



**UNIVERSIDAD NACIONAL  
TORIBIO RODRÍGUEZ DE MENDOZA DE  
AMAZONAS**

**FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGRARIAS  
ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA AGRÓNOMA**

**TESIS PARA OBTENER  
EL TÍTULO PROFESIONAL DE  
INGENIERO AGRÓNOMO**

**EFECTO DE THIDIAZURON (TDZ) SOBRE LA  
RESPUESTA EMBRIOGÉNICA Y GENÉTICA EN  
ESTAMINODIOS DE 10 GENOTIPOS DE CACAO  
(*Theobroma cacao L.*) NATIVO FINO DE AROMA**

**Autor: Bach. Karol Brighton Rubio Rojas**

**Asesores:**

**Mg. Santos Triunfo Leiva Espinoza**

**Ph.D. Juan Carlos Guerrero Abad**

**Registro:**

**CHACHAPOYAS - PERÚ**

**2020**



**UNIVERSIDAD NACIONAL  
TORIBIO RODRÍGUEZ DE MENDOZA DE  
AMAZONAS**

**FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGRARIAS  
ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA AGRÓNOMA**

**TESIS PARA OBTENER  
EL TÍTULO PROFESIONAL DE  
INGENIERO AGRÓNOMO**

**EFECTO DE THIDIAZURON (TDZ) SOBRE LA  
RESPUESTA EMBRIOGÉNICA Y GENÉTICA EN  
ESTAMINODIOS DE 10 GENOTIPOS DE CACAO  
(*Theobroma cacao L.*) NATIVO FINO DE AROMA**

**Autor: Bach. Karol Brighton Rubio Rojas**

**Asesores:**

**Mg. Santos Triunfo Leiva Espinoza**

**Ph.D. Juan Carlos Guerrero Abad**

**Registro:**

**CHACHAPOYAS - PERÚ**

**2020**

*A Luis A. Rubio, para que sirva como aliciente  
para el cumplimiento de tus metas de vida.*

*Karol B. Rubio Rojas*

## **AGRADECIMIENTOS**

Expreso mi más sincera gratitud a mis amados padres, gracias a ellos por haberme orientado a seguir la vida universitaria y haber sido motivo de inspiración durante esta etapa de mi existencia.

Agradezco sobremanera al Mg. Santos Leiva, por sus consejos y el tiempo dedicado al cumplimiento de los objetivos del presente trabajo, por su amistad y apoyo constante.

Al Ph.D. Juan Carlos Guerrero, por haberme encaminado en el tema y diseño del trabajo de tesis, y por compartir sus conocimientos y apoyo durante la ejecución del trabajo de tesis.

Al M.Sc. Segundo Manuel Oliva Cruz, por las gestiones para que el trabajo de campo y laboratorio fuera realizado de manera adecuada, gracias por todo.

A mis colegas del laboratorio de Fisiología y Biotecnología Vegetal, gracias por su apoyo y paciencia, y dispensen cualquier lío que se haya tenido durante mi trabajo. Gracias también a los miembros del jurado de tesis por el tiempo dedicado y por siempre estar prestos a resolver cualquier inquietud y apoyarme con las dificultades que se presentaron.

Gracias a Miriam Tafur por la paciencia, compañía y apoyo incondicional por todo esto y más gracias.

A familiares y amigos que son parte del día a día y siempre congratulan mis logros. Quiero expresar mi gratitud al Instituto de Investigación para el Desarrollo Sustentable de Ceja de Selva, que mediante el Círculo de Investigación en Cacao financió los suministros para este trabajo de investigación, y brindó los laboratorios para la instalación de los ensayos. Gracias.

