta
b₂ = 100 mg/L de Malta
b₃ = 200 mg/L de Malta

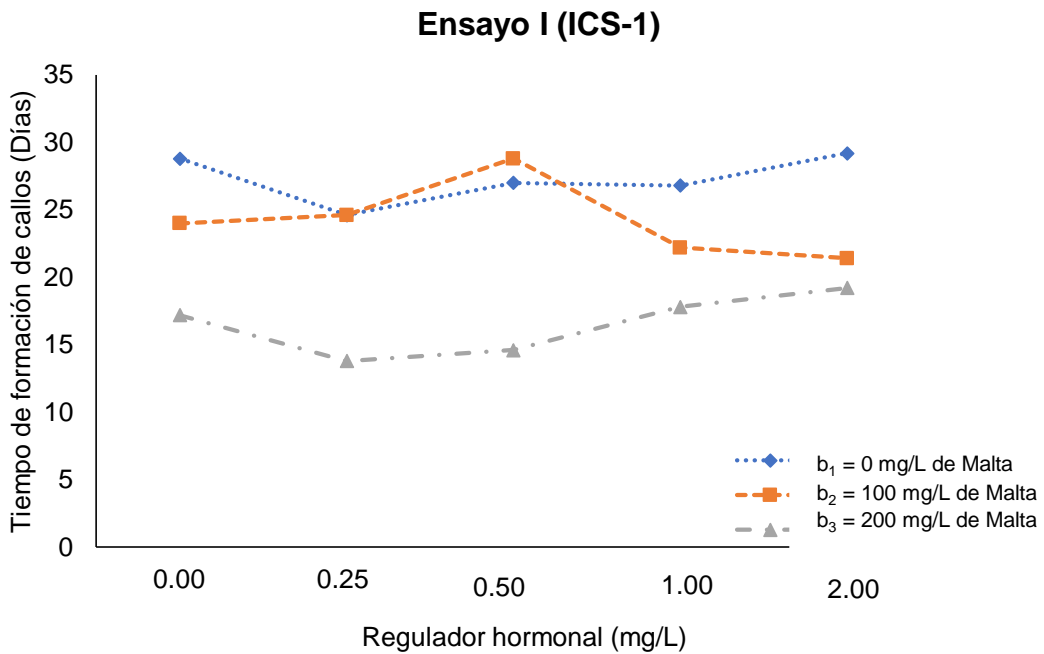


Figura 8. Efectos simples A en b_2 , en el tiempo de formación de callos en el clon ICS-1.

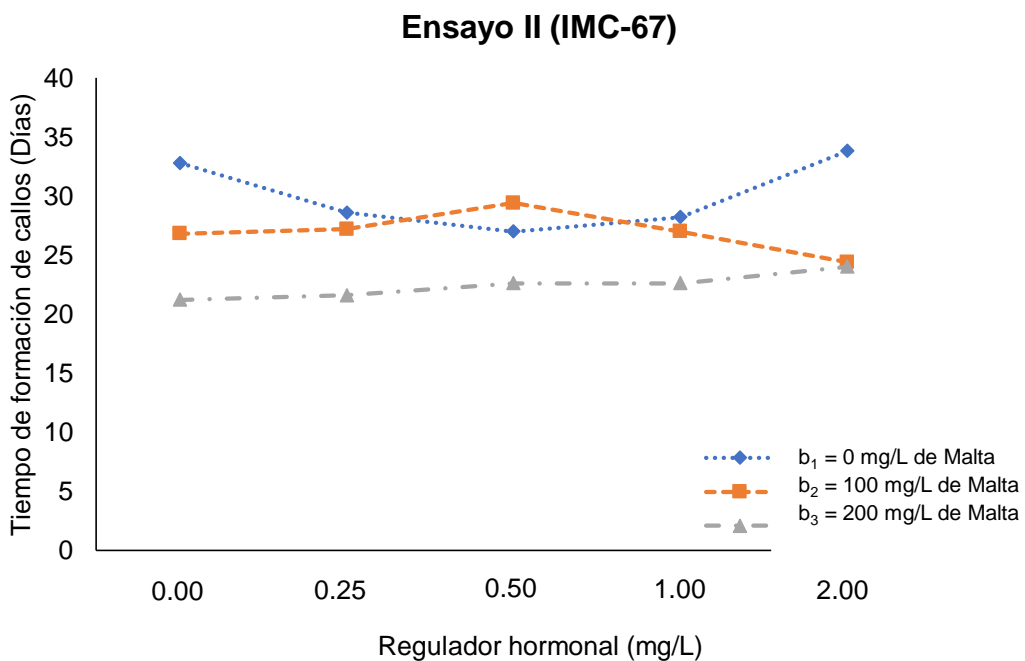


Figura 9. Efectos simples A en b_2 , en el tiempo de formación de callos en el clon IMC-67.

4.3. Número de estructuras pro embriogénicas

Para el número de estructuras pro embriogénicas que tomó (unidades) en formar a cada clon de cacao, se observa en el Cuadro 25, donde se muestra que existe alta significancia estadística tanto para los tratamientos, los factores (A y B) y como para la interacción de A x B. El coeficiente de variabilidad fue de 14.24 y 12.14 % para los clones ICS-1 e IMC-67 respectivamente.

Cuadro 25. Análisis de variancia para el numero de estructuras proembriogénicas del ensayo I (ICS-I) y ensayo II (IMC-67).

Fuente de variación	GL	Ensayo I (ICS-1)		Ensayo II (IMC-67)	
		CM	AS	CM	AS
Tratamientos	14	3.10	AS	1.45	AS
A Dosis (Reguladores hormonales)	4	2.53	AS	1.43	AS
B Dosis (Malta)	2	7.85	AS	3.57	AS
A x B	8	2.20	AS	0.92	AS
Error experimental	60	0.06		0.03	
Total	74				
C.V. (%)		14.24		12.14	

AS: Existe diferencia estadística altamente significativa.

Al realizar la comparación de medias para el tiempo transcurrido hasta la formación de estructuras, podemos ver en el Cuadro 26, que para el clon ICS-1 el número de estructuras fluctuó desde el tratamiento T₁₃ (a₃b₃) a T₄ (a₄b₁) cuyos valores son 3.6 a 0.6 unidades respectivamente, este último a su vez no tuvo diferencias estadísticas con los tratamientos T₈ (a₃b₂), T₃ (a₃b₁) y T₁ (a₁b₁).

Esta variación del número de estructuras al igual que la formación de callos estuvo influenciada por las distintas concentraciones de reguladores hormonales y de malta, al respecto DEL SOL *et al.* (2001), mencionaron que la cantidad de

estructuras pro embrionarias en callos es relativa, debido a las diferentes respuestas de los tejidos ante las mismas o concentraciones de 2,4-D.

Cuadro 26. Prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) para el número de estructuras proembriogénicas del ensayo I (ICS-1).

Clave	Tratamiento	Número de estructuras	Significación
T ₁₃	a ₃ b ₃	3.60	a
T ₁₂	a ₂ b ₃	2.60	b
T ₇	a ₂ b ₂	2.40	b c
T ₁₀	a ₅ b ₂	2.00	c d
T ₁₁	a ₁ b ₃	2.00	c d
T ₅	a ₅ b ₁	1.80	d e
T ₁₅	a ₅ b ₃	1.60	d e
T ₂	a ₂ b ₁	1.60	d e
T ₉	a ₄ b ₂	1.40	e f
T ₆	a ₁ b ₂	1.40	e f
T ₁₄	a ₄ b ₃	1.40	e f
T ₈	a ₃ b ₂	1.00	f g
T ₃	a ₃ b ₁	0.80	g
T ₁	a ₁ b ₁	0.80	g
T ₄	a ₄ b ₁	0.60	g

Tratamientos unidos por la misma letra en columna no existe diferencia estadística significativa.

a₁ = 0 mg/L de 2,4-D + 0 mg/L de Kinetina (Testigo)
a₂ = 0.25 mg/L de 2,4-D + 0.25 mg/L de Kinetina
a₃ = 0.50 mg/L de 2,4-D + 0.50 mg/L de Kinetina
a₄ = 1.0 mg/L de 2,4-D + 1.0 mg/L de Kinetina
a₅ = 2.0 mg/L de 2,4-D + 2.0 mg/L de Kinetina

b₁ = 0 mg/L de Malta
b₂ = 100 mg/L de Malta
b₃ = 200 mg/L de Malta

Según el cuadro 27, las estructuras formadas a partir de estaminodios del clon IMC-67, los tratamientos T₁₃ (a₃b₃) y T₁₂ (a₂b₃) mostraron mayor formación de estructuras al presentar valores de 2.8 y 2.4 unidades respectivamente.

Cuadro 27. Prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) para el número de estructuras proembriogénicas en el ensayo II (IMC-67).

Clave	Tratamiento	Número de estructuras	Significación			
T ₁₃	a ₃ b ₃	2.80	a			
T ₁₂	a ₂ b ₃	2.40	a	b		
T ₁₁	a ₁ b ₃	2.20	b		c	
T ₇	a ₂ b ₂	1.80	c			d
T ₂	a ₂ b ₁	1.60	d			e
T ₉	a ₄ b ₂	1.40	d		e	f
T ₁₀	a ₅ b ₂	1.40	d		e	f
T ₁₄	a ₄ b ₃	1.40	d		e	f
T ₁	a ₁ b ₁	1.20	e			f
T ₃	a ₃ b ₁	1.20	e			f
T ₅	a ₅ b ₁	1.20	e			f
T ₈	a ₃ b ₂	1.20	e			f
T ₆	a ₁ b ₂	1.20	e			f
T ₁₅	a ₅ b ₃	1.00	f			
T ₄	a ₄ b ₁	1.00	f			

Tratamientos unidos por la misma letra en columna no existe diferencia estadística significativa.

a₁ = 0 mg/L de 2,4-D + 0 mg/L de Kinetina (Testigo)
a₂ = 0.25 mg/L de 2,4-D + 0.25 mg/L de Kinetina
a₃ = 0.50 mg/L de 2,4-D + 0.50 mg/L de Kinetina
a₄ = 1.0 mg/L de 2,4-D + 1.0 mg/L de Kinetina
a₅ = 2.0 mg/L de 2,4-D + 2.0 mg/L de Kinetina

b₁ = 0 mg/L de Malta
b₂ = 100 mg/L de Malta
b₃ = 200 mg/L de Malta

En el Cuadro 28, según la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) el efecto principal, del ensayo I (ICS.1) para el factor A, el nivel a₂ (dosis de 2,4-D 0.5 mg/L + Kinetina 0.5 mg/L), mostro una mayor capacidad de formación de estructuras, diferenciándose estadísticamente con los demás niveles, cuyo valor es de 2.2 unidades, mientras que en los niveles del factor B, el nivel b₃ (Malta (200 mg/L)), resulto con un mayor número y diferenciándose estadísticamente con los demás niveles, esta alcanzo un valor de 2.24 unidades.

Cuadro 28. Prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) para los efectos principales (A y B), para el número de estructuras del ensayo I (ICS-1).

Factor A (Reguladores hormonales)			Factor B (Malta)		
Nivel	N°	Significación	Nivel	N°	Significación
a ₂	2.20	a	b ₃	2.24	a
a ₅	1.80	b	b ₂	1.64	b
a ₃	1.80	b	b ₁	1.12	c
a ₁	1.40	c			
a ₄	1.13	d			

Tratamientos unidos por la misma letra en columna no existe diferencia estadística significativa.

a₁ = 0 mg/L de 2,4-D + 0 mg/L de Kinetina (Testigo)
a₂ = 0.25 mg/L de 2,4-D + 0.25 mg/L de Kinetina
a₃ = 0.50 mg/L de 2,4-D + 0.50 mg/L de Kinetina
a₄ = 1.0 mg/L de 2,4-D + 1.0 mg/L de Kinetina
a₅ = 2.0 mg/L de 2,4-D + 2.0 mg/L de Kinetina

b₁ = 0 mg/L de Malta
b₂ = 100 mg/L de Malta
b₃ = 200 mg/L de Malta

Por otro lado, el Cuadro 29, similares resultados fueron obtenidos a partir de estaminodios del clon IMC-67, donde los niveles a₂ y b₃ resultaron con una mayor capacidad de formación de estructuras al presentar valores de 1.93 y 1.96 unidades respectivamente, siendo las concentraciones más altas las que obtuvieron mayor número de estructuras.

Cuadro 29. Prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) para los efectos principales (A y B), para el número de estructuras del ensayo II (IMC-67).

Factor A (Reguladores hormonales)			Factor B (Malta)		
Nivel	N°	Significación	Nivel	N°	Significación
a ₂	1.93	a	b ₃	1.96	a
a ₃	1.73	b	b ₂	1.40	b
a ₁	1.53	c	b ₁	1.24	c
a ₄	1.27	d			
a ₅	1.20	d			

Tratamientos unidos por la misma letra en columna no existe diferencia estadística significativa.

a₁ = 0 mg/L de 2,4-D + 0 mg/L de Kinetina (Testigo)
a₂ = 0.25 mg/L de 2,4-D + 0.25 mg/L de Kinetina
a₃ = 0.50 mg/L de 2,4-D + 0.50 mg/L de Kinetina
a₄ = 1.0 mg/L de 2,4-D + 1.0 mg/L de Kinetina
a₅ = 2.0 mg/L de 2,4-D + 2.0 mg/L de Kinetina

b₁ = 0 mg/L de Malta
b₂ = 100 mg/L de Malta
b₃ = 200 mg/L de Malta

En el Cuadro 30 muestra que en el análisis de variancia ($\alpha=0.05$), para los efectos simples donde se observa que existe significancia estadística, es decir, que al menos un nivel de un factor influencio al otro nivel de otro factor, en la formación de estructuras pro embriogénicas.

Cuadro 30. Análisis de variancia para los efectos simples en el número de estructuras proembriogénicas para el factor A (reguladores hormonales) y factor B (malta) del ensayo I y ensayo II.

Fuente de variación	GL	Ensayo I (ICS-1)	Ensayo II (IMC-67)
		CM	CM
A en b_1	4	1.46 AS	0.24 AS
A en b_2	4	1.54 AS	0.30 AS
A en b_3	4	3.94 AS	2.74 AS
B en a_1	2	1.80 AS	1.67 AS
B en a_2	2	1.40 AS	0.87 AS
B en a_3	2	12.20 AS	4.27 AS
B en a_4	2	1.07 AS	0.27 AS
B en a_5	2	0.20 S	0.20 S
Error E	60	0.06	0.04

AS: Existe diferencia estadística altamente significativa.
S: Diferencia estadística al 1 % de probabilidad.

a_1 = 0 mg/L de 2,4-D + 0 mg/L de Kinetina (Testigo)
 a_2 = 0.25 mg/L de 2,4-D + 0.25 mg/L de Kinetina
 a_3 = 0.50 mg/L de 2,4-D + 0.50 mg/L de Kinetina
 a_4 = 1.0 mg/L de 2,4-D + 1.0 mg/L de Kinetina
 a_5 = 2.0 mg/L de 2,4-D + 2.0 mg/L de Kinetina

b_1 = 0 mg/L de Malta
 b_2 = 100 mg/L de Malta
 b_3 = 200 mg/L de Malta

Los efectos simples en el número de estructuras proembriogénicas se presentan en el Cuadro 31, donde el primer ensayo con estaminodios del clon ICS-1, muestra que para el efecto de A en b_1 los tratamientos a_2b_1 y a_5b_1 resultaron con mayor número de estructuras con valores de 1.6 y 1.8 unidades respectivamente, similares resultados se obtuvieron para el efecto de A en b_2 , mientras que para el efecto A en b_3 , los que sobresalieron fueron el a_2b_3 y a_3b_3 quienes alcanzaron valores de 2.6 y 3.6 unidades respectivamente.

