

EFFECTO DE LA FUENTE DE CARBONO SOBRE LA ORGANOGÉNESIS Y EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN CACAO. ANÁLISIS CITOGÉNÉTICO

CARBON SOURCE EFFECT ON CACAO ORGANOGENESIS AND SOMATIC EMBRYOGENESIS. CITOGENETIC ANALYSIS

Giovanna F. Santana M.*, Rosalía Velásquez S.* y Jonás Mata*

*Profesores. Universidad Central de Venezuela. Maracay, estado Aragua. Venezuela.
E-mail: santanagiovanna@gmail.com, velasquezr@agr.ucv.ve, matajonas@yahoo.com

RESUMEN

Con el propósito de obtener un protocolo para la inducción de callos y embriones somáticos (ES) *in vitro* de cultivares de cacao, *Theobroma cacao* L., venezolano: OCUMARE-61, OCUMARE-67, CHORONÍ-42, GUASARE-133, CHUAO-2, SANTA CRUZ DE LA VEGA-6 y SANTA CRUZ-10, se utilizó el cultivo de anteras y pétalos en medio de DKW, empleando tres fuentes de carbono (FC): glucosa, fructosa y sacarosa, bajo un diseño completamente aleatorizado con arreglo factorial 3x7. Se seleccionaron botones florales de 1,5 a 2 mm de longitud con microsporas en tétradas y se trataron previamente a 12±2 °C por 48 h. Para la inducción de callos y masas proembriogénicas se adicionaron agua de coco y aminoácidos. Los resultados obtenidos en porcentaje de explantes abultados, necrosados, inducción de callos y nivel de ploidía se analizaron mediante las pruebas Kruskal y Wallis. En este trabajo fue difícil lograr callos en ambos explantes y la respuesta varió con los genotipos y las FC. Los estudios histológicos determinaron callos organogénicos para algunos genotipos, pero sólo se observó la formación de raíces a partir de anteras de OCUMARE-61 y pétalos de CHUAO-2 en medio con sacarosa. La embriogénesis somática ocurrió a partir de pétalos de SANTA CRUZ-10 con glucosa. El conteo cromosómico determina que las raíces provenientes de anteras tenían carga genética haploide (2n=X=10), lo que indica la viabilidad de obtener *in vitro* plantas monoploides de cacao, evaluando así el efecto que tienen diferentes factores de tipo físico y químico sobre la respuesta organogénica de inducción de brotes en cacao.

Palabras Clave: anteras; haploides; *in vitro*; pétalos; *Theobroma cacao* L.

SUMMARY

The culture of anthers and petals *in vitro* has been used in this research in order to get a protocol to induce callus formation and somatic embryogenesis in seven venezuelan cacao, *Theobroma cacao* L., cultivars: OCUMARE-61, OCUMARE-67, CHORONÍ-42, GUASARE-133, CHUAO-2, SANTA CRUZ DE LA VEGA-6 and SANTA CRUZ-10, using DKW media and three different carbon sources: glucose, fructose and sucrose. The randomized design in a factorial arrangement 3x7 was used. Floral buds of 1.5 to 2 mm of length with microspores in tetrad stage were selected and treated at 12 °C for 48h. To callus and proembryogenic masses development, coconut water and aminoacids respectively was added in culture medium. The results of percentage of expanded explants, necrosis, callus induction and ploidy level were analyzed through Kruskal and Wallis test. In this research, callus formation was difficult for both explants and responses varies with cultivars and carbon source. Histological analysis allowed to establish the formation of organogenic callus in some cultivars, but only OCUMARE-61 anthers and CHUAO-2 petioles growing in media supplemented with sucrose, root formation was observed. Somatic embryogenesis was formed from SANTA CRUZ-10 petioles with glucose. The chromosomal analysis of roots revealed haploid number (2n=X=10), indicating the viability to obtain haploid cocoa plants through the anther culture technique, so it is important to study the effect of the physical and chemical factors may have under the induction of shoots and roots of cocoa somatic embryos.

Key Words: anthers, haploid; *in vitro*; petals; *Theobroma cacao* L.

RECIBIDO: noviembre 19, 2008

INTRODUCCIÓN

El cacao, *Theobroma cacao* L., es una planta de la familia Sterculiaceae del orden Malvaceae (Whitlock *et al.*, 2001) que contiene 22 especies, siendo el cacao el más importante en el mercado (Rondón y Cumaná, 2005) que al procesar la semilla se elabora el chocolate y otros productos comerciales.

La calidad de esta especie se determina por las características físicas del grano y por su sabor (Graziani, 2000). La desmejora en las plantaciones originó bajos volúmenes de producción y disminución progresiva de la calidad del cacao venezolano (Pinto, 1997).

En la actualidad, los sembradíos de cacao en el país están formados por árboles de avanzada edad y bajo rendimiento, influyendo en la pérdida de los atributos del producto. Los programas de mejoramiento genético del cultivo se mostraron afectados no sólo por estos factores, sino, por la alta variabilidad genética encontrada en las plantaciones, aunado a las características botánicas del cultivo, limitando la propagación de la especie a través de las técnicas convencionales y modernas.