**Karol B. Rubio**

**AUTORIDADES DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL TORIBIO  
RODRÍGUEZ DE MENDOZA DE AMAZONAS**

Dr. POLICARPIO CHAUCA VALQUI

**Rector**

Dr. MIGUEL ÁNGEL BARRENA GURBILLÓN

**Vicerrector académico**

Dra. FLOR TERESA GARCÍA HUAMÁN

**Vicerrectora de investigación**

Ing. M.Sc. ERICK ALDO AUQUIÑIVÍN SILVA

**Decano de la Facultad  
de Ingeniería y Ciencias Agrarias**

## VISTO BUENO DEL ASESOR

El docente de la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas, Mg. SANTOS TRIUNFO LEIVA ESPINOZA, profesor nombrado de la Escuela Profesional de Ingeniería Agrónoma que suscribe, hace constar que ha asesorado la tesis titulada: **“EFECTO DE THIDIAZURON (TDZ) SOBRE LA RESPUESTA EMBRIOGÉNICA Y GENÉTICA EN ESTAMINODIOS DE 10 GENOTIPOS DE CACAO (*Theobroma cacao* L.) NATIVO FINO DE AROMA”**; del tesista Bach. Karol Brighton Rubio Rojas, egresado de la carrera profesional de Ingeniería Agrónoma de la UNTRM.

El docente de la UNTRM que suscribe da su visto bueno para que la tesis mencionada sea presentada al jurado evaluador, manifestando su voluntad de apoyar al tesista en el levantamiento de observaciones y en el acto de sustentación de tesis.

Chachapoyas, 29 de julio de 2020.



Mg. SANTOS TRIUNFO LEIVA ESPINOZA.

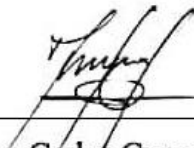
**Asesor**

## VISTO BUENO DEL ASESOR

El Ph.D. JUAN CARLOS GUERRERO ADAB, Director General de la Dirección de Recursos Genéticos y Biotecnología del Instituto Nacional de Innovación Agraria, hace constar que ha asesorado la tesis titulada: **“EFECTO DE THIDIAZURON (TDZ) SOBRE LA RESPUESTA EMBRIOGÉNICA Y GENÉTICA EN ESTAMINODIOS DE 10 GENOTIPOS DE CACAO (*Theobroma cacao* L.) NATIVO FINO DE AROMA”**; del tesista Bach. Karol Brighton Rubio Rojas, egresado de la carrera profesional de Ingeniería Agrónoma de la UNTRM.

El que suscribe da su visto bueno para que la tesis mencionada sea presentada al jurado evaluador, manifestando su voluntad de apoyar al tesista en el levantamiento de observaciones y en el acto de sustentación de tesis.

Lima, 29 de julio del 2020.

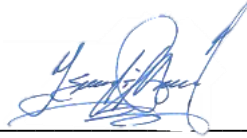


---

Ph.D. Juan Carlos Guerrero Abad

**Asesor**

## **JURADO EVALUADOR DE TESIS**



---

Ing. *Mg.Sc.* WALTER DANIEL SÁNCHEZ AGUILAR

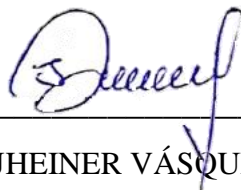
**PRESIDENTE**



---

LIGIA MAGALI GARCÍA ROSERO, *Ph.D.*

**SECRETARIO**



---

Ing. *Ms.* JHEINER VÁSQUEZ GARCÍA

**VOCAL**



# DECLARACIÓN JURADA DE NO PLAGIO



UNIVERSIDAD NACIONAL  
TORIBIO RODRÍGUEZ DE  
MENDOZA DE AMAZONAS

Secretaría General  
OFICINA DE GRADOS Y TÍTULOS

## ANEXO 3-K

### DECLARACIÓN JURADA DE NO PLAGIO DE TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL

Yo Karol Brighton Rubio Rojas  
identificado con DNI N° 72811610 Estudiante( )/Egresado (X) de la Escuela Profesional de  
Ingeniería Agrónoma de la Facultad de:  
Ingeniería y Ciencias Agrarias  
de la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas.

#### DECLARO BAJO JURAMENTO QUE:

1. Soy autor de la Tesis titulada: "Efecto de thidiazuron (TDZ) sobre la  
respuesta embriogénica y genética en estaminodios de  
10 genotipos de cacao (Theobroma cacao L.) nativo  
fino de aroma"  
que presento para  
obtener el Título Profesional de: Ingeniera Agrónoma

2. La Tesis no ha sido plagiada ni total ni parcialmente, y para su realización se han respetado las normas internacionales de citas y referencias para las fuentes consultadas.
3. La Tesis presentada no atenta contra derechos de terceros.
4. La Tesis presentada no ha sido publicada ni presentada anteriormente para obtener algún grado académico previo o título profesional.
5. La información presentada es real y no ha sido falsificada, ni duplicada, ni copiada.