Cuadro 31. Prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) para los efectos simples del Factor A en b, para el número de estructuras proembriónicas del clon ICS-1.

Ensayo I (ICS-1)		
Factor A en b₁ (0 mg/L de Malta)		
Tratamiento	N° estructuras	Significación
a ₅ : 2.0 mg/L de 2,4-D + 2.0 mg/L de Kinetina	1.80	a
a ₂ : 0.25 mg/L de 2,4-D + 0.25 mg/L de Kinetina	1.60	a
a ₃ : 0.50 mg/L de 2,4-D + 0.50 mg/L de Kinetina	0.80	b
a ₁ : 0 mg/L de 2,4-D + 0 mg/L de Kinetina	0.80	b
a ₄ : 1.0 mg/L de 2,4-D + 1.0 mg/L de Kinetina	0.60	b
Factor A en b₂ (100 mg/L de Malta)		
Tratamiento	N° estructuras	Significación
a ₂ : 0.25 mg/L de 2,4-D + 0.25 mg/L de Kinetina	2.40	a
a ₅ : 2.0 mg/L de 2,4-D + 2.0 mg/L de Kinetina	2.00	a
a ₁ : 0 mg/L de 2,4-D + 0 mg/L de Kinetina	1.40	b
a ₄ : 1.0 mg/L de 2,4-D + 1.0 mg/L de Kinetina	1.40	b
a ₃ : 0.50 mg/L de 2,4-D + 0.50 mg/L de Kinetina	1.00	b
Factor A en b₃ (200 mg/L de Malta)		
Tratamiento	N° estructuras	Significación
a ₃ : 0.50 mg/L de 2,4-D + 0.50 mg/L de Kinetina	3.60	a
a ₂ : 0.25 mg/L de 2,4-D + 0.25 mg/L de Kinetina	2.60	b
a ₁ : 0 mg/L de 2,4-D + 0 mg/L de Kinetina	2.00	c
a ₅ : 2.0 mg/L de 2,4-D + 2.0 mg/L de Kinetina	1.60	c d
a ₄ : 1.0 mg/L de 2,4-D + 1.0 mg/L de Kinetina	1.40	d

Tratamientos unidos por la misma letra en columna no existe diferencia estadística significativa.

a₁ = 0 mg/L de 2,4-D + 0 mg/L de Kinetina (Testigo)
a₂ = 0.25 mg/L de 2,4-D + 0.25 mg/L de Kinetina
a₃ = 0.50 mg/L de 2,4-D + 0.50 mg/L de Kinetina
a₄ = 1.0 mg/L de 2,4-D + 1.0 mg/L de Kinetina
a₅ = 2.0 mg/L de 2,4-D + 2.0 mg/L de Kinetina

b₁ = 0 mg/L de Malta
b₂ = 100 mg/L de Malta
b₃ = 200 mg/L de Malta

Cuadro 32. Prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) para los efectos simples del Factor A en b, para el número de estructuras proembriogénicas del clon IMC-67.

Ensayo II (IMC – 67)		
Factor A en b₁ (0 mg/L de Malta)		
Tratamiento	N° Estructuras	Significación
a ₂ : 0.25 mg/L de 2,4-D + 0.25 mg/L de Kinetina	1.60	a
a ₅ : 2.0 mg/L de 2,4-D + 2.0 mg/L de Kinetina	1.20	b
a ₃ : 0.50 mg/L de 2,4-D + 0.50 mg/L de Kinetina	1.20	b
a ₁ : 0 mg/L de 2,4-D + 0 mg/L de Kinetina	1.20	b
a ₄ : 1.0 mg/L de 2,4-D + 1.0 mg/L de Kinetina	1.00	b
Factor A en b₂ (100 mg/L de Malta)		
Tratamiento	N° Estructuras	Significación
a ₂ : 0.25 mg/L de 2,4-D + 0.25 mg/L de Kinetina	1.80	a
a ₅ : 2.0 mg/L de 2,4-D + 2.0 mg/L de Kinetina	1.40	b
a ₄ : 1.0 mg/L de 2,4-D + 1.0 mg/L de Kinetina	1.40	b
a ₃ : 0.50 mg/L de 2,4-D + 0.50 mg/L de Kinetina	1.20	b
a ₁ : 0 mg/L de 2,4-D + 0 mg/L de Kinetina	1.20	b
Factor A en b₃ (200 mg/L de Malta)		
Tratamiento	N° Estructuras	Significación
a ₃ : 0.50 mg/L de 2,4-D + 0.50 mg/L de Kinetina	2.80	a
a ₂ : 0.25 mg/L de 2,4-D + 0.25 mg/L de Kinetina	2.40	b
a ₁ : 0 mg/L de 2,4-D + 0 mg/L de Kinetina	2.20	b
a ₄ : 1.0 mg/L de 2,4-D + 1.0 mg/L de Kinetina	1.40	c
a ₅ : 2.0 mg/L de 2,4-D + 2.0 mg/L de Kinetina	1.00	d

Tratamientos unidos por la misma letra en columna no existe diferencia estadística significativa.

a₁ = 0 mg/L de 2,4-D + 0 mg/L de Kinetina (Testigo)
a₂ = 0.25 mg/L de 2,4-D + 0.25 mg/L de Kinetina
a₃ = 0.50 mg/L de 2,4-D + 0.50 mg/L de Kinetina
a₄ = 1.0 mg/L de 2,4-D + 1.0 mg/L de Kinetina
a₅ = 2.0 mg/L de 2,4-D + 2.0 mg/L de Kinetina

b₁ = 0 mg/L de Malta
b₂ = 100 mg/L de Malta
b₃ = 200 mg/L de Malta

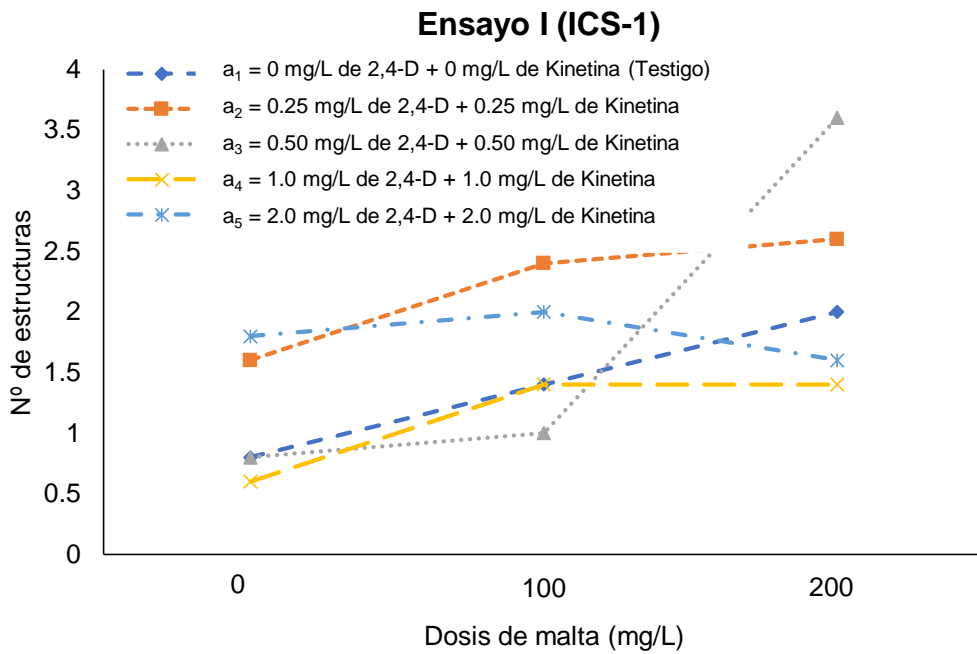


Figura 10. Efectos simples del Factor A en b, para el número de estructuras proembriónicas en el clon ICS-1.

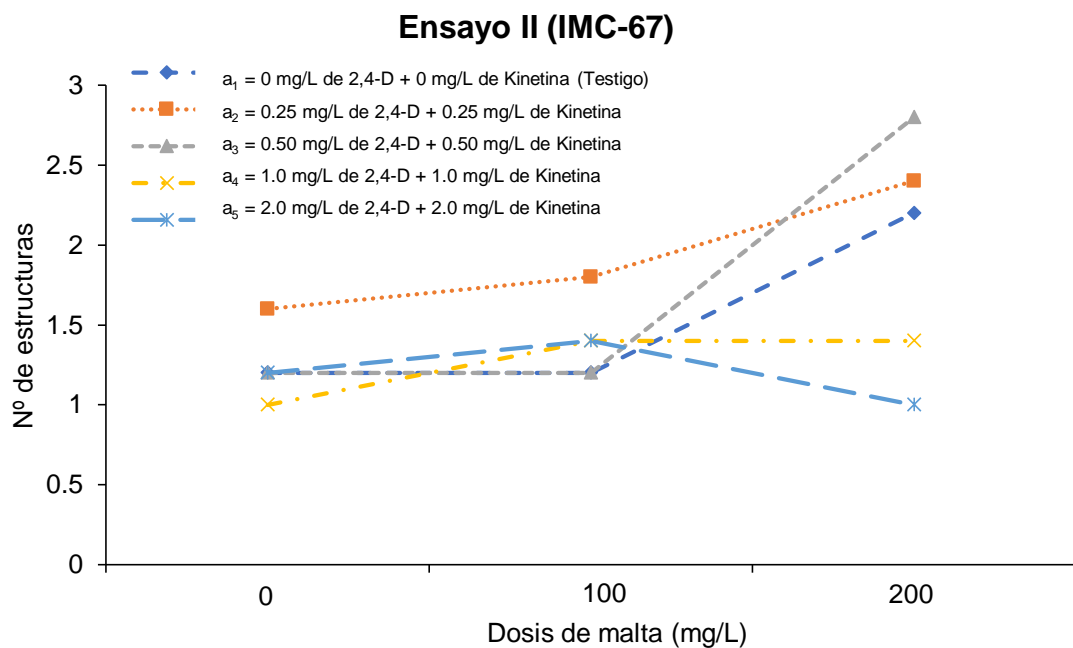


Figura 11. Efectos simples del Factor A en b, para el número de estructuras proembriónicas en el clon IMC-67.

Para la formación de estructuras a partir de estaminodios del clon IMC – 67, en el cuadro 32, el efecto de A en b, estadísticamente muestran que para el efecto de A en b_1 y A en b_2 , los tratamientos combinados con el nivel a_2 , resultó con un mayor número de estructuras; mientras que para el efecto de A en b_3 el mejor tratamiento fue a_3b_3 , el cual resultó con un valor de 2.8 unidades.

En forma general el factor A y el factor B estadísticamente influenciaron en el número de estructuras formadas a partir en los explantes de los clones ICS-1 e IMC – 67.

La aplicación de reguladores hormonales resulta favorable para el desarrollo de los embriones somáticos y por ende la aparición de estructuras proembriogénicas, no obstante, se puede observar que para los efectos simples de A en b_3 .

Las concentraciones altas redujeron la formación de las estructuras, lo que no sucede con los demás tratamientos donde las concentraciones de malta fueron bajas, por lo que se pensaría que las aplicaciones de malta + reguladores hormonales en altas concentraciones tuvieron un efecto negativo en la formación de estructuras y que por lo menos este nivel coinciden con BERAUN (2014) en ensayos con explantes de papayo, encontró que para el tiempo de aparición de estructuras proembrionarias la glutamina prolongó el tiempo a 77 días y para el número de estructuras, fue el extracto de malta, la que tuvo la menor cantidad con solo 1.2 estructuras en promedio.

Asimismo, LÓPEZ *et al.* (2001), encontraron que la maltosa no produce calogénesis. Sin embargo, no solamente las citocininas y auxinas influyen sobre el nivel de expresión de la embriogénesis en cacao.

Ya que los resultados obtenidos llegan a variar dependiendo también de otros factores que influyeron en los resultados, como el genotipo y las condiciones del medio, como lo indican ELHAG *et al.* (1988), SONDAHL *et al.* (1993), ALEMANNIO (1995), LI *et al.* (1998), LÓPEZ *et al.* (2001) y CHANATASIG (2004).

De esta manera una vez más se observa que la respuesta embriogénica depende de la acción de más de un factor .

Para poder observar el efecto simple en la formación de numero de estructuras proembriogénicas del factor B en los cinco niveles del factor A para los dos clones de cacao, en los Cuadros 33 y 34, estadísticamente muestran en forma general que el factor B, con su tercera dosis de b_3 (Malta 200 mg/L), tuvo mejores respuestas en todos los niveles del factor A (a_1 , a_2 , a_3 y a_4); con excepción del efecto del factor B en interacción con el nivel a_5 donde se encontró que el tratamiento a_5b_2 fue la que obtuvo mayor número de estructuras pro embriogénicas.

Para el clon ICS-1 se resaltan los tratamientos con mejor respuesta, en el Cuadro 33, a_2b_3 (2.6 unidades) y a_3b_3 , (3.6 unidades), que muestran diferencias estadísticas significativas con cada uno de los tratamientos incluidos en los efectos de B en a_2 y B en a_3 respectivamente.

Mientras que para el clon IMC – 67, (Cuadro 34) las mejores respuestas para la formación embriones fueron los tratamientos a_2b_3 (2.4 unidades) y a_3b_3 (2.8 unidades), al mismo tiempo que presentan diferencias significativas para los efectos de B en a_1 y B en a_3 respectivamente.

Cuadro 33. Prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) para los efectos simples del Factor B en a, en el número de estructuras proembriogénicas en el clon ICS-1.

Ensayo I (ICS-1)		
Factor B en a₁ (0 mg/L de 2,4-D + 0 mg/L de Kinetina)		
Tratamiento	N° Estructuras	Significación
b ₃ : 200 mg/L de Malta	2.00	a
b ₂ : 100 mg/L de Malta	1.40	b
b ₁ : 0 mg/L de Malta	0.80	c
Factor B en a₂ (0.25 mg/L de 2,4-D + 0.25 mg/L de Kinetina)		
Tratamiento	N° Estructuras	Significación
b ₃ : 200 mg/L de Malta	2.60	a
b ₂ : 100 mg/L de Malta	2.40	a
b ₁ : 0 mg/L de Malta	1.60	b
Factor B en a₃ (0.50 mg/L de 2,4-D + 0.50 mg/L de Kinetina)		
Tratamiento	N° Estructuras	Significación
b ₃ : 200 mg/L de Malta	3.60	a
b ₂ : 100 mg/L de Malta	1.00	b
b ₁ : 0 mg/L de Malta	0.80	b
Factor B en a₄ (1.0 mg/L de 2,4-D + 1.0 mg/L de Kinetina)		
Tratamiento	N° Estructuras	Significación
b ₃ : 200 mg/L de Malta	1.40	a
b ₂ : 100 mg/L de Malta	1.40	a
b ₁ : 0 mg/L de Malta	0.60	b
Factor B en a₅ (2.0 mg/L de 2,4-D + 2.0 mg/L de Kinetina)		
Tratamiento	N° Estructuras	Significación
b ₂ : 100 mg/L de Malta	2.00	a
b ₁ : 0 mg/L de Malta	1.80	b
b ₃ : 200 mg/L de Malta	1.60	b

Tratamientos unidos por la misma letra en columna no existe diferencia estadística significativa.

a₁ = 0 mg/L de 2,4-D + 0 mg/L de Kinetina (Testigo)
a₂ = 0.25 mg/L de 2,4-D + 0.25 mg/L de Kinetina
a₃ = 0.50 mg/L de 2,4-D + 0.50 mg/L de Kinetina
a₄ = 1.0 mg/L de 2,4-D + 1.0 mg/L de Kinetina
a₅ = 2.0 mg/L de 2,4-D + 2.0 mg/L de Kinetina

b₁ = 0 mg/L de Malta
b₂ = 100 mg/L de Malta
b₃ = 200 mg/L de Malta

Cuadro 34. Prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) para los efectos simples del Factor B en a, en el número de estructuras proembriogénicas del clon IMC-67.