En consecuencia, los nuevos enfoques de las investigaciones se orientan hacia la optimización de los genotipos venezolanos, empleando técnicas de cultivo *in vitro*, con la finalidad de desarrollar protocolos de propagación masiva de plantas de cacao de alta calidad.

La importancia de la obtención de plantas haploides radica en los programas de mejoramiento genético de este cultivo, porque con el método tradicional, el desarrollo de variedades, híbridos y líneas promisorias duraría entre 30 y 40 años, mientras que aplicando técnicas de cultivo *in vitro* podría reducirse el tiempo a la mitad (Ascanio y Arcia, 1994).

Las técnicas convencionales de propagación del cacao fueron ineficaces y costosas debido a la arquitectura dimorfa del árbol y el predominio de ramas plagiotrópicas. Una de las ventajas del cultivo de tejidos es posibilitar la propagación asexual y de forma rápida plantas uniformes con rasgos genéticos valorados. Además, para el cacao, la embriogénesis somática ofrece un sistema de producción de clones con arquitectura dimorfa normal y un sistema radical fuerte (Maximova *et al.*, 2002).

El mejoramiento de los clones existentes y la renovación de viejas plantaciones de los campos venezolanos, planteó la necesidad de inducir embriones somáticos (ES) a partir de anteras y pétalos, que pudieran utilizarse

para la propagación de genotipos valiosos. Además, los ES obtenidos por cultivo de anteras, permitirían producir plantas haploides, para incluirse en los programas de mejoramiento genético de esta especie y lograr líneas o híbridos de alta calidad.

MATERIALES Y MÉTODOS

Esta investigación se realizó en el laboratorio de cultivo de tejidos del Centro de Investigaciones en Biotecnología Agrícola (CIBA) de la Universidad Central de Venezuela, Facultad de Agronomía, Maracay, estado Aragua. En estudio previo, se evaluó el efecto del tamaño del botón floral y shock térmico sobre la androgénesis del cacao (Santana *et al.*, 2007), permitiendo establecer el cultivo de anteras en botones comprendidos entre 1,5 a 2 mm como óptimos, que fueron preservados a temperatura de 12 ± 2 °C por 48 h en nevera, por cuanto poseían microsporas en estado uninucleado en mayor proporción. De estos botones se extrajeron los pétalos para el cultivo *in vitro*.

Se emplearon los genotipos: OCUMARE-61 (g1), OCUMARE-77 (g2), CHORONÍ-42 (g3), GUASARE-133 (g4), CHUAO-2 (g5), SANTA CRUZ DE LA VEGA-6 (g6) y SANTA CRUZ-10 (g7) y se trataron con tres diferentes fuentes de carbono (FC): glucosa, fructosa y sacarosa, bajo un diseño aleatorizado con arreglo factorial 3x7. Se establecieron 21 tratamientos con cinco repeticiones y la unidad experimental se conformó por un botón floral (cinco explantes) por cápsula de Petri.

Antes del trasplante, los botones fueron lavados con solución jabonosa y de cloro comercial 30% por 10 min y con agua destilada, posteriormente, bajo cámara de flujo laminar, se cortaron en el extremo axial con la finalidad de extraer las anteras y los pétalos.

Los explantes se implantaron por separado en el medio de cultivo siguiendo el protocolo descrito por Maximova *et al.* (2002), con modificaciones en la cantidad de la FC utilizada (80 g.l⁻¹) y concentración de Tildiazurón por tipo de explante (0,005 mg.l⁻¹ para pétalos y 0,5 mg.l⁻¹ para anteras).

Para el crecimiento de los callos, el medio se suplementó con 2,4-D (2 mg.l⁻¹), kinetina (0,3 mg.l⁻¹) y agua de coco (50 ml.l⁻¹) y transcurridas cuatro semanas, se transfirió al medio básico DKW (Driver y Kuniyuki, 1984), sin reguladores de crecimiento. Para inducir las masas proembriogénicas se empleó el DKW suplementado

con 0,3 g.l⁻¹ de KNO₃ y aminoácidos bajo condiciones de luz fluorescente a 25±2 °C, para su desarrollo, el DKW con 0,2 g.l⁻¹ de KNO₃ y 0,9 mg.l⁻¹ de bencilaminopurina (6-BA).

Se evaluó el porcentaje de explantes abultados a los 7 días de implantación (DI); y a los 85 DI, porcentaje de inducción de callos, porcentaje de explantes necrosados por genotipo y FC utilizada.

Para las observaciones anatómicas se tomaron callos a los 125 DI de cultivo, a objeto de constatar la formación de ES. Se fijaron las masas proembriogénicas en una solución de FAA 70%, se deshidrataron en una serie ascendente de etanol-terbutanol por 3 h en cada concentración, luego se empaparon con parafina para cortarlos con un micrótopo en secciones de 10 µ. En la tinción se empleó el contraste de Safranina-Fast Green y se realizó el montaje permanente con bálsamo de Canadá.

En la determinación de los niveles de ploidía se tomaron puntas de raíces de aproximadamente 1 cm de longitud, previamente tratados con paradichlorobenceno en solución acuosa saturada, a temperatura ambiente por 3 h y lavado tres veces con agua destilada estéril por 5 min cada uno.