Por lo expuesto, mediante la presente asumo toda responsabilidad que pudiera derivarse por la autoría, originalidad y veracidad del contenido de la Tesis para obtener el Título Profesional, así como por los derechos sobre la obra y/o invención presentada. Asimismo, por la presente me comprometo a asumir además todas las cargas pecuniarias que pudieran derivarse para la UNTRM en favor de terceros por motivo de acciones, reclamaciones o conflictos derivados del incumplimiento de lo declarado o las que encontraren causa en el contenido de la Tesis.

De identificarse fraude, piratería, plagio, falsificación o que la Tesis para obtener el Título Profesional haya sido publicado anteriormente; asumo las consecuencias y sanciones civiles y penales que de mi acción se deriven.

Chachapoyas, 29 de Julio de 2020

  
Firma del(a) testista

# ACTA DE EVALUACIÓN DE SUSTENTACIÓN DE TESIS



UNIVERSIDAD NACIONAL  
TORIBIO RODRÍGUEZ DE  
MENDOZA DE AMAZONAS

Secretaría General  
OFICINA DE GRADOS Y TÍTULOS

## ANEXO 3-N

### ACTA DE EVALUACIÓN DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL

En la ciudad de Chachapoyas, el día 04 de septiembre del año 2020, siendo las 18:00 horas, el aspirante Kunal Brighton Rubio Rojas defiende en sesión pública la Tesis titulada: "Efecto del thidiazuron (TDZ) sobre la respuesta embriogénica y genética en estaminodios de 10 genotipos de cacao (Theobroma cacao L.) nativo fino de aroma"

para obtener el Título Profesional de Ingeniero Agrónomo a ser otorgado por la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas, ante el Jurado Evaluador, constituido por:

Presidente : Ing. MSc. Walter Daniel Sánchez Aguilar  
Secretario : Ligia Magali García Rosero, PhD  
Vocal : Ing. Mg. Jheiner Vázquez García

Procedió el aspirante a hacer la exposición de la Introducción, Material y método, Resultados, Discusión y Conclusiones, haciendo especial mención de sus aportaciones originales. Terminada la defensa de la Tesis presentada, los miembros del Jurado Evaluador pasaron a exponer su opinión sobre la misma, formulando cuantas cuestiones y objeciones consideraron oportunas, las cuales fueron contestadas por el aspirante.

Tras la intervención de los miembros del Jurado Evaluador y las oportunas respuestas del aspirante, el Presidente abre un turno de intervenciones para los presentes en el acto, a fin de que formulen las cuestiones u objeciones que consideren pertinentes.

Seguidamente, a puerta cerrada, el Jurado Evaluador determinó la calificación global concedida la Tesis para obtener el Título Profesional, en términos de:

Aprobado (  )      Desaprobado (  )

Otorgada la calificación, el Secretario del Jurado Evaluador lee la presente Acta en sesión pública. A continuación se levanta la sesión.

Siendo las 19:10 horas del mismo día y fecha, el Jurado Evaluador concluye el acto de sustentación de la Tesis para obtener el Título Profesional.

  
SECRETARIO

  
VOCAL

  
PRESIDENTE

OBSERVACIONES: .....

# ÍNDICE DE CONTENIDO

	<b>Pág.</b>
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	iii
<b>AUTORIDADES DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL TORIBIO RODRÍGUEZ DE MENDOZA DE AMAZONAS</b> .....	iv
<b>VISTO BUENO DEL ASESOR</b> .....	v
<b>VISTO BUENO DEL ASESOR</b> .....	vi
<b>JURADO EVALUADOR DE TESIS</b> .....	vii
<b>DECLARACIÓN JURADA DE NO PLAGIO</b> .....	viii
<b>ACTA DE EVALUACIÓN DE SUSTENTACIÓN DE TESIS</b> .....	ix
<b>ÍNDICE DE CONTENIDO</b> .....	x
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	xii
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	xiii
<b>RESUMEN</b> .....	xvi
<b>ABSTRACT</b> .....	xvii
<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>II. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	5
<b>2.1. Lugar de ejecución</b> .....	5
<b>2.2. Material Vegetal</b> .....	5
<b>2.3. Población muestra y muestreo</b> .....	6