Ensayo II (IMC – 67)		
Factor B en a₁ (0 mg/L de 2,4-D + 0 mg/L de Kinetina)		
Tratamiento	N° Estructuras	Significación
b ₃ : 200 mg/L de Malta	2.20	a
b ₂ : 100 mg/L de Malta	1.20	b
b ₁ : 0 mg/L de Malta	1.20	b
Factor B en a₂ (0.25 mg/L de 2,4-D + 0.25 mg/L de Kinetina)		
Tratamiento	N° Estructuras	Significación
b ₃ : 200 mg/L de Malta	2.40	a
b ₂ : 100 mg/L de Malta	1.80	b
b ₁ : 0 mg/L de Malta	1.60	b
Factor B en a₃ (0.50 mg/L de 2,4-D + 0.50 mg/L de Kinetina)		
Tratamiento	N° Estructuras	Significación
b ₃ : 200 mg/L de Malta	2.80	a
b ₂ : 100 mg/L de Malta	1.20	b
b ₁ : 0 mg/L de Malta	1.20	b
Factor B en a₄ (1.0 mg/L de 2,4-D + 1.0 mg/L de Kinetina)		
Tratamiento	N° Estructuras	Significación
b ₃ : 200 mg/L de Malta	1.40	a
b ₂ : 100 mg/L de Malta	1.40	a
b ₁ : 0 mg/L de Malta	1.00	b
Factor B en a₅ (2.0 mg/L de 2,4-D + 2.0 mg/L de Kinetina)		
Tratamiento	N° Estructuras	Significación
b ₂ : 100 mg/L de Malta	1.40	a
b ₁ : 0 mg/L de Malta	1.20	b
b ₃ : 200 mg/L de Malta	1.00	b

Tratamientos unidos por la misma letra en columna no existe diferencia estadística significativa.

a₁ = 0 mg/L de 2,4-D + 0 mg/L de Kinetina (Testigo)
a₂ = 0.25 mg/L de 2,4-D + 0.25 mg/L de Kinetina
a₃ = 0.50 mg/L de 2,4-D + 0.50 mg/L de Kinetina
a₄ = 1.0 mg/L de 2,4-D + 1.0 mg/L de Kinetina
a₅ = 2.0 mg/L de 2,4-D + 2.0 mg/L de Kinetina

b₁ = 0 mg/L de Malta
b₂ = 100 mg/L de Malta
b₃ = 200 mg/L de Malta

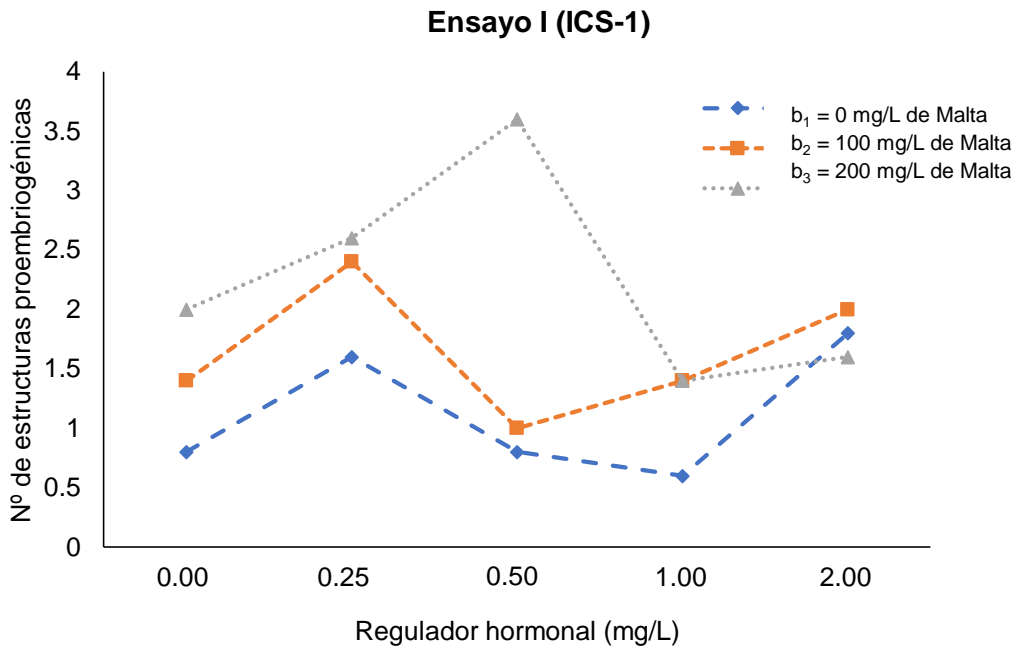


Figura 12. Efectos simples del Factor B en a, para el número de estructuras proembriónicas en el clon ICS-1.

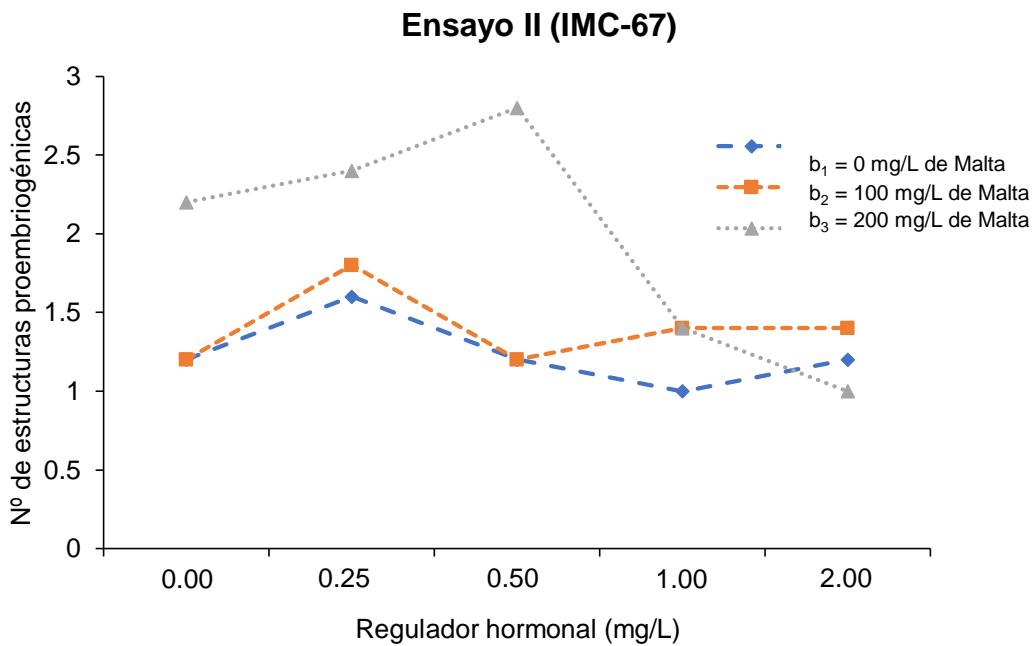


Figura 13. Efectos simples del Factor B en a, para el número de estructuras proembriónicas en el clon IMC-67.

4.4. Tiempo de aparición de embriones somáticos

El tiempo que tomó (días) cada tratamiento de cada clon en formar embriones después de la aparición de callos se presenta en el Cuadro 35, donde se muestra que existe significancia estadística tanto para los tratamientos, los factores (A y B) y como para la interacción de A x B. El coeficiente de variabilidad fue de 15.55 y 13.74 % para los clones ICS-1 y IMC-67 respectivamente, indicando que existe una buena homogeneidad en la respuesta de los medios de cultivo y los diferentes compuestos orgánicos.

Cuadro 35. Análisis de variancia para el tiempo de aparición de embriones somáticos del ensayo I (ICS-I) y ensayo II (IMC-67).

Fuente de variación	GL	Ensayo I (ICS-1)		Ensayo II (ICS-67)	
		CM	AS	CM	AS
Tratamientos	14	148.92	AS	156.05	AS
A Dosis (reguladores hormonales)	4	34.12	AS	23.1	NS
B Dosis (Malta)	2	699.64	AS	713.45	AS
A x B	8	68.64	AS	83.17	AS
Error experimental	60	7.80		7.80	
Total	74				
C.V. (%)		15.55		13.74	

NS: No existen diferencias estadísticas significativas.

AS: Existen diferencias estadísticas altamente significativas

Al realizar la comparación de medias para el tiempo de aparición de embriones, podemos ver en el Cuadro 36 que el experimento realizado con el clon ICS-1, los tratamientos T_{12} (a_2b_3), T_{11} (a_1b_3), T_{13} (a_3b_3), T_{14} (a_4b_3), T_9 (a_4b_2), T_{10} (a_5b_2), y T_7 (a_2b_2), resultaron formar los embriones en un menor tiempo presentando valores de 10.2, 11.6, 12.8, 14, 15.2, 15.6 y 16.2, días reactivamente.

Cuadro 36. Prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) para tratamientos en el tiempo de aparición de embriones somáticos del ensayo I (ICS-1).

Clave	Tratamiento	Tiempo (días)	Significación							
T ₁₂	a ₂ b ₃	10.20	a							
T ₁₁	a ₁ b ₃	11.60	a	b						
T ₁₃	a ₃ b ₃	12.80	a	b	c					
T ₁₄	a ₄ b ₃	14.00	a	b	c	d				
T ₉	a ₄ b ₂	15.20	a	b	c	d	e			
T ₁₀	a ₅ b ₂	15.60	a	b	c	d	e			
T ₇	a ₂ b ₂	16.20	a	b	c	d	e			
T ₈	a ₃ b ₂	17.40		b	c	d	e	f		
T ₁₅	a ₅ b ₃	18.40			c	d	e	f	g	
T ₅	a ₅ b ₁	19.20				d	e	f	g	
T ₆	a ₁ b ₂	19.20				d	e	f	g	
T ₄	a ₄ b ₁	21.20					e	f	g	
T ₁	a ₁ b ₁	22.60						f	g	
T ²	a ₂ b ₁	24.40							g	
T ₃	a ₃ b ₁	31.40								h

Tratamientos unidos por la misma letra en columna no existe diferencia estadística significativa.

a₁ = 0 mg/L de 2,4-D + 0 mg/L de Kinetina (Testigo)
a₂ = 0.25 mg/L de 2,4-D + 0.25 mg/L de Kinetina
a₃ = 0.50 mg/L de 2,4-D + 0.50 mg/L de Kinetina
a₄ = 1.0 mg/L de 2,4-D + 1.0 mg/L de Kinetina
a₅ = 2.0 mg/L de 2,4-D + 2.0 mg/L de Kinetina

b₁ = 0 mg/L de Malta
b₂ = 100 mg/L de Malta
b₃ = 200 mg/L de Malta

Según el Cuadro 37, para el experimento se usó el clon IMC-67, los tiempos de aparición de embriones fluctuaron desde el tratamiento T₁₁ (a₁b₃) al tratamiento T₃ (a₃b₁), los cuales presentaron valores 13.2 y 31.8 días respectivamente, esta última no se diferenció con los tratamientos T₁₃, T₁₂, T₁₀, T₇, T₁₄, T₈ y T₆.

Cuadro 37. Prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) para tratamientos en el tiempo de aparición de embriones somáticos del ensayo II (IMC-67).

Clave	Tratamiento	Tiempo (días)	Significación			
T ₁₁	a ₁ b ₃	13.20	a			
T ₁₃	a ₃ b ₃	13.80	a			
T ₁₂	a ₂ b ₃	14.40	a			
T ₁₀	a ₅ b ₂	16.00	a	b		
T ₇	a ₂ b ₂	16.60	a	b		
T ₁₄	a ₄ b ₃	16.80	a	b		
T ₈	a ₃ b ₂	17.80	a	b	c	
T ₆	a ₁ b ₂	19.40	a	b	c	d
T ₁₅	a ₅ b ₃	21.00		b	c	d
T ₅	a ₅ b ₁	22.20		b	c	d
T ₄	a ₄ b ₁	23.80			c	d e
T ₂	a ₂ b ₁	24.80				d e
T ₉	a ₄ b ₂	24.80				d e
T ₁	a ₁ b ₁	28.60				e f
T ₃	a ₃ b ₁	31.80				f

Tratamientos unidos por la misma letra en columna no existe diferencia estadística significativa.

a₁ = 0 mg/L de 2,4-D + 0 mg/L de Kinetina (Testigo)
a₂ = 0.25 mg/L de 2,4-D + 0.25 mg/L de Kinetina
a₃ = 0.50 mg/L de 2,4-D + 0.50 mg/L de Kinetina
a₄ = 1.0 mg/L de 2,4-D + 1.0 mg/L de Kinetina
a₅ = 2.0 mg/L de 2,4-D + 2.0 mg/L de Kinetina

b₁ = 0 mg/L de Malta
b₂ = 100 mg/L de Malta
b₃ = 200 mg/L de Malta

En este estudio la aparición de los primeros embriones somáticos en estado globular varió de acuerdo al ecotipo y las dosis de reguladores hormonales y malta, el rango para explantes de ICS-1, fue de 10.2 a 31.4 días después de la primera aparición del callo, mientras que para el clon IMC – 67 se encontró que el rango fue de 13.2 a 31.8 días, rangos parecidos fueron encontrados por CHANATÁSIS (2004), quien a los dos meses encontró las primeras apariciones de embriones somáticos, asimismo este tiempo coincide con el citado por LI *et*

al. (1998), quienes trabajaron en cacao en condiciones similares, pero utilizando como explantes solamente estaminoides.

Además, podemos observar en el Cuadro 38, el efecto principal de los factores A (nivel de reguladores hormonales) y B (dosis de malta), según la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$).

Para el experimento realizado con estaminodios del clon ICS-1, los niveles a_4 resulto con un menor tiempo (16.8 días) para formar embriones, este a su vez no se diferenció estadísticamente con los niveles a_2 , a_5 y a_1 quienes alcanzaron valores de 16.93, 17.73 y 17.8 días. Mientras que la diferencia entre los niveles del factor B resultaron altamente significativos, siendo el nivel b_3 quien alcanzo el menor tiempo de aparición de embriones con un valor de 13.4 días.

Cuadro 38. Prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) para los efectos principales (A y B), para tratamientos en el tiempo de aparición de embriones somáticos del clon ICS-1.

Factor A (reguladores hormonales)			Factor B (Malta)		
Dosis	Tiempo (días)	Sig.	Dosis	Tiempo (días)	Sig.
a_4	16.80	a	b_3	13.40	a
a_2	16.93	a	b_2	16.72	b
a_5	17.73	a	b_1	23.76	c
a_1	17.80	a			
a_3	20.53	b			

Tratamientos unidos por la misma letra en columna no existe diferencia estadística significativa.

a_1 = 0 mg/L de 2,4-D + 0 mg/L de Kinetina (Testigo)
 a_2 = 0.25 mg/L de 2,4-D + 0.25 mg/L de Kinetina
 a_3 = 0.50 mg/L de 2,4-D + 0.50 mg/L de Kinetina
 a_4 = 1.0 mg/L de 2,4-D + 1.0 mg/L de Kinetina
 a_5 = 2.0 mg/L de 2,4-D + 2.0 mg/L de Kinetina

b_1 = 0 mg/L de Malta
 b_2 = 100 mg/L de Malta
 b_3 = 200 mg/L de Malta

Según el Cuadro 39, el experimento se realizó con estaminodios del clon IMC- 67, se encontraron diferencias estadísticas entre los niveles de factor, siendo los niveles a₂, a₅, a₁ y a₃ al presentar valores 18.6, 19.73, 20.4, 21,13 días respectivamente. Mientras que la diferencia entre los niveles del factor B resultaron altamente significativos, siendo el nivel b₃ quien alcanzo el menor tiempo de aparición de embriones con un valor de 15.84 días.