La fijación se realizó dejando las muestras toda la noche en solución Carnoy (etanol: ácido acético; 3:1), seguido de dos lavados con etanol al 70% por 10 min cada uno y sometidos a una hidrólisis en HCl 1N por 7 min a 60 °C, por último, se lavaron tres veces con agua destilada estéril por 5 min cada uno. La tinción se realizó con el reactivo de Schiff (2 g de Fucsina básica/400 ml⁻¹ de agua destilada a 100 °C).

Finalmente, las raíces se colocaron en un portaobjeto con la ayuda de una varilla de vidrio, se aplastaron y se observaron bajo el microscopio de luz.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La primera respuesta callogénica se detectó una semana después de la implantación, por el aumento en el tamaño de las anteras y bases de los pétalos, coincidiendo con Velásquez (2005) para cultivares de cacao venezolanos.

Las evaluaciones estadísticas mostraron una influencia significativa de las FC sobre el abultamiento en las anteras (P=0,0002), observándose, superiores efectos con el uso de sacarosa. Sin embargo, en los pétalos no se evidenciaron diferencias significativas por la FC

empleada (P=0,6532), aún cuando el efecto genotípico fue marcado (P=0,0000) (Cuadro 1), con avances en SCLV-6, CHU-2 y OC-61.

CUADRO 1. Resultados estadísticos para abultamiento en anteras y pétalos de cacao, empleando glucosa, fructosa y sacarosa, como fuentes de carbono y siete genotipos de cacao venezolano.

	Fuentes de carbono		Genotipos empleados	
	Anteras	Pétalos	Anteras	Pétalos
α	0,05	0,05	0,05	0,05
Z	2,394	2,394	3,038	3,038
P_x^2	0,0003	0,649	0,092	0,000
p	0,0002***	0,6532	0,0868	0,000***

Prueba de Kruskal y Wallis.

Estos resultados, demostraron que inicialmente los explantes estuvieron asociadas tanto a las FC como a los genotipos empleados, coincidiendo con lo señalado por López-Baez *et al.* (2000); Velásquez *et al.* (2006) sobre variables evaluadas *in vitro*.

A los 14 DI de cultivo se evidenció un cambio en la coloración de las anteras para los genotipos SCLV-6 (g6), CHU-2 (g5) y OC-61 (g1), presentándose hialinos, amarillo-naranja y naranja, respectivamente; para el caso de los pétalos la respuesta fue más tardía.

El total de anteras y pétalos necrosados a los 58 DI fue de 50,31 y 48,79%, respectivamente, observándose mayor necrosis cuando los explantes se cultivaron en medio con glucosa y sacarosa. Sin embargo, el análisis estadístico no arrojó diferencias (anteras: P=0,6084; pétalos: P=0,8546), indicando que bajo las condiciones de experimentación la FC (Cuadro 2) no generó efecto sobre esta variable, ni los genotipos utilizados (anteras: P=0,0932; pétalos: P=0,0887).

En general, la mayoría de explantes necrosados en diferentes genotipos de cacao para este estudio no formaron callos, probablemente por el efecto inhibitorio que presentaron los compuestos fenólicos sobre el crecimiento de los tejidos. Esto coincide con González *et al.* (2005), quienes señalaron que la disminución en el proceso de inducción de callos en café (*Coffea arabica* L.) fue producto de una asociación de estos compuestos con proteínas que inhiben el crecimiento.

CUADRO 2. Resultados estadísticos para la necrosis en anteras y pétalos de cacao, empleando glucosa, fructosa y sacarosa, como fuentes de carbono y siete genotipos de cacao venezolano.

	Fuentes de carbono		Genotipos empleados	
	Anteras	Pétalos	Anteras	Pétalos
α	0,05	0,05	0,05	0,05
Z	2,394	0,3219	10,6303	10,7651
P_x^2	0,6022	0,8513	0,1005	0,0959
p	0,6084	0,8546	0,0932	0,0887

Prueba de Kruskal y Wallis.

Formación de callos

En los pétalos, la formación de callos se evidenció en el medio del cultivo a los 10 DI, mientras que en anteras fue a los 5 DI, ambas con un bajo porcentaje de inducción bajo. Aún cuando la prueba estadística no detectó diferencias ocasionadas por las FC (anteras: $P=0,3398$; pétalos: $P=0,2639$) en el medio de cultivo (Cuadro 3) que fue suplementado con fructosa, no ocurrió la formación de callos en ninguno de los genotipos evaluados (Figura 1).

La nula discriminación de la prueba estadística para este parámetro podría ser explicado por las pérdidas de materiales debido a la contaminación (datos sin reportar) que no se compensaron por el número establecido de repeticiones al incrementar el error experimental y enmascarar los resultados obtenidos, señalando así, que aquellos explantes abultados no son potenciales a formar callos.

Se evidenció que para las anteras los únicos genotipos que reaccionaron fueron CHO- 42 (1,57%) y OC-61 (1,57%) con el tratamiento de sacarosa, seguido del genotipo OC-77 (0,31%) con glucosa, aún cuando la respuesta obtenida fue baja, lográndose un sólo callo. Para los pétalos, la formación tuvo el mismo comportamiento, reaccionando SC-10 (1,73%) y OC-61 (1,04%) en medio con glucosa y SCLV-6 (1,38%) y CHU-2 (1,04%) en el suplementado con sacarosa (Figura 2).