<b>2.4. Métodos .....</b>	<b>7</b>
<b>2.5. Análisis de los datos.....</b>	<b>12</b>
<b>III. RESULTADOS.....</b>	<b>15</b>
<b>3.1. Inducción de callo primario .....</b>	<b>15</b>
<b>3.2. Desarrollo de callo secundario .....</b>	<b>22</b>
<b>3.3. Expresión de la embriogénesis somática (ED) .....</b>	<b>27</b>
<b>3.4. Correlación de desarrollo del callo con la embriogénesis somática.....</b>	<b>34</b>
<b>IV. DISCUSIONES.....</b>	<b>35</b>
<b>V. CONCLUSIONES.....</b>	<b>44</b>
<b>VI. RECOMENDACIONES.....</b>	<b>45</b>
<b>VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>46</b>
<b>VIII. ANEXOS .....</b>	<b>51</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1:</b> Características de los clones estudiados.....	6
<b>Tabla 2:</b> Detalle de tratamientos establecidos en el estudio.....	12
<b>Tabla 3:</b> Resultados de frecuencia embriogénica y número de embriones a los largo de 70 días de cultivo en medio ED para los genotipos I52, I53, I64, I66 e I70. ....	33
<b>Tabla 4:</b> Análisis de varianza para el porcentaje de calogénesis en los periodos PCG y SCG. ....	51
<b>Tabla 5:</b> Análisis de varianza para el índice de callo durante todas las etapas de cultivo. ...	51
<b>Tabla 6:</b> Análisis de varianza para Índice de formación de callo en cada uno de los periodos de cultivo en medio ED.....	51
<b>Tabla 7:</b> Frecuencias de coloración de callos a los 14 días de cultivo (medio PCG).....	52
<b>Tabla 8:</b> Frecuencias de coloración de callos a los 28 días de cultivo (medio SCG).....	53
<b>Tabla 9:</b> Frecuencias de coloración de callos a los 42 días de cultivo (medio ED1). ....	54
<b>Tabla 10:</b> Frecuencias de coloración de callos a los 56 días de cultivo (medio ED2). ....	55
<b>Tabla 11:</b> Frecuencias de coloración de callos a los 70 días de cultivo (medio ED3). ....	56
<b>Tabla 12:</b> Frecuencias de coloración de callos a los 84 días de cultivo (medio ED4). ....	57
<b>Tabla 13:</b> Frecuencias de coloración de callos a los 98 días de cultivo (medio ED5). ....	58
<b>Tabla 14:</b> Frecuencia embriogénica en 5 genotipos de cacao durante el periodo de cultivo en medio de expresión de la embriogénesis.....	59

## ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1:** Mapa de ubicación del Laboratorio de Fisiología y Biotecnología Vegetal del Instituto de Investigación para el Desarrollo Sustentable de Ceja de Selva (INDES-CES) de la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas..... 5
- Figura 2:** Porcentaje de reactividad de estaminodios de 9 genotipos de cacao nativo a 14 días de cultivo (A: Por genotipo; B: Por concentración de TDZ y C: Interacción de factores). Letras diferentes indican diferencias entre las medias de los tratamientos (Scott Knott,  $p < 0.05$ ).... 16
- Figura 3:** Estados de desarrollo del callo en el medio de inducción de callo primario (PCG) ..... 17
- Figura 4:** Índice de callo de 10 genotipos de cacao nativo a 14 días de cultivo. (A: Por genotipo; B: Por concentración de TDZ y C: Interacción de factores) (Letras diferentes indican diferencias entre las medias de los tratamientos (Scott Knott,  $p < 0.05$ )). ..... 18
- Figura 5:** Superior: Gráfico de barras apiladas para la distribución de frecuencias relativas de los tratamientos para la posición de aparición del callo (Pearson Chi Cuadrado: 695.46\*\*\*) (Kruskall Wallis: 191.14\*\*\*). Inferior: Gráfico de barras apiladas para la distribución de frecuencias relativas de los genotipos para la posición de aparición del callo (Pearson Chi Cuadrado: 230.52\*\*\*) (Kruskall Wallis: 43.49\*\*\*). ..... 19
- Figura 6:** Posiciones de aparición del callo en estaminodios de cacao nativo. A: Callo en la base del estaminodio; B: Callo en la parte media del estaminodio; C: Callo en las partes distal del estaminodio; D: Callo en las partes basal y media del estaminodio; E: Callo en las partes basal y distal del estaminodio; y E: Callo en todo el estaminodio..... 20
- Figura 7:** Superior: Gráfico de barras apiladas para la distribución de frecuencias relativas de los tratamientos para la coloración del callo (Pearson Chi Cuadrado: 373.36\*\*\*) (Kruskall Wallis: 188.63\*\*\*) Inferior: Gráfico de barras apiladas de la distribución de frecuencias relativas de los genotipos para la coloración del callo (Pearson Chi Cuadrado: 235.03\*\*\*) (Kruskall Wallis: 140.35\*\*\*)..... 21