Cuadro 39. Prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) para los efectos principales (A y B), para tratamientos en el tiempo de aparición de embriones somáticos del clon IMC-67.

Factor A (Reguladores hormonales)			Factor B (Malta)		
Dosis	Tiempo (Días)	Significación	Dosis	Tiempo (Días)	Significación
a ₄	21.80	a	b ₁	26.24	a
a ₃	21.13	a	b ₂	18.92	b
a ₁	20.40	a	b ₃	15.84	c
a ₅	19.73	a			
a ₂	18.60	b			

Tratamientos unidos por la misma letra en columna no existe diferencia estadística significativa.

a₁ = 0 mg/L de 2,4-D + 0 mg/L de Kinetina (Testigo)
a₂ = 0.25 mg/L de 2,4-D + 0.25 mg/L de Kinetina
a₃ = 0.50 mg/L de 2,4-D + 0.50 mg/L de Kinetina
a₄ = 1.0 mg/L de 2,4-D + 1.0 mg/L de Kinetina
a₅ = 2.0 mg/L de 2,4-D + 2.0 mg/L de Kinetina

b₁ = 0 mg/L de Malta
b₂ = 100 mg/L de Malta
b₃ = 200 mg/L de Malta

Para observar los efectos simples de cada factor en el tiempo de aparición de callos, el Cuadro 40 muestra que en el análisis de variancia ($\alpha=0.05$) existe significancia estadística, es decir, que al menos el efecto de unos de los factores demostró ser superior a los otros.

Cuadro 40. Análisis de variancia para los efectos simples para el factor A (reguladores hormonales) y factor B (malta) en el Tiempo de aparición de embriones del ensayo I y ensayo II.

F. de variación	GL	Ensayo I (ICS-1)	Ensayo II (IMC-67)
		CM	CM
A en b ₁	4	109.34 AS	76.04 AS
A en b ₂	4	13.06 NS	62.46 AS
A en b ₃	4	49.00 AS	50.94 AS
B en a ₁	2	158.60 AS	300.20 AS
B en a ₂	2	254.07 AS	150.20 AS
B en a ₃	2	469.27 AS	446.67 AS
B en a ₄	2	74.40 AS	95.00 AS
B en a ₅	2	17.87 NS	54.07 AS
Error E	60	7.80	7.80

N.S. = No existe significación estadística.

A.S. = Altamente significativo (Existen diferencias estadísticas altamente significativas)

a₁ = 0 mg/L de 2,4-D + 0 mg/L de Kinetina (Testigo)

a₂ = 0.25 mg/L de 2,4-D + 0.25 mg/L de Kinetina

a₃ = 0.50 mg/L de 2,4-D + 0.50 mg/L de Kinetina

a₄ = 1.0 mg/L de 2,4-D + 1.0 mg/L de Kinetina

a₅ = 2.0 mg/L de 2,4-D + 2.0 mg/L de Kinetina

b₁ = 0 mg/L de Malta

b₂ = 100 mg/L de Malta

b₃ = 200 mg/L de Malta

El los Cuadros 41 y 42 muestra los efectos simples en el tiempo de aparición de embriones del factor A, en los 3 niveles del factor B para los dos clones de cacao, para el clon ICS-1 muestran que para el efecto de A en b₁ los tratamientos a₅b₁, a₄b₁ y a₁b₁ al presentar valores de 19.2, 21.2 y 22.6 días respectivamente.

Estos a su vez se diferenciaron estadísticamente, mientras que para el efecto de A en b₃ el tratamiento a₂b₃ tuvo un menor tiempo en la aparición de embriones con un valor de 10.2 días.

Cuadro 41. Prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) para los efectos simples del Factor A en b, en el tiempo de aparición de embriones en el clon ICS-1.

Ensayo I (ICS-1)		
Factor A en b₁ (0 mg/L de Malta)		
Tratamiento	Tiempo (Días)	Significación
a ₅ : 2.0 mg/L de 2,4-D + 2.0 mg/L de Kinetina	19.20	a
a ₄ : 1.0 mg/L de 2,4-D + 1.0 mg/L de Kinetina	21.20	a b
a ₁ : 0 mg/L de 2,4-D + 0 mg/L de Kinetina	22.60	a b
a ₂ : 0.25 mg/L de 2,4-D + 0.25 mg/L de Kinetina	24.40	b
a ₃ : 0.50 mg/L de 2,4-D + 0.50 mg/L de Kinetina	31.40	c
Factor A en b₂ (100 mg/L de Malta)		
Tratamiento	Tiempo (Días)	Significación
a ₄ : 1.0 mg/L de 2,4-D + 1.0 mg/L de Kinetina	15.20	a
a ₅ : 2.0 mg/L de 2,4-D + 2.0 mg/L de Kinetina	15.60	a
a ₂ : 0.25 mg/L de 2,4-D + 0.25 mg/L de Kinetina	16.20	a
a ₃ : 0.50 mg/L de 2,4-D + 0.50 mg/L de Kinetina	17.40	a
a ₁ : 0 mg/L de 2,4-D + 0 mg/L de Kinetina	19.20	a
Factor A en b₃ (200 mg/L de Malta)		
Tratamiento	Tiempo (Días)	Significación
a ₂ : 0.25 mg/L de 2,4-D + 0.25 mg/L de Kinetina	10.20	a
a ₁ : 0 mg/L de 2,4-D + 0 mg/L de Kinetina	11.60	a
a ₃ : 0.50 mg/L de 2,4-D + 0.50 mg/L de Kinetina	12.80	a b
a ₄ : 1.0 mg/L de 2,4-D + 1.0 mg/L de Kinetina	14.00	a b
a ₅ : 2.0 mg/L de 2,4-D + 2.0 mg/L de Kinetina	18.40	b

Tratamientos unidos por la misma letra en columna no existe diferencia estadística significativa.

a₁ = 0 mg/L de 2,4-D + 0 mg/L de Kinetina (Testigo)
a₂ = 0.25 mg/L de 2,4-D + 0.25 mg/L de Kinetina
a₃ = 0.50 mg/L de 2,4-D + 0.50 mg/L de Kinetina
a₄ = 1.0 mg/L de 2,4-D + 1.0 mg/L de Kinetina
a₅ = 2.0 mg/L de 2,4-D + 2.0 mg/L de Kinetina

b₁ = 0 mg/L de Malta
b₂ = 100 mg/L de Malta
b₃ = 200 mg/L de Malta

Cuadro 42. Prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) para los efectos simples del Factor A en b, en el tiempo de aparición de embriones en el clon IMC-67.

Ensayo II (IMC – 67)		
Factor A en b₁ (0 mg/L de Malta)		
Tratamiento	Tiempo (Días)	Significación
a ₅ : 2.0 mg/L de 2,4-D + 2.0 mg/L de Kinetina	22.20	a
a ₄ : 1.0 mg/L de 2,4-D + 1.0 mg/L de Kinetina	23.80	a b
a ₂ : 0.25 mg/L de 2,4-D + 0.25 mg/L de Kinetina	24.80	a b
a ₁ : 0 mg/L de 2,4-D + 0 mg/L de Kinetina	28.60	b c
a ₃ : 0.50 mg/L de 2,4-D + 0.50 mg/L de Kinetina	31.80	c
Factor A en b₂ (100 mg/L de Malta)		
Tratamiento	Tiempo (Días)	Significación
a ₅ : 2.0 mg/L de 2,4-D + 2.0 mg/L de Kinetina	16.00	a
a ₂ : 0.25 mg/L de 2,4-D + 0.25 mg/L de Kinetina	16.60	a
a ₃ : 0.50 mg/L de 2,4-D + 0.50 mg/L de Kinetina	17.80	a
a ₁ : 0 mg/L de 2,4-D + 0 mg/L de Kinetina	19.40	a
a ₄ : 1.0 mg/L de 2,4-D + 1.0 mg/L de Kinetina	24.80	b
Factor A en b₃ (200 mg/L de Malta)		
Tratamiento	Tiempo (Días)	Significación
a ₁ : 0 mg/L de 2,4-D + 0 mg/L de Kinetina	13.20	a
a ₃ : 0.50 mg/L de 2,4-D + 0.50 mg/L de Kinetina	13.80	a
a ₂ : 0.25 mg/L de 2,4-D + 0.25 mg/L de Kinetina	14.40	a
a ₄ : 1.0 mg/L de 2,4-D + 1.0 mg/L de Kinetina	16.80	a b
a ₅ : 2.0 mg/L de 2,4-D + 2.0 mg/L de Kinetina	21.00	b

Tratamientos unidos por la misma letra en columna no existe diferencia estadística significativa.

a₁ = 0 mg/L de 2,4-D + 0 mg/L de Kinetina (Testigo)
a₂ = 0.25 mg/L de 2,4-D + 0.25 mg/L de Kinetina
a₃ = 0.50 mg/L de 2,4-D + 0.50 mg/L de Kinetina
a₄ = 1.0 mg/L de 2,4-D + 1.0 mg/L de Kinetina
a₅ = 2.0 mg/L de 2,4-D + 2.0 mg/L de Kinetina

b₁ = 0 mg/L de Malta
b₂ = 100 mg/L de Malta
b₃ = 200 mg/L de Malta

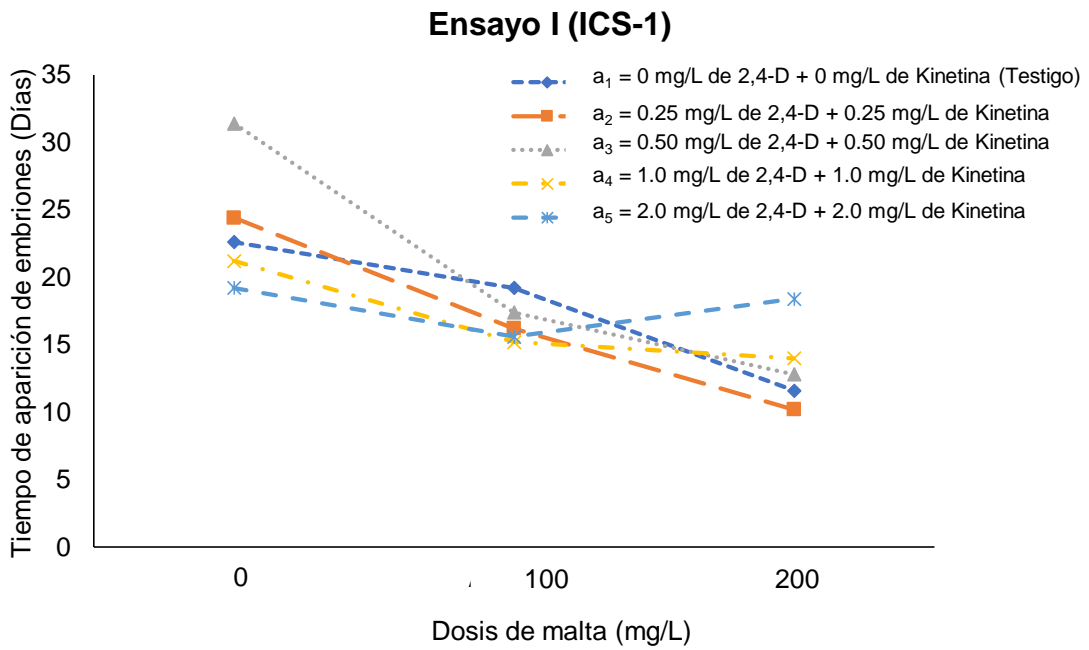


Figura 14. Efectos simples del Factor A en b, en el tiempo de aparición de embriones en el clon ICS-1.

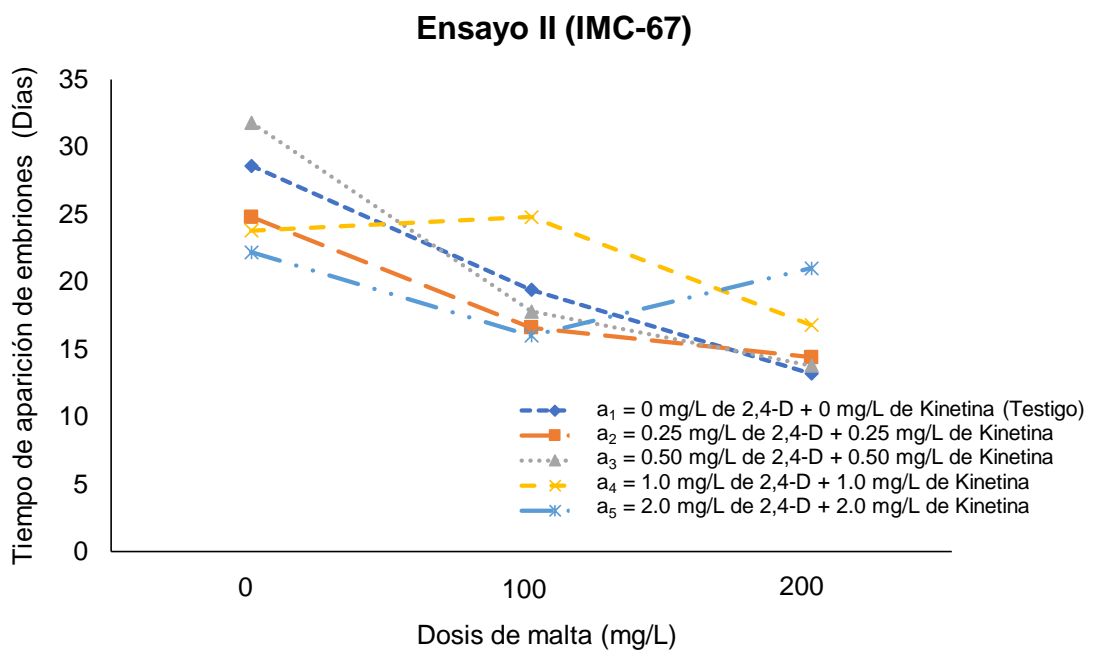


Figura 15. Efectos simples del Factor A en b, en el tiempo de aparición de embriones en el clon IMC-67.

Por otro lado, para el experimento con el clon de cacao IMC – 67, se muestra que el tratamiento a₅, es mejor en la formación de embriones con excepción del efecto de A en b₃, donde el nivel a₁ alcanzó el menor tiempo en formar embriones, tal como se muestra en el Cuadro 42.

En efecto la aplicación de reguladores hormonales tuvo buenos resultados reduciendo el tiempo en la aparición de los primeros embriones somáticos. La acción de las citocininas fue probada por LÓPEZ (1993), quien señala que el uso de una citocinina como la kinetina, mejora la respuesta del explante a la callogénesis al trabajar en conjunto con la auxina 2,4-D.

Por su parte AGUILAR (1990) obtuvo callogénesis y embriogénesis somática a partir de cotiledones de cacao utilizando BAP en conjunto con ácido naftalenacético (ANA).

SAGARE *et al.* (1993) probó en garbanzo en el uso de BAP en combinación con 2,4-D, coincidiendo que su acción respecto a la callogénesis está ligada a otros factores como el tipo de explante, las condiciones del medio y también el genotipo. Asimismo, se puede observar a nivel general para la formación los embriones somáticos, el factor A con su nivel a₄ (1.0 mg/L de 2,4-D + 1.0 mg/L de Kinetina) y a₂ (0.25 mg/L de 2,4-D + 0.25 mg/L de Kinetina) influenciaron más en la formación de embriones en el clon ICS-1 e IMC – 67 respectivamente.

LÓPEZ *et al.* (2001), resaltan la importancia de los reguladores del crecimiento en la inducción de la embriogénesis somática, donde el tipo de regulador de crecimiento, la concentración en el medio de cultivo y la duración de la fase de inducción juegan un papel importante.