Los callos de SC-10 se oxidaron después de 48 d de cultivo, posiblemente ocasionado por la activación del mecanismo fisiológico de defensa, con la finalidad de

contrarrestar los factores estresantes producto de las condiciones *in vitro*, así como a la naturaleza de los explantes de cacao de generar compuestos fenólicos (Alemanno *et al.*, 1996).

La mayoría de los callos obtenidos en esta investigación presentaron marcada heterogeneidad, mostrando zonas lisas necrosadas y diferentes texturas, igualmente, estructuras cristalinas: globulares, alargadas rectas y alargadas bifurcadas (Figura 3), parecidas a las fases de desarrollo de los ES; las mismas se asemejaron a las descubiertas por Chantásig (2004) en genotipos forasteros. No obstante, en ese estudio los análisis histológicos realizados en este tipo de callos indicaron que no eran embriogénicos.

Sin embargo, para los otros callos diferentes a esta descripción, se detectó la presencia de células embriogénicas y no embriogénicas, donde éstas, se caracterizaron por ser alargadas, agrupadas en cadena de pared celular delgada, citoplasma poco denso y núcleo inconspicuo, en contraste, las células embriogénicas se presentaron en conglomerados celulares redondeados de pared celular gruesa y núcleo prominente (Figura 4), coincidiendo estos resultados con trabajos para el cultivo de cacao y otras siembras (Ascanio, 1999; Michelangeli *et al.*, 2003; Velásquez *et al.*, 2006).

Las masas callosas del genotipo OC-61 de color blanco, vítreo, conformado por estructuras alargadas y bifurcadas, no revelaron la presencia de células embriogénicas, demostrando que este tipo de callo, bajo las condiciones de experimentación establecidas, no conlleva a la formación de embriogénesis somática, así como indicaron otros autores usando genotipos de cacao forasteros (Chantásig, 2004; Maxinova *et al.*, 2005).

CUADRO 3. Resultados estadísticos para la inducción de callos en anteras y pétalos de cacao, empleando glucosa, fructosa y sacarosa, como fuentes de carbono y siete genotipos de cacao venezolano.

	Fuentes de carbono		Genotipos empleados	
	Anteras	Pétalos	Anteras	Pétalos
α	0,05	0,05	0,05	0,05
Z	2,394	2,394	3,038	3,038
P_x^2	0,3351	0,2608	0,7524	0,3724
p	0,3398	0,2639	0,7672	0,3793

Prueba de Kruskal y Wallis.

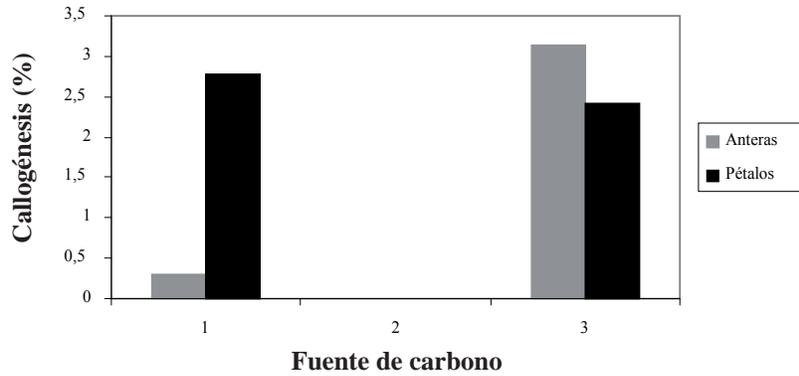
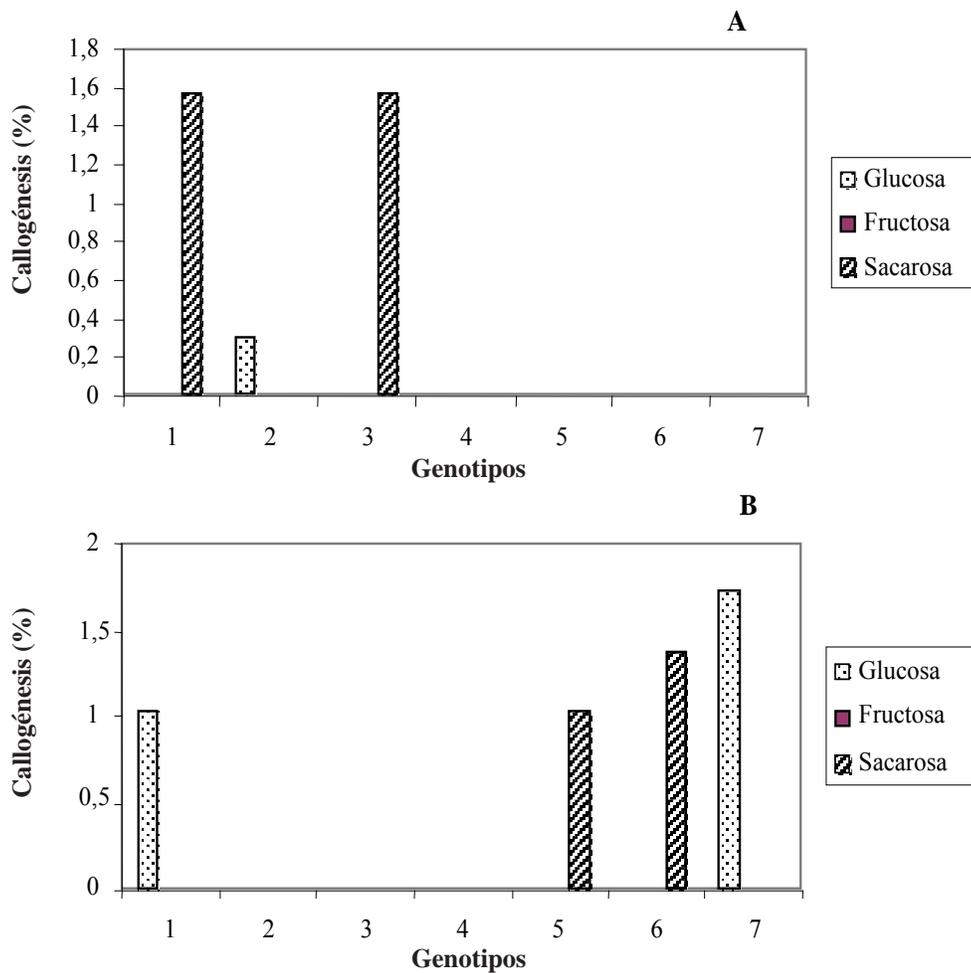