**Figura 8:** Coloraciones de callo primario. A: Explantes con callo cristalino fino en formaciones redondeadas (superior), y formaciones de callo cristalino grueso (inferior). B: Callo de coloración cremosa con formaciones granulosas. C: Callo de coloración oscura. .. 22

**Figura 9:** Porcentaje de reactividad de estaminodios de 10 genotipos de cacao nativo a 28 días de cultivo. (A: Por genotipo; B: Por concentración de TDZ y C: Interacción de factores). Letras diferentes indican diferencias entre las medias de los tratamientos (Scott Knott,  $p < 0.05$ ).... 23

**Figura 10:** Índice de callo de 10 genotipos de cacao nativo a 28 días de cultivo. Letras diferentes indican diferencias entre las medias de los tratamientos (Scott Knott,  $p < 0.05$ ).... 24

**Figura 11:** Tipos de callo secundario..... 25

**Figura 12:** Superior: Gráfico de barras apiladas para la distribución de frecuencias relativas de los tratamientos para la coloración del callo (Pearson Chi Cuadrado: 691.15\*\*\*)(Kruskall Wallis: 274.63\*\*\*). Inferior: Gráfico de barras apiladas de la distribución de frecuencias relativas de los genotipos para la coloración del callo (Pearson Chi Cuadrado: 316.57\*\*\*). (Kruskall Wallis: 82.86\*\*\*)..... 26

**Figura 13:** Índice de callo de 05 genotipos de cacao nativo durante la expresión de la embriogénesis somática. .... 27

**Figura 14:** Tipos de callo en diferentes estados de desarrollo. A: Callo desarrollándose sobre callo en proceso de necrosamiento. B, C, D: Callos con partes necrosadas y partes vivas con crecimiento activo. E y F: callos de coloración combinada con presencia de embriones somáticos. F: Callos completamente necrosados pero sin desarrollo de embriones. .... 28

**Figura 15:** Gráfico de barras apiladas para la distribución de frecuencias relativas de los tratamientos para la coloración del callo. ED1: Pearson Chi Cuadrado: 592.52\*\*\*;Kruskall Wallis: 262.62\*\*\*. ED3: Pearson Chi Cuadrado: 689.16\*\*\*;Kruskall Wallis: 321.04\*\*\*. ED5: Pearson Chi Cuadrado: 650.15\*\*\*;Kruskall Wallis: 223.51\*\*\* ..... 29

**Figura 16:** Gráfico de barras apiladas para la distribución de frecuencias relativas de los genotipos para la coloración del callo. ED1: Pearson Chi Cuadrado: 296.20\*\*\*;Kruskall Wallis: 101.09\*\*\*. ED3: Pearson Chi Cuadrado: 506.73\*\*\*;Kruskall Wallis: 267.33\*\*\*. ED5: Pearson Chi Cuadrado: 312.47\*\*\*;Kruskall Wallis: 86.07\*\*\* ..... 30

**Figura 17:** Frecuencia embriogénica de cinco genotipos de cacao nativo. De izquierda a derecha se observan las frecuencias embriogénicas por días de observación en medio de cultivo ED (ED-1: 14 días; ED-2: 28 días; ED-3: 42 días; ED-4: 56 días; y ED-5: 70 días). 31