Cuadro 43. Prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) para los efectos simples del Factor B en a, en el tiempo de aparición de embriones en el clon ICS-I.

Ensayo I (ICS-1)		
Factor B en a₁ (0 mg/L de 2,4-D + 0 mg/L de Kinetina)		
Tratamiento	Tiempo (Días)	Significación
b ₃ : 200 mg/L de Malta	11.60	a
b ₂ : 100 mg/L de Malta	19.20	b
b ₁ : 0 mg/L de Malta	22.60	b
Factor B en a₂ (0.25 mg/L de 2,4-D + 0.25 mg/L de Kinetina)		
Tratamiento	Tiempo (Días)	Significación
b ₃ : 200 mg/L de Malta	10.20	a
b ₂ : 100 mg/L de Malta	16.20	b
b ₁ : 0 mg/L de Malta	24.40	c
Factor B en a₃ (0.50 mg/L de 2,4-D + 0.50 mg/L de Kinetina)		
Tratamiento	Tiempo (Días)	Significación
b ₃ : 200 mg/L de Malta	12.80	a
b ₂ : 100 mg/L de Malta	17.40	b
b ₁ : 0 mg/L de Malta	31.40	c
Factor B en a₄ (1.0 mg/L de 2,4-D + 1.0 mg/L de Kinetina)		
Tratamiento	Tiempo (Días)	Significación
b ₃ : 200 mg/L de Malta	14.00	a
b ₂ : 100 mg/L de Malta	15.20	a
b ₁ : 0 mg/L de Malta	21.20	b
Factor B en a₅ (2.0 mg/L de 2,4-D + 2.0 mg/L de Kinetina)		
Tratamiento	Tiempo (Días)	Significación
b ₂ : 100 mg/L de Malta	15.60	a
b ₃ : 200 mg/L de Malta	18.40	a
b ₁ : 0 mg/L de Malta	19.20	a

Tratamientos unidos por la misma letra en columna no existe diferencia estadística significativa.

a₁ = 0 mg/L de 2,4-D + 0 mg/L de Kinetina (Testigo)
a₂ = 0.25 mg/L de 2,4-D + 0.25 mg/L de Kinetina
a₃ = 0.50 mg/L de 2,4-D + 0.50 mg/L de Kinetina
a₄ = 1.0 mg/L de 2,4-D + 1.0 mg/L de Kinetina
a₅ = 2.0 mg/L de 2,4-D + 2.0 mg/L de Kinetina

b₁ = 0 mg/L de Malta
b₂ = 100 mg/L de Malta
b₃ = 200 mg/L de Malta

Cuadro 44. Prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) para los efectos simples del Factor B en a, en el tiempo de aparición de embriones somáticos en el clon IMC-67.

Ensayo II (IMC – 67)		
Factor B en a₁ (0 mg/L de 2,4-D + 0 mg/L de Kinetina)		
Tratamiento	Tiempo (Días)	Significación
b ₃ : 200 mg/L de Malta	13.20	a
b ₂ : 100 mg/L de Malta	19.40	b
b ₁ : 0 mg/L de Malta	28.60	c
Factor B en a₂ (0.25 mg/L de 2,4-D + 0.25 mg/L de Kinetina)		
Tratamiento	Tiempo (Días)	Significación
b ₃ : 200 mg/L de Malta	14.40	a
b ₂ : 100 mg/L de Malta	16.60	a
b ₁ : 0 mg/L de Malta	24.80	b
Factor B en a₃ (0.50 mg/L de 2,4-D + 0.50 mg/L de Kinetina)		
Tratamiento	Tiempo (Días)	Significación
b ₃ : 200 mg/L de Malta	13.80	a
b ₂ : 100 mg/L de Malta	17.80	a
b ₁ : 0 mg/L de Malta	31.80	b
Factor B en a₄ (1.0 mg/L de 2,4-D + 1.0 mg/L de Kinetina)		
Tratamiento	Tiempo (Días)	Significación
b ₃ : 200 mg/L de Malta	16.80	a
b ₁ : 0 mg/L de Malta	23.80	b
b ₂ : 100 mg/L de Malta	24.80	b
Factor B en a₅ (2.0 mg/L de 2,4-D + 2.0 mg/L de Kinetina)		
Tratamiento	Tiempo (Días)	Significación
b ₂ : 100 mg/L de Malta	16.00	a
b ₃ : 200 mg/L de Malta	21.00	b
b ₁ : 0 mg/L de Malta	22.20	b

Tratamientos unidos por la misma letra en columna no existe diferencia estadística significativa.

a₁ = 0 mg/L de 2,4-D + 0 mg/L de Kinetina (Testigo)
a₂ = 0.25 mg/L de 2,4-D + 0.25 mg/L de Kinetina
a₃ = 0.50 mg/L de 2,4-D + 0.50 mg/L de Kinetina
a₄ = 1.0 mg/L de 2,4-D + 1.0 mg/L de Kinetina
a₅ = 2.0 mg/L de 2,4-D + 2.0 mg/L de Kinetina

b₁ = 0 mg/L de Malta
b₂ = 100 mg/L de Malta
b₃ = 200 mg/L de Malta

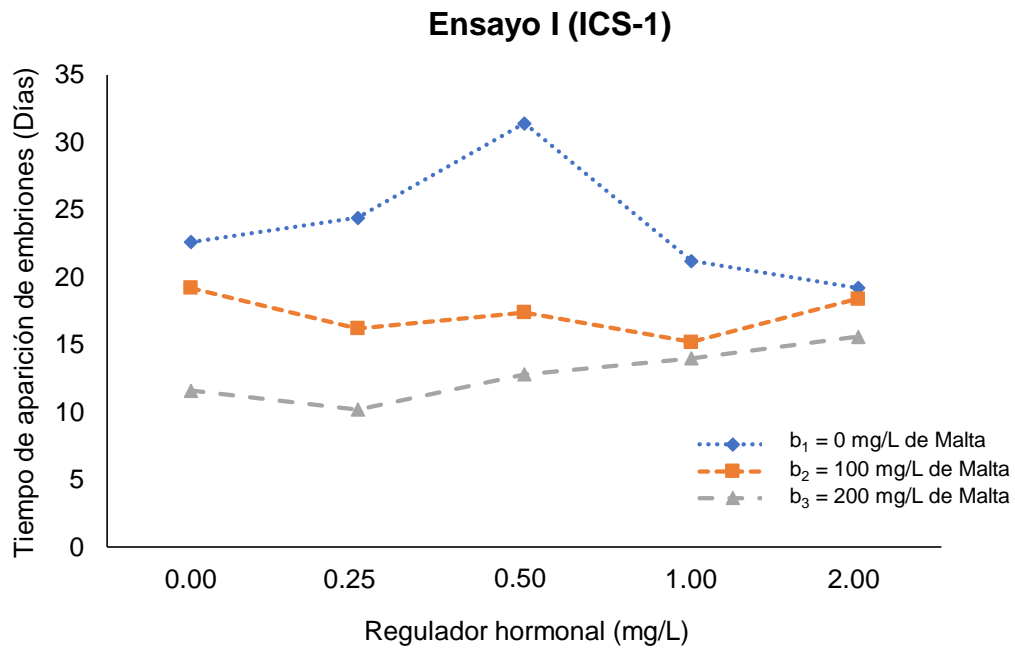


Figura 16. Efectos simples del Factor B en a, en el tiempo de aparición de embriones somáticos en el clon ICS-I.

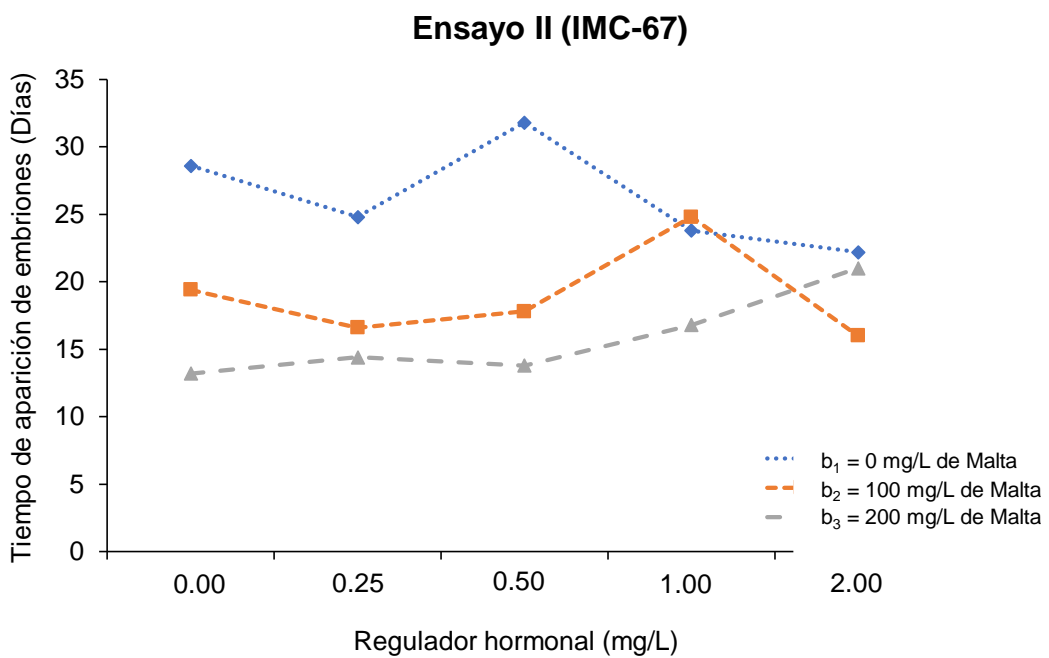


Figura 17. Efectos simples del Factor B en a, en el tiempo de aparición de embriones somáticos en el clon IMC-67.

Para poder observar el efecto simple en el tiempo de aparición de embriones del factor B en los 5 niveles del factor A para los dos clones de cacao, los Cuadros 43 y 44, muestran en forma general que el factor B, con su tercera dosis de b_3 (Malta 200 mg/L), tuvo mejores respuestas en todos los niveles del factor A (a_1 , a_2 , a_3 , a_4 y a_5).

Para el clon ICS-1 se resaltan los tratamientos con mejor respuesta, el Cuadro 43 a_2b_3 (10.2 días) y a_1b_3 , (11.6 días), que muestran diferencias estadísticas significativas con cada uno de los tratamientos incluidos en los efectos de B en a_2 y B en a_1 respectivamente, mientras que en el Cuadro 44 para el clon IMC – 67, las mejores respuestas para la formación de embriones fueron los tratamientos a_1b_3 (13.2 días) y a_3b_3 (13.8 días), al mismo tiempo que presentan diferencias significativas para los efectos de B en a_1 y B en a_3 respectivamente.

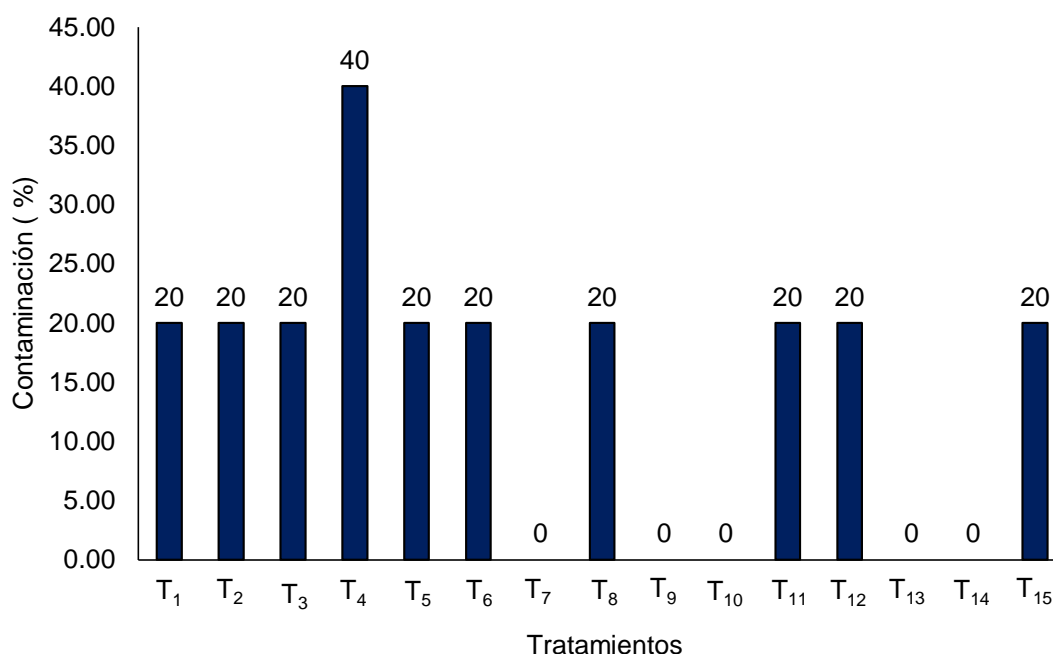
Este efecto positivo de las dosis altas de la aplicación de malta, en la aparición de embriones estaría fundamentado que hay ocasiones en que los explantes no son viables en medios sintéticos por lo que se debe añadir leche de coco, hidrolizado de caseína, extracto de malta o levadura (ECHENIQUE *et al.*, 2004).

4.5. Contaminación

En la figura 17 para el ensayo I (ICS-1) el tratamiento a_4b_1 (2,4D 2.0 mg/L + Kinetina 2.0 mg/L) + (Malta 0.0 mg/L) obtuvo una contaminación de 40 %, es decir que dos de las cinco repeticiones resultaron con contaminación antes de la obtención de callos embriogénicos, por otro lado, los tratamientos T_1 , T_2 , T_3 , T_5 ,

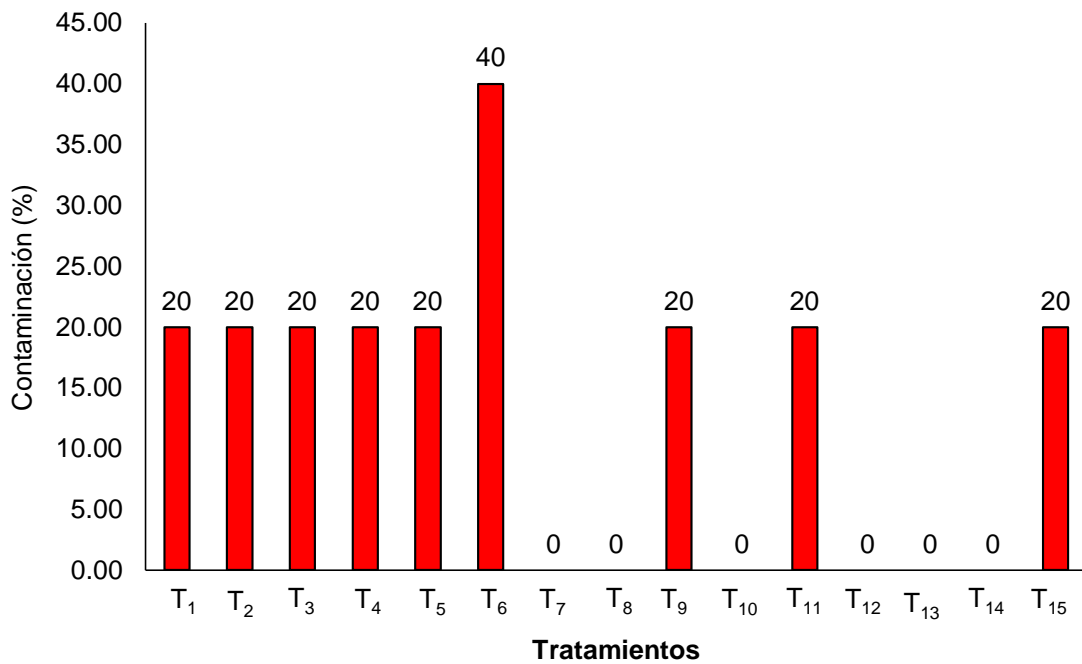
T₆, T₈, T₁₁, T₁₂ y T₁₅ resultaron con porcentajes de contaminación de 20 % y los tratamientos T₇, T₉, T₁₀, T₁₃ y T₁₄ resultaron con 0 % de contaminación.