FIGURA 1. Porcentaje de inducción de callos general a partir de explantes florales de genotipos de cacao venezolano. 1. Glucosa; 2. Fructosa; 3. Sacarosa.



1) OCUMARE- 61; 2) OCUMARE-77; 3) CHORONÍ-42; 4) GUASARE-133; 5) CHUAO-2; 6) SANTA CRUZ DE LA VEGA-6; 7) SANTA CRUZ-10.

FIGURA 2. Porcentaje de inducción de callos de cada uno de los genotipos de cacao venezolano en función al tipo de fuente de carbono empleado. **A.** Anteras; **B.** Pétalos.



FIGURA 3. Heterogeneidad morfológica en callos no embriogénicos obtenidos a partir de explantes florales de cacao venezolano. **A.** Callo con estructuras globulares en algunos casos similares a la forma de torpedos; **B.** Callo con estructuras alargadas bifurcadas; **C.** Callo con racimos de estructuras alargadas.

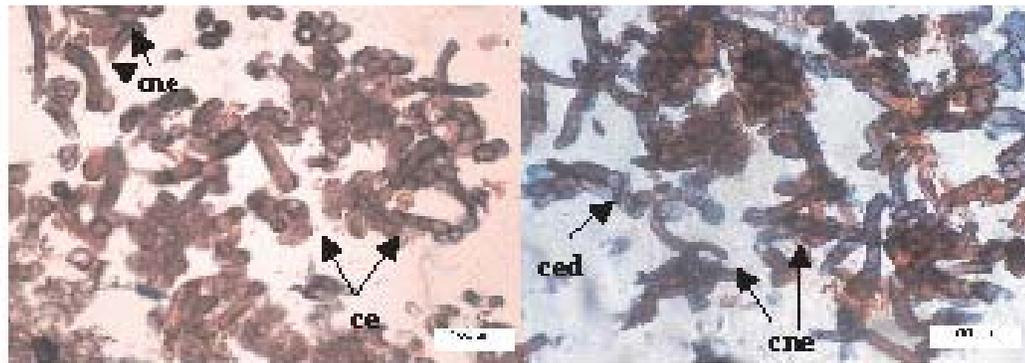


FIGURA 4. Células embriogénicas (ce), no embriogénicas (cne) y células embriogénicas en división (ced) obtenidas a partir de callos de explantes florales de cacao venezolano.

Se indicó que todos los explantes tienen la capacidad de formar callos *in vitro*, sin embargo, no todos poseen la capacidad para generar masas embriogénicas (Litz y Jarret, 1991), explicado por las diferencias genotípicas encontradas en el material vegetal. En este trabajo, la embriogénesis somática se evidenció al séptimo mes de implantación sólo para callos provenientes de pétalos de SANTA CRUZ-10, creciendo en el medio con glucosa (Figura 5).

Resultados similares obtuvo Chantásig (2004) y Maximova *et al.* (2005) a diferencia de otros autores, quienes presentaron a la sacarosa como única FC donde se obtuvo respuesta embriogénica (Traore y Guiltinan, 2006). No se logró la inducción de ES en callos de anteras.

Aún cuando se evidenció que el material expuesto a bajas temperaturas por períodos de tiempo cercanos a una semana, produjo un efecto positivo sobre la respuesta morfológica en cacao (Texeira *et al.*, 2002), es posible que el bajo porcentaje de formación de callos y ES obtenidos en este experimento, fue ocasionado, entre

otros factores, al tiempo prolongado de exposición al shock térmico (2 d), también señalado por algunos autores (López Baez *et al.*, 2000; Trejo *et al.*, 2002).

En el caso de la baja morfogénesis de las anteras, es posible que esté asociado al estado uninucleado temprano de la microspora, no siendo el óptimo para el cultivo, ocasionalmente se originan respuestas favorables en el proceso de androgénesis, por tal motivo, requiere estudiarse el cultivo de anteras cuyo estado uninucleado sea medio o tardío, tal como ocurre en arroz (Lentini *et al.*, 1997).

En consecuencia, los resultados de esta investigación en cacao confirman lo señalado por otros autores que afirmaron la existencia del efecto del genotipo sobre la respuesta morfológica bajo las condiciones *in vitro*, la fisiología del material, tipo de explante, la concentración y tipo de regulador de crecimiento empleados (López-Báez *et al.*, 2000; Chantásig, 2004; González *et al.*, 2005; Velásquez *et al.*, 2006).



FIGURA 5. Embrión somático a partir de un tejido caloso de pétalos del genotipo SANTA CRUZ-10.

Organogénesis

Se logró inducir la organogénesis indirecta a partir de explantes de pétalos y anteras de los genotipos CHU-2 y OC-61, respectivamente, ambos en medio suplementado con sacarosa. Los callos se diferenciaron en las raíces, teniendo un aspecto friable y color crema, sin que se evidenciara la presencia de embriones somáticos (Figuras 6).

Los análisis anatómicos de una sección de callo de pétalos de SCLV-6 en sacarosa y anteras de OC-61 y OC-77 en sacarosa y glucosa respectivamente, permitieron determinar que los mismos eran organogénicos debido a sus arreglos celulares (Figura 7).

Los resultados obtenidos indicaron la posibilidad de regenerar plantas a partir de masas organogénicas, tal como lo mostró Mena (1991) para genotipos forasteros.

Niveles de ploidía

A partir de la técnica de conteo cromosómico se observó que los tejidos radicales provenientes del cultivo de pétalos del genotipo criollo CHU-2, conservaron su naturaleza diploide ($2n=2x=20$), mientras que las raíces inducidas a partir de anteras del genotipo OC-61 fueron monoploides ($2n=x=10$), indicando que las mismas se originaron del polen haploide ($n=x=10$), registrándose este hallazgo como el primero para esta especie (Figura 8). Este logro confirma que es viable la regeneración de plantas haploides de cacao a partir de anteras, sólo se tendría que evaluar los diferentes factores de tipo físico y químico que pudieran estar afectando la respuesta organogénica de inducción de brotes.

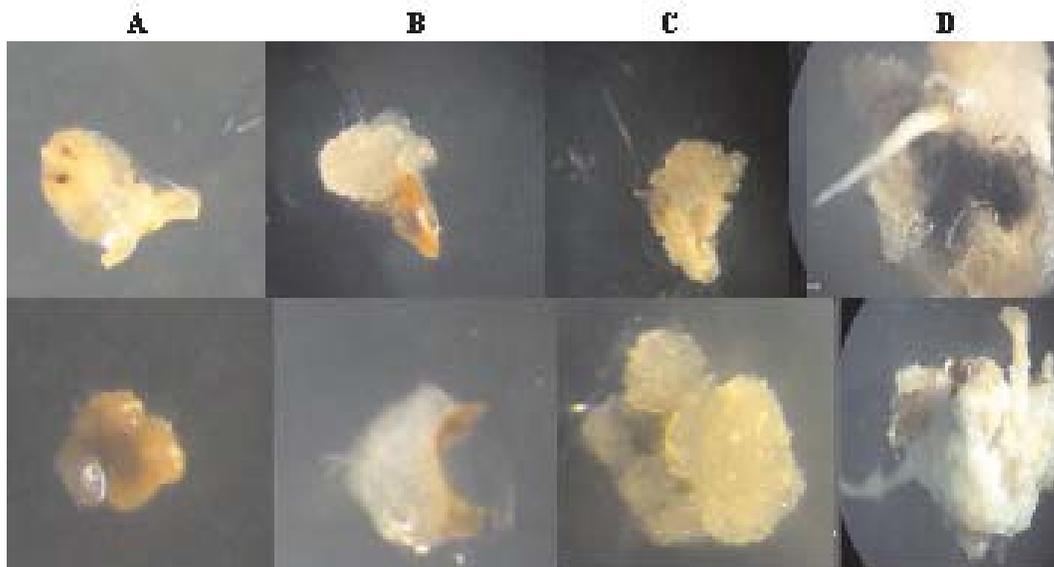


FIGURA 6. Cambios secuenciales en la morfología del explante durante la formación de callos y organogénesis a partir de pétalos de CHUAO-2 y anteras de OCUMARE-61 suplementados con sacarosa. **A.** Explante turgente; **B.** Inicio de calogénesis; **C.** Callo cubriendo casi todo el explante; **D.** Formación de raíz a partir de la masa callosa.