Mientras en la Figura 3, nos muestra el porcentaje de contaminación obtenido en cada uno de los tratamientos del ensayo II (IMC-67), siendo el tratamiento a₁b₂ (2,4D 0.0 mg/L + Kinetina 0.0 mg/L) + (Malta 100 mg/L) el que obtuvo mayor contaminación con 40%, es decir que dos de las cinco repeticiones resultaron con contaminación antes de la obtención de callos embriogénicos, por otro lado, los tratamientos T₁, T₂, T₃, T₄, T₅, T₉, T₁₁, y T₁₅ resultaron con porcentajes de contaminación de 20 %, mientras que los tratamientos T₇, T₈, T₁₀, T₁₂, T₁₃ y T₁₄ resultaron con 0 % de contaminación de las repeticiones.



- | | |
|--|---|
| T ₁ : (2,4 D 0 mg/L + Kinetina 0 mg/L) + (0 mg/L Malta) | T ₂ : (2,4 D 0.25 mg/L + Kinetina 0.25 mg/L) + (Malta 0 mg/L) |
| T ₃ : (2,4 D 0.5 mg/L + Kinetina 0.5 mg/L) + (Malta 0 mg/L) | T ₄ : (2,4 D 1.0 mg/L + Kinetina 1.0 mg/L) + (Malta 0 mg/L) |
| T ₅ : (2,4 D 2.0 mg/L + Kinetina 2.0 mg/L) + (Malta 0 mg/L) | T ₆ : (2,4 D 0 mg/L + Kinetina 0 mg/L) + (Malta 100 mg/L) |
| T ₇ : (2,4 D 0.25 mg/L + Kinetina 0.25 mg/L) + (Malta 100 mg/L) | T ₈ : (2,4 D 0.5 mg/L + Kinetina 0.5 mg/L) + (Malta 100 mg/L) |
| T ₉ : (2,4 D 1.0 mg/L + Kinetina 1.0 mg/L) + (Malta 100 mg/L) | T ₁₀ : (2,4 D 2.0 mg/L + Kinetina 2.0 mg/L) + (Malta 100 mg/L) |
| T ₁₁ : (2,4 D 0 mg/L + Kinetina 0 mg/L) + (Malta 200 mg/L) | T ₁₂ : (2,4 D 0.25 mg/L + Kinetina 0.25 mg/L) + (Malta 200 mg/L) |
| T ₁₃ : (2,4 D 0.5 mg/L + Kinetina 0.5 mg/L) + (Malta 200 mg/L) | T ₁₄ : (2,4 D 1.0 mg/L + Kinetina 1.0 mg/L) + (Malta 200 mg/L) |
| T ₁₅ : (2,4 D 2.0 mg/L + Kinetina 2.0 mg/L) + (Malta 200 mg/L) | |

Figura 18. Porcentaje de contaminación de los tratamientos del ensayo I (clon ICS-I).



- | | |
|--|---|
| T ₁ : (2,4 D 0 mg/L + Kinetina 0 mg/L) + (0 mg/L Malta) | T ₂ : (2,4 D 0.25 mg/L + Kinetina 0.25 mg/L) + (Malta 0 mg/L) |
| T ₃ : (2,4 D 0.5 mg/L + Kinetina 0.5 mg/L) + (Malta 0 mg/L) | T ₄ : (2,4 D 1.0 mg/L + Kinetina 1.0 mg/L) + (Malta 0 mg/L) |
| T ₅ : (2,4 D 2.0 mg/L + Kinetina 2.0 mg/L) + (Malta 0 mg/L) | T ₆ : (2,4 D 0 mg/L + Kinetina 0 mg/L) + (Malta 100 mg/L) |
| T ₇ : (2,4 D 0.25 mg/L + Kinetina 0.25 mg/L) + (Malta 100 mg/L) | T ₈ : (2,4 D 0.5 mg/L + Kinetina 0.5 mg/L) + (Malta 100 mg/L) |
| T ₉ : (2,4 D 1.0 mg/L + Kinetina 1.0 mg/L) + (Malta 100 mg/L) | T ₁₀ : (2,4 D 2.0 mg/L + Kinetina 2.0 mg/L) + (Malta 100 mg/L) |
| T ₁₁ : (2,4 D 0 mg/L + Kinetina 0 mg/L) + (Malta 200 mg/L) | T ₁₂ : (2,4 D 0.25 mg/L + Kinetina 0.25 mg/L) + (Malta 200 mg/L) |
| T ₁₃ : (2,4 D 0.5 mg/L + Kinetina 0.5 mg/L) + (Malta 200 mg/L) | T ₁₄ : (2,4 D 1.0 mg/L + Kinetina 1.0 mg/L) + (Malta 200 mg/L) |
| T ₁₅ : (2,4 D 2.0 mg/L + Kinetina 2.0 mg/L) + (Malta 200 mg/L) | |

Es posible que los resultados de no contaminación, se deban a que los explantes tuvieron una adecuada asepsia dentro del laboratorio, y también que los botones florales fueron colectados completamente cerrados; estando los explantes protegidos por el cáliz de la contaminación exterior.

Por otro lado, la contaminación existente se deba a factores no controlados ya que estos pudieran haber influido en la contaminación de los explantes de cacao. Al respecto PIAGNANI *et al.* (1996), plantean que la superficie de los tejidos de las plantas constituye un hábitat para los microorganismos, los que se pueden alojar en estomas, lenticelas o cualquier abertura natural, dificultando su eliminación.

V. CONCLUSIONES

1. Los estaminodios de los clones ICS-1 e IMC – 67, respondieron la inducción de callos embriogénicos, en ciertas combinaciones de dosis de reguladores hormonales y malta, siendo más rápida la respuesta y mayor crecimiento de callos en el clon ICS-1.
2. El factor A (reguladores hormonales) con sus diferentes dosis, tanto en el ensayo I (clon ICS -1) como en el ensayo II (IMC-67), tuvieron resultados variables en todas las características evaluadas.
3. Con la dosis de malta en concentraciones de 200 mg/L, se obtuvo resultados favorables en menor tiempo de aparición de callos, mayor tamaño de callos, mayor número de estructuras pro embriogénicas y menor tiempo de aparición de embriones somáticos.

VI. RECOMENDACIONES

1. Mejorar el protocolo de inducción de callos embriogénicos para la obtención de embriones somáticos.
2. Realizar estudios de mayor número de clones para determinar la respuesta que tienen estos en la formación de callos.
3. Ensayar con otras hormonas para la inducción de callogénesis y la diferenciación estructural proembriogénicas y obtener embriones completos.

VII. RESUMEN

Con la necesidad de encontrar un método adecuado para la inducción de callos embriogénicos, se planteó desarrollar el proceso de Inducción de callos embriogénicos en explantes de estaminodios de la flor de cacao, de las variedades ICS-1 y IMC-67, utilizando medio NT1(Laboratorio Nestlé) formulado con sales y vitaminas DKW y diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento 2,4-D (ácido 2,4 dicloro fenociacético) y KIN (Kinetina) en combinación con extracto de malta, en la fase de inducción se determinó la interacción directa entre el medio de cultivo y el explante, en todos los tratamientos en estudio se obtuvo respuestas, las mejores respuestas se obtuvieron en las dosis más altas de reguladores de crecimiento en combinación. El promedio en el tiempo de la aparición de callos fue de 13 a 21 días respectivamente, donde el tamaño de callos vario en cada uno de los tratamientos especialmente dando resultados más favorables los tratamientos con las dosis más altas del factor A (reguladores hormonales) y del factor B (malta). los tratamientos con la dosis a₃ (200 mg de malta) favoreció en el menor tiempo la aparición de embriones somáticos y el mayor número de estructuras proembriogénicas, el ensayo I (ICS-1) obtuvo respuestas más rápidas, mayor tamaño de callo y mayor número de estructuras proembriogénicas, con respecto al ensayo II (IMC-67) que mantuvo una distancia corta en resultados de las características estudiadas a ambos clones.

ABSTRACT

With the need to find an adequate method for the induction of embryogenic calluses, it was proposed to develop the process of induction of embryogenic callus in explants of staminodes of the cocoa flower, of the varieties ICS-1 and IMC-67, using the medium NT1(Laboratory Nestlé) formulated with salts and vitamins DKW and different concentrations of growth regulators 2,4-D (acid 2,4 phenocetic dichloro) y KIN (Kinetina) in combination with malt extract, in the induction phase the direct interaction between the culture medium and the explant was determined, In all treatments under study, answers were obtained, the best responses were obtained in the highest doses of growth regulators in combination. The average time of appearance of calluses was 13 to 21 days respectively, where the size of calluses varied in each of the treatments especially giving more favorable results with the highest doses of factor A (hormonal regulators) and of factor B (malt). The treatments with the dose a₃ (200 mg of malt) favored the appearance of somatic embryos and the greatest number of proembryogenic structures in the shortest time, the essay I (ICS-1) obtained faster responses, larger callus size and greater number of proembryogenic structures, with respect to essay II (IMC-67) that maintained a short distance in results of the characteristics studied to both clones

VIII. BIBLIOGRAFÍA

1. ADRIAZOLA, J.; ANTEPARRA, M.; GONZALES, F.; GARCÍA, L.; NATIVIDAD, R.; RÍOS, R.; ZAVALA, J. 2007. Diplomado: Cultivos industriales tropicales: café, cacao y palma aceitera. Universidad Nacional Agraria de la Selva. Tingo María, Huánuco, Perú. 163 p.
2. AGUILAR, M.E. 1990. Obtención de plantas de cacao (*Theobroma cacao* L.) a partir de Microinjerto de Embriones Somáticos. Tesis M.Sc. Costa Rica, Turrialba, CATIE.131 p.
3. ALEMANNI, L; BERTHOULY, M; MICHAUX-FERRIERE, M. 1997. A Comparision between *Theobroma cacao* L. zygotic embryogenesis and somatic embryogenesis from floral explants. In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant. 33:163-172.
4. ALEMANNI, L, 1995. Embryogenese somatique du cacaoyer *Theobroma cacao* L. Contraintes, Progres et Perspectives. These Doctorale. Montpellier, Francia, Universite Montpellier II. 194 p.
5. APPCACAO. 2010. Asociación peruana de productores de cacao. Datos estadísticos de cacao peruano [En línea]: <http://www.appcacao.org>. (Consultado el 23 de enero del 2018).
6. BAKER, W. 1891. The chocolate plant (*Theobroma cacao*) and its products. Jhon Wilsonand Son. Cambridge, England. 164 p.
7. BALAGUÉ, C.; EVANGELISTA, A. 2006. Efecto del herbicida ácido 2,4-diclorofenoxiacético sobre la fimbriación de bacterias uropatógenas. Acta Toxicol. Argent. 14(1): 12-17.

8. BARAHONA, J. 1987. Manual del Cultivo del Cacao. INIAP. Quevedo, Ecuador. 109 p.
9. BARREZUETA, S.A. 2018. Construcción de indicadores agrarios para medir la sostenibilidad de la producción de cacao en el oro, Ecuador. Tesis doctoral UDC. Programa de Doctorado en Investigación Agraria y Forestal. Universidad de La Coruña. 200 p. [En línea]: https://ruc.udc.es/dspace/bitstream/handle/2183/20304/Barrezueta_Unda_SalomonAlejandro_TD_2017.pdf?sequence=2&isAllowed=y (Consultado el 23 de enero del 2018).
10. BERAUN, C. 2014. Inducción in vitro de callos embriogénicos con diferentes suplementos orgánicos y reguladores de crecimiento en semillas inmaduras de papayo (*Carica papaya* L.), cv. PTM - 331 y cv. Tainung. Universidad Nacional Agraria de la Selva. Facultad de Agronomía. Tesis para optar el título de Ingeniero Agrónomo. Tingo María, Perú. 83 p.
11. BROWN, D.C.; THORPE, T.A. 1995. Crop improvement through tissue culture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 11: 409-415.
12. BONGA, J. 1985. Plants propagation through tissue culture. *Plantcell Cultures: results and perspectives*. Ámsterdam, Holanda. 256 p.
13. CATIE (Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza). 2010. Producción sexual del cacao. Turrialba, Costa Rica [En línea]: http://www.worldcocoafoundation.org/wp-content/uploads/files_mf/somarribachavez2010genomicsphysiologysexualreproductionno.1spanish6.7mb.pdf. (Consultado el 14 de mayo del 2019).

14. CHANATASIG, C. 2004. Inducción de embriogénesis somática en clones superiores de cacao (*Theobroma cacao* L.), con resistencia a enfermedades fungosas. Tesis M.Sc. CATIE. Turrialba, Costa Rica. 64 p.
15. CHANATASIG, V. 2004. Inducción de la embriogénesis somática en clones superiores de cacao (*Theobroma cacao* L.) Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE). Costa Rica. 84 p
16. CONICYT. 2007. (Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica, Chile). 2007. La biotecnología vegetal en Chile: Capacidades de investigación y áreas de desarrollo científico-tecnológico. [En línea]: www.conicyt.cl/documentos/dri/ue/Biotec_Biotech_.pdf (Consultado el 15 de julio del 2017).
17. DEL SOL, L.; GARCÍA, M.; GÁLVEZ, D.; RODRÍGUEZ, S.; TORRES, Y.; MEDERO, V.; LÓPEZ, J.; VENTURA y J.; CABRERA, M. 2001. Somatic embryogenesis in papaya cv. INIVIT-2000. Biotecnología Vegetal y Agricultura Sostenible. Resúmenes evento. 133 – 215.
18. ECHENIQUE V.; RUBINSTEIN, C.; MROGINSKI, L. 2004. Biotecnología y Mejoramiento vegetal. Ediciones INTA. Argentina. 161 p.
19. ELHAG, K. M., BAHAR, A. M., MAHAJAN, K. K. 1988. Difficulties in the serodiagnosis of infection with the fragilis group of bacteroides. *Journal of Medical Microbiology*. 24: 125 -131.
20. ENDEMANN, M.; WILHELM, E. 1999. Factors influencing the induction and viability of somatic embryos of *Quercus robur* L. *Biologia plantarum*. 42(3): 499 - 504.

21. ENRÍQUEZ, G. 1983. El cultivo del cacao. CATIE, Turrialba, Costa Rica. 162 p.
22. ESTRELLA, E. 2012. Inducción de callogenesis en estaminodios de cacao (*Theobroma cacao L.*) ICS- 1 mediante reguladores hormonales Universidad Nacional Agraria De La Selva. Facultad de Agronomía. Practicas pre-profesionales para optar el bachiller en Ciencias Agrarias. Tingo María. Perú. 54 p.
23. ETIENNE, H; BARRY-ETIENNE, D; VÁSQUEZ, N.; BERTHOULY, M. 1999. Aportes de la Biotecnología al Mejoramiento Genético del Café: El Ejemplo de la Multiplicación por Embriogénesis Somática de Híbridos F1 en América Central. In: Bertrand, B y Rapidel, B. Eds. Desafíos de la Caficultura en Centroamérica. San José, Costa Rica. Cirad, IICA. Pp. 457 - 499.
24. ENDEMANN, M.; WILHELM, E. 1999. Factors influencing the induction and viability of somatic embryos of *Quercus robur L.* *Biologia plantarum.* 42(3): 499-504.
25. FEHER, A., PASTERNAK, T. P.; DUDITS, D. 2003. Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. *Plant Cell Tissue and Organ Culture.* 74(3): 201 - 228.
26. FERNÁNDEZ, K.; PÉREZ, E.; MEDINA, L. 2015. La kinetina ribósido como estimulador de la germinación in vitro de esporas de *Glomus clarum*. *Cultivos Tropicales,* 36(3): 45-49.
27. FISICHELLA, M; SILVI, E; MORINI, S. 2000. Regeneration of somatic embryos and roots from quince leaves cultured on media with

different macroelement composition. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 63: 101–107.