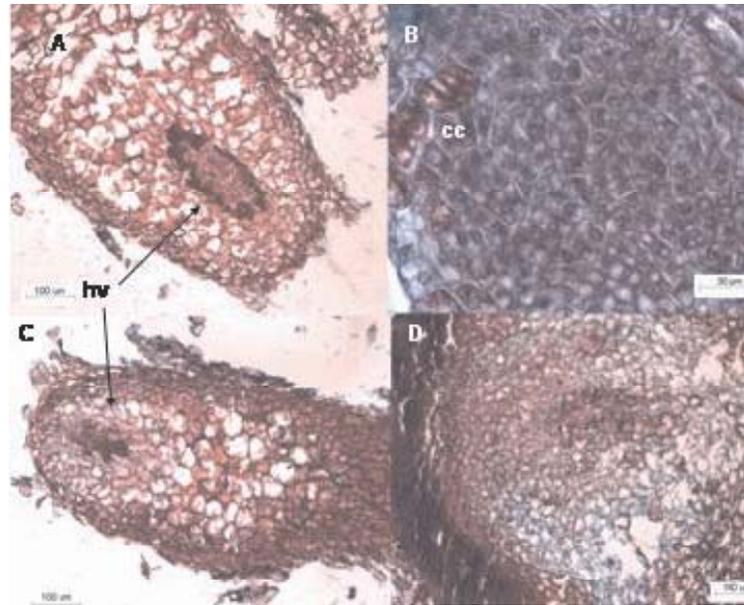


FIGURA 7. Corte anatómico de callos organogénicos. **A y C.** Callos de pétalos de SANTA CRUZ DE LA VEGA-6 y anteras de OCUMARE-61 donde se evidencia un arreglo celular de haces vasculares (hv). **B.** Inicio de un ápice vegetativo conformado por células en cadeneta (cc). **D.** Detalle de callo organogénico de anteras de OCUMARE-61.

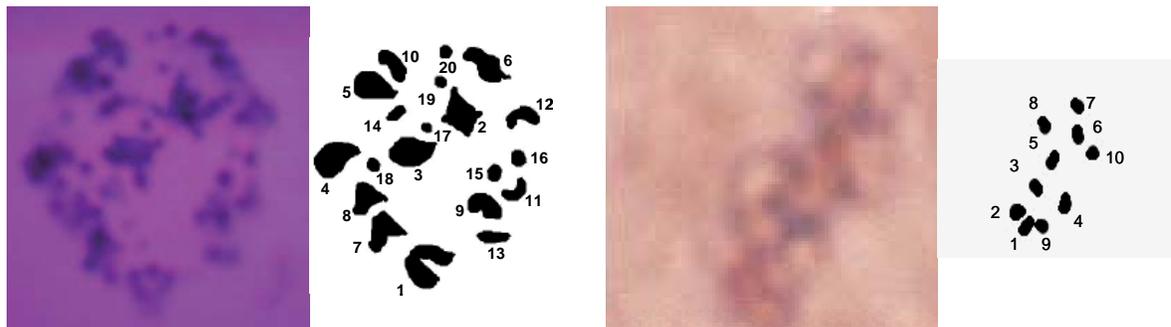


FIGURA 8. Vistas de cromosomas de tejidos radicales obtenidos *in vitro*. **A.** Diploide proveniente de pétalos de CHUAO-2; **B.** Haploide proveniente de anteras de OCUMARE-61 (1000X).

CONCLUSIONES

- En la inducción de callos se observó un efecto genotípico marcado asociado con el tipo de explante y FC utilizado. En los medios con sacarosa, se obtuvieron callos partiendo de anteras de OCUMARE-61 y CHORONÍ-42, pétalos de CHUAO-2 y SANTA CRUZ DE LA VEGA-6, mientras que en el medio con glucosa, se evidenció en anteras OCUMARE-77 y OCUMARE-61, pétalos de SANTA CRUZ-10. Además, no ocurrió la formación de callos en medio suplementado con fructosa.
- Los análisis anatómicos permitieron determinar la presencia de masas proembriogénicas en callos de pétalos del genotipo SANTA CRUZ-10 bajo glucosa, así como, el surgimiento de callos organogénicos de SANTA CRUZ DE LA VEGA-6, a partir de pétalos cultivados con sacarosa y de OCUMARE-61 y OCUMARE-77, basado en anteras cultivadas con sacarosa y glucosa, respectivamente.
- Se indujo la embriogénesis somática sólo en el genotipo trinitario SANTA CRUZ-10.

- Se observó organogénesis indirecta a partir de anteras del genotipo Ocumare-61 y de pétalos de Chuao-2 con sacarosa.
- Los análisis citogenéticos realizados en las raíces de Ocumare-61 provenientes de anteras demostraron que su carga genética fue haploide. No hubo variación de la carga genética en las raíces de Chuao-2 derivados de pétalos.

BIBLIOGRAFÍA

- Alemanno, L., M. Berthouly and N. Michaux-Ferriere. 1996. Histology of somatic embryogenesis from floral tissues in *Theobroma cacao* L. *Plant Cell Tiss. Org.* 46:187-194.
- Ascanio, C. 1999. Suspensiones celulares en café (*Coffea arabica* L. 'Catuaí') y su aplicación en la obtención de somaclones resistentes al filtrado tóxico de *Colletotrichum gloeosporioides*. Trabajo de ascenso. Maracay, Ven. Universidad Central de Venezuela. Facultad de Agronomía. 79 p.
- Ascanio, C. y A. Arcia. 1994. Efecto del estado de desarrollo de las anteras y de un 'shock' térmico sobre la androgénesis en *Coffea arabica* L. Var. Garnica. Maracay, Venezuela. *Café cacao Thé.* 38(2):75-80.
- Chanatásig, C. 2004. Inducción de embriogénesis somática en clones superiores de cacao (*Theobroma cacao* L.), con resistencia a enfermedades fungosas. Tesis Mag. Sc. CATIE. Costa Rica. 87 p.
- Driver, D. and A. Kuniyuki. 1984. *In vitro* propagation of Paradox Walnut Rootstock. *Hortscience* 19: 507-509.
- González, M., M. Hernández, L. Mazonra, N. Santana, Y. Rodríguez y M. Cabrera. 2005. Influencia de la época del año en la respuesta *in vitro* del cafeto *Coffea canephora* P. Var. Robusta. *Revista Colombiana de Biotecnología.* 7(1):5-14.
- Graziani, L. 2000. Calidad del cacao. **In:** Memorias del Primer Congreso Venezolano del Cacao y su Industria. Caracas, Venezuela. 198-199 pp.
- Lentini, Z., C. Martínez y W. Roca. 1997. Cultivo de anteras de arroz en el desarrollo de germoplasma. Centro Internacional de Agricultura Tropical CIAT. Cali, Colombia. 57 p.
- Litz, R. y R. Jarret. 1991. Regeneración de plantas en el cultivo de tejidos: embriogénesis somática y organogénesis. **In:** M. W. Roca y L. A. Mroginski. Cultivo de tejidos en la agricultura. CIAT. Cali, Colombia. 144-161 pp.
- López-Báez, O., J. Moreno y S. Pacheco. 2000. Avances en Propagación de cacao *Theobroma cacao* L. por embriogénesis somática en México (en línea). Disponible en: [http://www.koko.gov.my/CocoaBio-Tech/ING_Workshop\(163-177\).html](http://www.koko.gov.my/CocoaBio-Tech/ING_Workshop(163-177).html).
- Maximova, S., A. Young, S. Pishak, C. Miller, A. Traore and M. Guiltinan. 2005. Integrated system for propagation of *Theobroma cacao* L. **In:** Protocol for somatic embryogenesis in woody plants. S.M. Jain and P.K. Gupta, Eds. The Netherlands, Springer. 209-229 pp.
- Maximova, S., L. Alemanno, A. Young, N. Ferriere, A. Traore and M. Guiltinan. 2002. Efficiency, Genotypic variability and cellular origin of primary and secondary somatic embryogenesis of *Theobroma cacao* L., *in Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 38:252-259.
- Mena, S. 1991. Estudios del comportamiento de anteras de cacao (*Theobroma cacao* L.) en cultivo *in vitro*. Tesis Mag. Sc. CATIE. Costa Rica. 124 p.
- Michelangeli, C., P. Artioli y A. Medina. 2003. Anatomía y ultraestructura de la embriogénesis somática en Onoto (*Bixa orellana* L.). *Agro. Trop.* 53(1):33-48.
- Pinto, J. 1997. Calidad y certificación del cacao venezolano. **In:** I congreso venezolano del cacao y su industria. Caracas, Venezuela. 189-197 pp.
- Rondón, J.; Cumana, L. 2005. Revisión taxonómica del género *Theobroma* (Sterculiaceae) en Venezuela. *Acta Bot. Venez.* 28(1): 113-133.
- Santana, G., R. Velásquez y M. Chirinos. 2007. Efecto del tamaño del botón floral y 'shock' térmico sobre la androgénesis del cacao (*Theobroma cacao* L.). **In:** VI Encuentro latinoamericano y del Caribe de Biotecnología Agrícola REDBIO 2007. Viña del Mar, Chile. Poster 444.
- Teixeira, J., P. Santos e M. Oliveira. 2002. Otimização da metodologia de embriogênese somática visando a propagação clonal de genótipos elite de cacau (*Theobroma cacao* L.). Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnología. Brasília. Documento técnico nº 79. Brasil. 34 p.

- Traore, A. and M. Gultinan. 2006. Effects of carbon source and explant type on somatic embryogenesis of four cacao genotypes. *Hortscience*. 41:753-758.
- Trejo, G., U. Maldonado, A. Jiménez, M. Blanqueto, G. Salcedo, B. Martínez y A. Sánchez. 2002. Efecto del tiempo de exposición a baja temperatura y de reguladores de crecimiento en la regeneración de plantas a partir de anteras de arroz *Oryza sativa* L. (Cultivar Japónica H2005). México. *Agrociencia*. 36(4):441-449.
- Velásquez, R. 2005. Embriogénesis somática en diferentes clones de cacao (*Theobroma cacao* L.). Trabajo de ascenso. Maracay, Ven. Universidad Central de Venezuela. 49 p.
- Velásquez, R. Y. Sandra, C. Betancourt, J. Mata y F. García. 2006. Embriogénesis somática en cultivares de cacao (*Theobroma cacao* L.) venezolano. *Agronomía Trop*. 56(1):61-74.
- Whitlock, B. A., C. Bayer, D. A. Baum. 2001. Phylogenetic relationships and floral evolution of the Byttnerioideae ("Sterculiaceae" or Malvaceae s.l.) based on sequences of the chloroplast gene, *ndhF*. John V.; Freudenstein Editeur. *System. Bot.* 26(2):420-437.