28. FLORES, D.; ABDELNOUR, A. 2000. Manual de laboratorio de cultivo de tejidos II. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Escuela de biología. 50 p.
29. FREIRE, S. M. 2003. Aspectos básicos de la embriogénesis somática. Instituto de biotecnología de las plantas. *Biotecnología vegetal*. 3(4): 195 - 209.
30. GARCÍA, L. 2000. Recursos genéticos y Mejoramiento del Cacao. Universidad Nacional de la Selva (UNAS) Tingo María. Seminario taller de tecnología del cacao en el Perú. PNDA. CONTRADROGAS/CICAD-OEA. Lima, Perú: 14 y 15 de diciembre 2000. 16 p.
31. GEORGE, E.; SHERRINGTON, P. 1984. Propagación por cultivo de tejidos. 1º ED. Londres, Manual y guía de los laboratorios comerciales. 309 p.
32. GOLA, G. 1965. Tratado de Botánica. 2^{da}. edición. Editorial Labor S.A., Barcelona, 1110 p.
33. HAN, K.; PARK, Y. 1999. Somatic embryogenesis in black locust (*Robinia pseudoacacia* L.). somatic embryogenesis In *Woody Plants*. 5: 149-161.
34. HARLANDER, K. 2002. La evolución de la agricultura moderna y el futuro de la biotecnología. *Revista: Colegio Americano de Nutrición* 21(3): 161- 165.
35. HERNÁNDEZ, E.; HERNÁNDEZ, J.; AVENDAÑO, C.H.; LÓPEZ, G.; GARRIDO, E.R.; ROMERO, J.; NAVA, C. 2015. Factores socioeconómicos y parasitológicos que limitan la producción del

- cacao en Chiapas, México. Revista mexicana de fitopatología, 33(2): 232-246. [En línea]: <https://www.redalyc.org/jatsRepo/612/61242145008/html/index.html> (Consultado el 23 de enero del 2018).
36. IICA. 2006. Protocolo estandarizado de oferta tecnológica para el cultivo de cacao en el Perú. 14 p.
 37. ITC. 2001. Cocoa: A guide to trade practices. International Trade Centre. Product and Market Development. Geneva. 180 p.
 38. LEÓN, J. 2000. Botánica de los Cultivos Tropicales. Tercera edición. Costa Rica, San José, IICA. 678 p.
 39. LI, Z.; ABDOULAYE, T.; MAXIMOVA, S.; GUILTINAN, M. 1998. Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration from Floral Explants of Cacao (*Theobroma cacao* L.) Using Thidiazuron. In Vitro Cell. Dev. Biol.- Plant 34: 293-299.
 40. LITZ, R. E. 1986. Effect of osmotic stress on somatic embryogenesis in *Carica* suspension cultures. J. Amer. Soc. Hort. 111(6): 969-972.
 41. LITZ, R. E., CHÁVEZ, V. M.; MOON, P. A. 1998. Induction of embryogenic cultures from mature-phase tropical and subtropical trees and control of somatic embryo maturation and germination. Recent Advances in Biotechnology for Tree Conservation and management. 111(5): 232-243.
 42. LÓPEZ, O; BOLLON, H; ESKES, A; PÉTIARD, V. 1993. Embryogenèse Somatique de cacaoyer (*Theobroma cacao* L.) à partir de Pièces Florales. Compte- Rendus de L'Académie de Sciences 316: 579-584.

43. LÓPEZ, O.; MORENO, J.; PACHECO, S. 2001. Avances en propagación de cacao-*Theobroma cacao*- por embriogénesis somática en México. In Ingenic. Proceedings of the International Workshop on new Technologies and Cocoa Breeding. Malaysia. Ingenic. 163-176.
44. MATA, A. 2013. Evaluación de dos protocolos para la inducción de embriogénesis Somática en clones de cacao (*Theobroma cacao* L.) Seleccionados por el Programa de Mejoramiento Genético de Cacao del CATIE. Tesis M. Sc. CATIE. Turrialba, Costa Rica. 54 p.
45. MERCK. 2018. Extracto de malta. [En línea]: http://www.merckmillipore.com/PE/es/product/Maltextract, MDA_CHEM-105391 (Consultado el 14 de enero del 2018).
46. MERKLE. S.A.; WIECKO, A.T.; SOTAK, R.J.; SOMMER, H.E. 1990. Maturation and conversion of *Liriodendron tulipifera* somatic embryos. In Vitro Cell Dev. Biol. 26:1086 –1093.
47. MONTILLA, V. 2017. Establecimiento del sistema de embriogénesis somática en *Azadirachta indica* A. Juss a partir de suspensiones celulares, acoplado a la producción de azadiractina in vitro. Trabajo Especial de Grado para optar por el título de Licenciada en Biología. Universidad de Carabobo Facultad Experimental de Ciencias y Tecnología Departamento de Biología. 95 p. [En línea]: <http://mriuc.bc.uc.edu.ve/bitstream/handle/123456789/4568/VMontilla.pdf?sequen ce=1> (Consultado el 23 de agosto del 2018).
48. MORALES, O.; BORDA, A.; ARGANDOÑA, A.; FARACH, R.; GARCIA, L.; LAZO, K. 2015. La alianza cacao Perú y la cadena productiva del

- cacao fino de aroma. Universidad ESAN. Perú. 20 p. [En línea]:
<https://www.esan.edu.pe/publicaciones/2015/08/17> (Consultado el 14 de agosto 2018).
49. PARA CACAO. 2017. Guía 6: Manejo integrado de plagas de cacao. [En línea]: <http://cacaomovil.com/guia/6/contenido/suprimir-plagas-enfermedades/> (Consultado el 25 de marzo del 2017).
50. PARROT, W. 2002. La embriogénesis somática en las angiospermas. En: Resúmenes: VI Simposio Internacional de Biotecnología Vegetal, IBP UCLV. Santa Clara, Cuba. 5 – 6.
51. PENCE, V. 1995. Somatic embryogenesis in cacao (*Theobroma cacao*). *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, 30:455-467. [En línea]: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-662-03091-2_31 (Consultado el 24 de enero del 2018).
52. PIAGNANI, C; BIROCCHI, V; PELUCCHI, N; BONINI, L. 1996. Atti III Giomate Scientifiche SOL. Erice. 37 – 38.
53. QUIMBITA, B. 2011. 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.). Trabajo de diploma. Universidad de Granma. Facultad de Ciencias Agrícolas -Centro de Estudios de Biotecnología Vegetal. Bayamo, CU. 33 - 43.
54. ROCA, W.; MROGINSKI, L. 1991. Cultivo de tejidos en la agricultura (Fundamentos y Aplicaciones). Editorial XYZ. CIAT. Cali, Colombia. 969 p.

55. SAGARE, A; SUHASINI, K; KRISHNAMURTHY, K. 1993. Plant regeneration embryogenesis in chickpea (*Cicer arietinum* L.). Plant Cell Reports. 12: 652-655.
56. SHARP, W.R., EVANS, D.A.; SONDAHL, M.R. 1982. Application of somatic embryogenesis to crop improvement. In: Plant Tissue Culture 1982. Fujiwara, A. (Ed). Japan. Assoc. Plant Tissue Culture. 759-762.
57. SIGMA. 2018. (HPLC). SIGMA ALDRICH. [En línea]: <https://goo.gl/dE5GXe> (Consultado el 14 de enero del 2018).
58. SOLANO, W. 2008. Embriogénesis somática en clones superiores de cacao (*Theobroma cacao* L.) obtenidos en el programa de mejoramiento genético del CATIE. Tesis de Maestría. Costa rica: CATIE. 91 p.
59. SONDAHL, M.; LIU, S.; BELLATO, C., BRAGIN, A. 1993. Cacao somatic embryogenesis. Acta Hort. 336: 245–248
60. SREENATH, H.; SHANTA, H.; HARINAT, K.; NAIDU, M. M. 1995. Somatic Embryogenesis from Integument (perisperm) cultures of coffee. Plant Cell Reports 14: 670-673. [En línea]: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24194319> (Consultado el 23 de enero del 2018).
61. TOXOPEUS, H. 1985. Botany, Types and Population, in Cocoa. London. Longman. 11-13.
62. WOOD, G. y LASS, R. 1985. Cocoa, New York, Longman Group Limited. Cuarta edición. 620 p.

IX. ANEXO

Cuadro 45. Datos originales del tamaño de callos por tratamiento en el primer ensayo.

Trat.	Repeticiones					Total	Promedio
	I	II	III	IV	V		
T ₁	4.00	0.0	2.00	2.00	3.00	14.00	2.80
T ₂	4.00	3.00	2.00	0.0	2.00	13.00	2.60
T ₃	0.0	4.00	3.00	3.00	3.00	17.00	3.40
T ₄	5.00	4.00	0.0	3.00	3.00	19.00	3.80
T ₅	4.00	3.00	4.00	4.00	0.0	20.00	4.00
T ₆	3.00	4.00	4.00	5.00	5.00	21.00	4.20
T ₇	4.00	5.00	5.00	4.00	5.00	23.00	4.60
T ₈	4.00	5.00	6.00	4.00	5.00	24.00	4.80
T ₉	7.00	6.00	6.00	5.00	5.00	29.00	5.80
T ₁₀	9.00	8.00	7.00	9.00	7.00	40.00	8.00
T ₁₁	12.00	0.0	9.00	9.00	12.00	53.00	10.60
T ₁₂	11.00	10.00	9.00	12.00	0.0	53.00	10.60
T ₁₃	6.00	8.00	6.00	6.00	8.00	34.00	6.80
T ₁₄	13.00	13.00	15.00	14.00	14.00	69.00	13.80
T ₁₅	9.00	8.00	7.00	7.00	0.0	40.00	8.00
Total	99.00	95.00	89.00	89.00	97.00	469.00	93.80

Cuadro 46. Datos originales del tamaño de callos por tratamiento en el segundo ensayo.

Trat.	Repeticiones					Total	Promedio
	I	II	III	IV	V		
T ₁	1.00	1.00	2.00	0.0	2.00	8.00	1.60
T ₂	2.00	2.00	2.00	3.00	3.00	12.00	2.40
T ₃	2.00	3.00	4.00	3.00	3.00	15.00	3.00
T ₄	3.00	3.00	4.00	4.00	4.00	18.00	3.60
T ₅	3.00	2.00	3.00	3.00	3.00	14.00	2.80
T ₆	4.00	3.00	3.00	2.00	2.00	14.00	2.80
T ₇	4.00	3.00	3.00	4.00	3.00	17.00	3.40
T ₈	5.00	4.00	4.00	5.00	5.00	23.00	4.60
T ₉	4.00	5.00	5.00	5.00	6.00	25.00	5.00
T ₁₀	6.00	7.00	7.00	6.00	7.00	33.00	6.60
T ₁₁	7.00	7.00	8.00	8.00	7.00	37.00	7.40
T ₁₂	7.00	9.00	8.00	7.00	8.00	39.00	7.80
T ₁₃	9.00	7.00	9.00	8.00	7.00	40.00	8.00
T ₁₄	10.00	10.00	9.00	9.00	10.00	48.00	9.60
T ₁₅	7.00	7.00	8.00	8.00	7.00	37.00	7.40
Total	74.00	73.00	79.00	77.00	77.00	380.00	76.00

Cuadro 47. Datos del tiempo de aparición de callos por tratamiento en el primer ensayo.

Trat.	Repeticiones					Total	Promedio
	I	II	III	IV	V		
T ₁	29.80	0.0	35.80	35.80	32.80	164.00	32.80
T ₂	25.60	25.60	28.60	0.0	31.60	143.00	28.60
T ₃	0.0	27.00	30.00	27.00	27.00	135.00	27.00
T ₄	25.20	25.20	0.0	31.20	31.20	141.00	28.20
T ₅	33.80	30.80	36.80	33.80	0.0	169.00	33.80
T ₆	29.80	26.80	29.80	23.80	23.80	134.00	26.80
T ₇	30.20	24.20	24.20	30.20	27.20	136.00	27.20
T ₈	32.40	29.40	26.40	29.40	29.40	147.00	29.40
T ₉	24.00	27.00	27.00	27.00	30.00	135.00	27.00
T ₁₀	21.40	24.40	27.40	21.40	27.40	122.00	24.40
T ₁₁	18.20	0.0	24.20	24.20	18.20	106.00	21.20
T ₁₂	18.60	24.60	24.60	18.60	0.0	108.00	21.60
T ₁₃	25.60	19.60	25.60	22.60	19.60	113.00	22.60
T ₁₄	25.60	25.60	19.60	19.60	22.60	113.00	22.60
T ₁₅	21.00	24.00	27.00	27.00	0.0	120.00	24.00
Total	385.20	385.20	415.20	403.20	397.20	1986.00	397.20

Cuadro 48. Datos del tiempo de aparición de callos por tratamiento en el segundo ensayo.

Trat.	Repeticiones					Total	Promedio
	I	II	III	IV	V		
T ₁	29.80	29.80	35.80	0.0	32.80	164.00	32.80
T ₂	25.60	25.60	28.60	31.60	0.0	143.00	28.60
T ₃	24.00	0.0	30.00	27.00	27.00	135.00	27.00
T ₄	25.20	25.20	28.20	31.20	31.20	141.00	28.20
T ₅	33.80	30.80	36.80	33.80	33.80	169.00	33.80
T ₆	29.80	0.0	29.80	23.80	23.80	134.00	26.80
T ₇	30.20	24.20	24.20	30.20	27.20	136.00	27.20
T ₈	32.40	29.40	26.40	29.40	29.40	147.00	29.40
T ₉	24.00	27.00	27.00	27.00	30.00	135.00	27.00
T ₁₀	21.40	24.40	27.40	21.40	27.40	122.00	24.40
T ₁₁	18.20	21.20	24.20	24.20	18.20	106.00	21.20
T ₁₂	18.60	24.60	24.60	18.60	21.60	108.00	21.60
T ₁₃	25.60	19.60	25.60	22.60	19.60	113.00	22.60
T ₁₄	25.60	25.60	19.60	19.60	22.60	113.00	22.60
T ₁₅	21.00	24.00	27.00	27.00	21.00	120.00	24.00
Total	385.20	385.20	415.20	403.20	397.20	1986.00	397.20

Cuadro 49. Datos del tiempo de aparición de estructuras proembriogénicas por tratamiento en el primer ensayo.

Trat.	Repeticiones					Total	Promedio
	I	II	III	IV	V		
T ₁	19.60	0.0	25.60	25.60	22.60	113.00	22.60
T ₂	21.40	21.40	24.40	00.0	27.40	122.00	24.40
T ₃	0.0	31.40	34.40	31.40	31.40	157.00	31.40
T ₄	18.20	18.20	0.0	24.20	24.20	106.00	21.20
T ₅	19.20	16.20	22.20	19.20	0.0	96.00	19.20
T ₆	22.20	19.20	22.20	16.20	16.20	96.00	19.20
T ₇	19.20	13.20	13.20	19.20	16.20	81.00	16.20
T ₈	20.40	17.40	14.40	17.40	17.40	87.00	17.40
T ₉	12.20	15.20	15.20	15.20	18.20	76.00	15.20
T ₁₀	12.60	15.60	18.60	12.60	18.60	78.00	15.60
T ₁₁	8.60	0.0	14.60	14.60	8.60	58.00	11.60
T ₁₂	7.20	13.20	13.20	7.20	0.0	51.00	10.20
T ₁₃	15.80	9.80	15.80	12.80	9.80	64.00	12.80
T ₁₄	17.00	17.00	11.00	11.00	14.00	70.00	14.00
T ₁₅	15.40	18.40	21.40	21.40	0.0	92.00	18.40
Total	257.40	257.40	287.40	275.40	269.40	1347.00	269.40

Cuadro 50. Datos del tiempo de aparición de estructuras proembriogénicas por tratamiento en el segundo ensayo.

Trat.	Repeticiones					Total	Promedio
	I	II	III	IV	V		
T ₁	25.60	25.60	31.60	0.0	28.60	143.00	28.60
T ₂	21.80	21.80	24.80	27.80	0.0	124.00	24.80
T ₃	0.0	31.80	34.80	31.80	31.80	159.00	31.80
T ₄	20.80	20.80	23.80	26.80	26.80	119.00	23.80
T ₅	22.20	19.20	25.20	22.20	22.20	111.00	22.20
T ₆	22.40	0.0	22.40	16.40	16.40	97.00	19.40
T ₇	19.60	13.60	13.60	19.60	16.60	83.00	16.60
T ₈	20.80	17.80	14.80	17.80	17.80	89.00	17.80
T ₉	21.80	24.80	24.80	24.80	27.80	124.00	24.80
T ₁₀	13.00	16.00	19.00	13.00	19.00	80.00	16.00
T ₁₁	10.20	13.20	16.20	16.20	10.20	66.00	13.20
T ₁₂	11.40	17.40	17.40	11.40	14.40	72.00	14.40
T ₁₃	16.80	10.80	16.80	13.80	10.80	69.00	13.80
T ₁₄	19.80	19.80	13.80	13.80	16.80	84.00	16.80
T ₁₅	18.00	21.00	24.00	24.00	18.00	105.00	21.00
Total	293.00	293.00	323.00	311.00	305.00	1525.00	305.00

Cuadro 51. Datos del número de estructuras pro-embriogénicas por tratamiento en el primer ensayo.

Trat.	Repeticiones					Total	Promedio
	I	II	III	IV	V		
T ₁	1.00	0.0	0.00	1.00	1.00	4.00	0.80
T ₂	1.00	1.00	2.00	0.0	2.00	8.00	1.60
T ₃	0.0	1.00	1.00	1.00	1.00	5.00	1.00
T ₄	1.00	1.00	0.0	0.0	1.00	3.00	0.60
T ₅	2.00	2.00	1.00	2.00	0.0	9.00	1.80
T ₆	2.00	1.00	2.00	0.0	1.00	7.00	1.40
T ₇	3.00	2.00	2.00	3.00	2.00	12.00	2.40
T ₈	1.00	1.00	1.00	1.00	0.0	5.00	1.00
T ₉	1.00	1.00	1.00	2.00	2.00	7.00	1.40
T ₁₀	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	10.00	2.00
T ₁₁	2.00	0.0	2.00	2.00	2.00	10.00	2.00
T ₁₂	2.00	3.00	3.00	2.00	3.00	13.00	2.60
T ₁₃	4.00	3.00	4.00	4.00	3.00	18.00	3.60
T ₁₄	2.00	2.00	1.00	1.00	1.00	7.00	1.40
T ₁₅	1.00	2.00	2.00	2.00	0.0	8.00	1.60
Total	25.00	24.00	25.00	27.00	25.00	126.00	25.20

Cuadro 52. Datos del número de estructuras pro-embriogénicas por tratamiento en el segundo ensayo.

Trat.	Repeticiones					Total	Promedio
	I	II	III	IV	V		
T ₁	1.00	1.00	2.00	0.0	1.00	6.00	1.20
T ₂	1.00	1.00	2.00	2.00	0.0	8.00	1.60
T ₃	1.00	0.0	1.00	1.00	1.00	6.00	1.20
T ₄	1.00	1.00	0.0	1.00	1.00	5.00	1.00
T ₅	1.00	1.00	0.0	1.00	1.00	6.00	1.20
T ₆	1.00	0.0	1.00	0.0	1.00	6.00	1.20
T ₇	2.00	2.00	1.00	2.00	2.00	9.00	1.80
T ₈	1.00	1.00	2.00	1.00	1.00	6.00	1.20
T ₉	1.00	1.00	1.00	2.00	0.0	7.00	1.40
T ₁₀	1.00	1.00	2.00	1.00	2.00	7.00	1.40
T ₁₁	2.00	2.00	0.0	3.00	2.00	11.00	2.20
T ₁₂	2.00	3.00	3.00	2.00	2.00	12.00	2.40
T ₁₃	3.00	3.00	2.00	3.00	3.00	14.00	2.80
T ₁₄	2.00	2.00	1.00	1.00	1.00	7.00	1.40
T ₁₅	1.00	0.0	1.00	1.00	1.00	5.00	1.00
Total	21.00	23.00	24.00	24.00	23.00	115.00	23.00



Figura 20. Conteo del número de estructuras pro embriogénicas por efecto de las dosis de malta y hormonas.



Figura 21. Evaluación del tamaño de callo de los estaminodios de cacao.

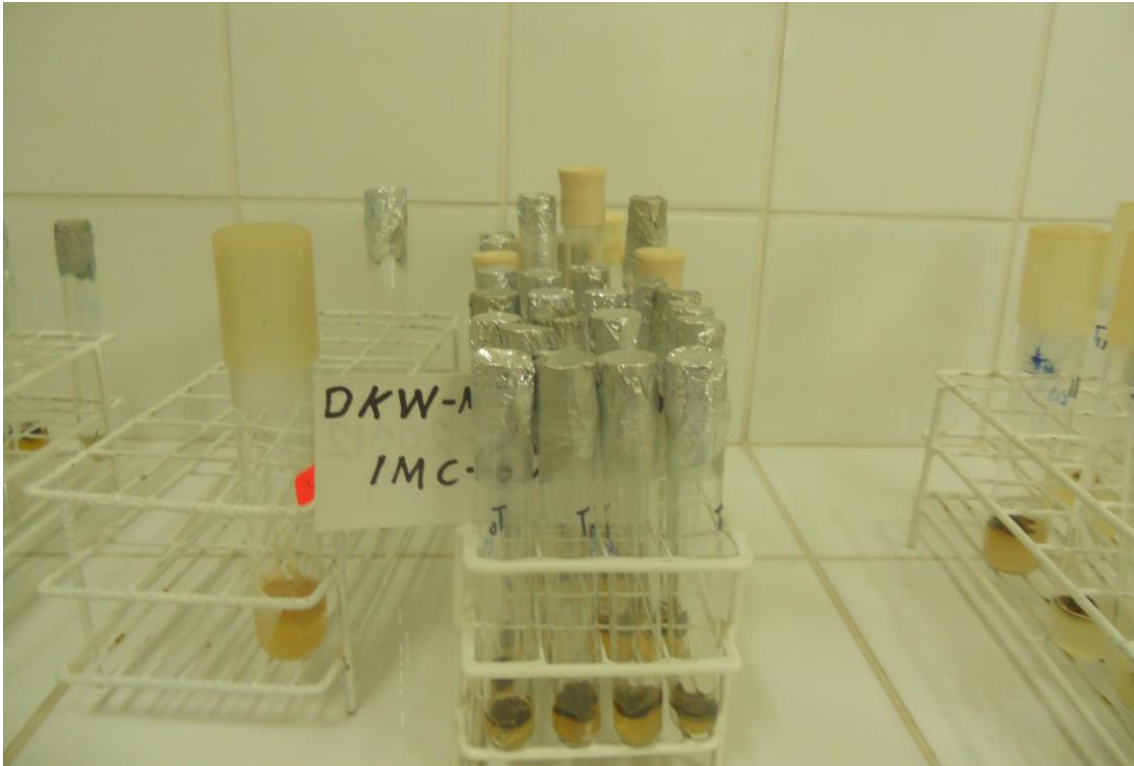


Figura 22. Explantes del clon IMC-67 con sus diferentes tratamientos.

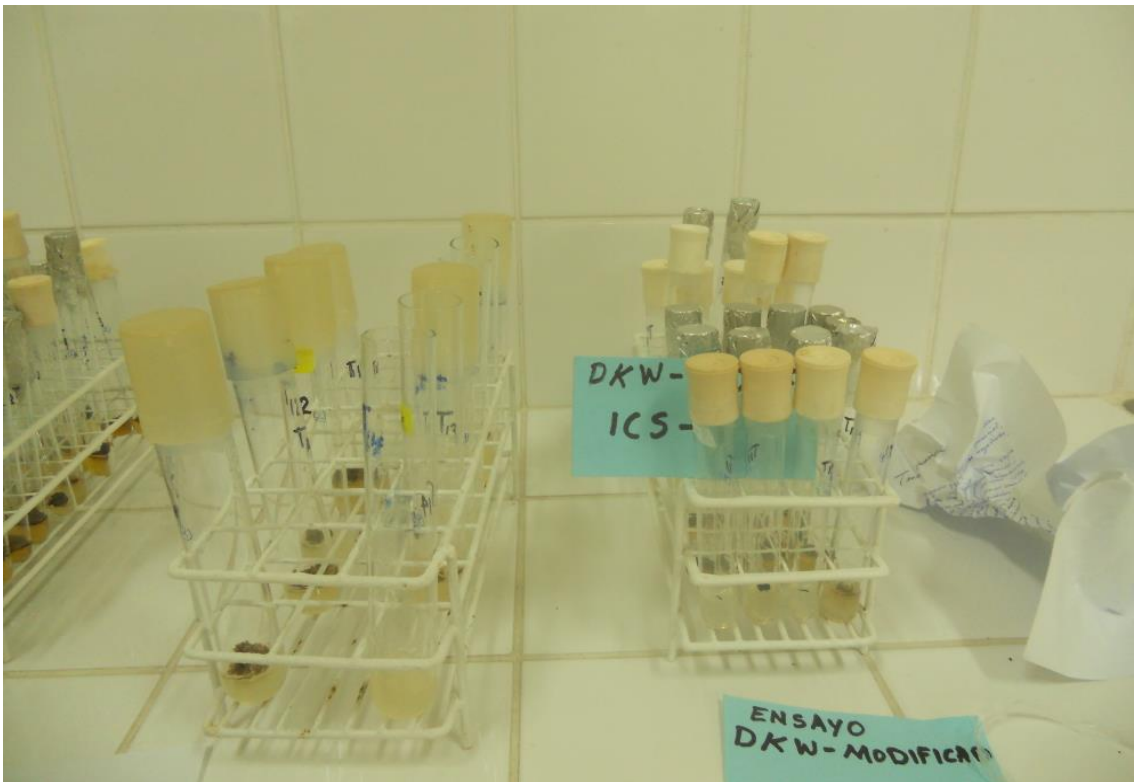


Figura 23. Explantes del clon ICS-1 con sus diferentes tratamientos.

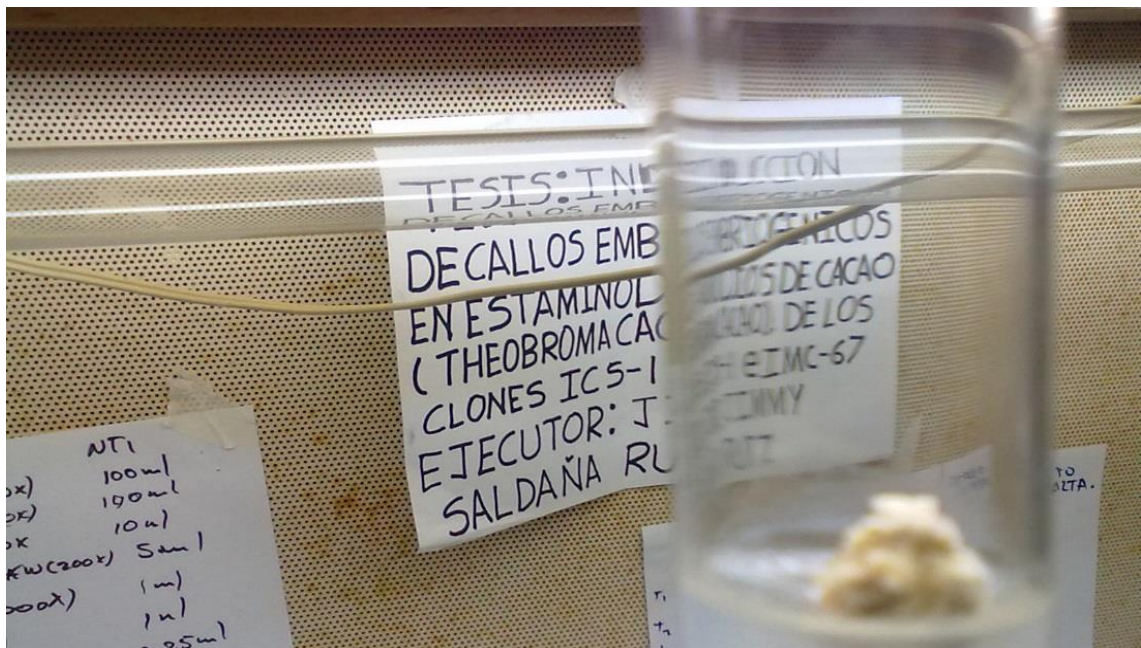


Figura 24. Formación de callo del clon ICS-1 con estructuras proembriogénicas presentes.

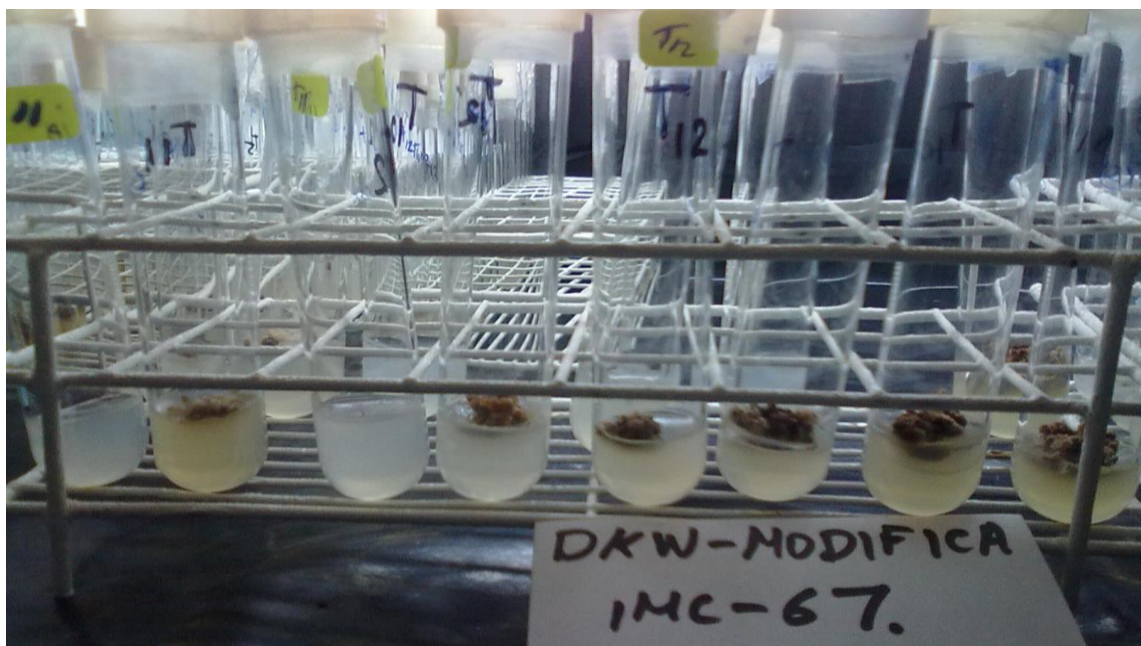


Figura 25. Formación de callo del clon IMC-67 con presencia de embriones somáticos.