**Figura 18:** Estados embriogénicos de la embriogénesis somática del cacao (A-H). Globular (g); Corazón (c); Torpedo (t); Cotiledonar (ct); (I) formación de raíces en callo no embriogénico..... 32

**Figura 19:** Diagramas de correlación entre el desarrollo del callo a los 28 días de cultivo y, A: frecuencia embriogénica de los tratamientos, B: promedio de embriones por explante y C: total de embriones producidos por tratamientos. D: Diagrama de correlación entre desarrollo del callo en ED5 (98 días de cultivo) y la frecuencia embriogénica de los tratamientos..... 34



## RESUMEN

La propagación masiva de genotipos superiores por cultivo de tejidos vegetales es una herramienta necesaria para la implementación y renovación de plantaciones con material genético de calidad. El objetivo del presente estudio fue medir el efecto del cambio en la concentración de tres dosis de Thidiazuron en el medio de cultivo sobre la respuesta embriogénica de 10 genotipos de cacao nativo fino de aroma de la Región Amazonas a partir de estaminodios florales. Los resultados mostraron que los genotipos evaluados tienen diferentes respuestas al proceso de inducción, se alcanzaron promedios de callogénesis de entre 20 y 100%. Sin embargo, el desarrollo de callos no garantiza la posterior embriogénesis, ya que sólo 5 genotipos en 8 tratamientos alcanzaron la formación de embriones somáticos primarios. El genotipo I52 es el que mejor respuesta tuvo al tratamiento aplicado, ya que hasta los 70 días de cultivo llegó a formar 276 embriones cuando la inducción se hizo en medio de cultivo con 20 nM de TDZ/L. Los genotipos que fueron embriogénicos obtuvieron frecuencias embriogénicas de entre 2-20%, con valores promedio por explante entre 1 y 22 embriones. El presente trabajo contribuye a la adaptación y establecimiento de metodologías y protocolos para la regeneración eficiente de embriones somáticos en genotipos superiores de cacao nativo de Amazonas.

**Palabras clave:** Callogénesis, embriones somáticos, genotipos superiores, reguladores de crecimiento.

## ABSTRACT

The mass propagation of superior genotypes by tissue culture is a necessary tool for the implementation and renewal of plantations with quality genetic material. The aim of this study was to study the regeneration potential of somatic embryos from 10 cocoa genotypes from the INDES collection in a modified DKW medium according to the Penn State University protocol. Using staminodes as explants, an experiment was set up to measure the effect of the change in the concentration of Thidiazuron in the culture medium. The results showed that the genotypes evaluated have different responses to the induction process, and average callogenesis of between 20 and 100% was achieved. However, callus development does not guarantee subsequent embryogenesis, since only 5 genotypes in 8 treatments reached the formation of primary somatic embryos. Genotype I52 is the one that had the best response to the applied treatment, since up to 70 days of culture it formed 276 embryos when the induction was done in culture medium with 20 nM TDZ. The genotypes that were embryogenic obtained frequencies between 2-20%, with average values of embryos per explant between 1 and 22. This work contributes to the adaptation and establishment of methodologies and protocols for the efficient regeneration of somatic embryos in superior genotypes of native cocoa from Amazonas.

**Key words:** Callogenesis, growth regulators, somatic embryos, superior genotypes

## I. INTRODUCCIÓN

Según la historia y la ecología, el cultivo de cacao es oriundo de la Selva Amazónica, posiblemente debido a que en esos lugares encontró condiciones ambientales intrínsecas y extrínsecas favorables para su crecimiento y desarrollo, los arqueólogos han registrado las primeras evidencias en consumidores hace unos cuatro mil años (UNODC/DEVIDA, 2014; Zarrillo et al., 2018). Actualmente, los cultivos de cacao en el Perú se ubican como el segundo cultivo permanente con mayor superficie agrícola, ocupando un total de 144,200 hectáreas de acuerdo al Censo Agropecuario (INEI, 2013) registrando el mayor crecimiento porcentual (95%) respecto a 1995 cuando existían 48,800 hectáreas.

Sin embargo, el cultivo del cacao se ha visto limitado por el bajo potencial de los materiales sembrados, la poca adaptación a las condiciones ambientales de las zonas cacaoteras y la alta incidencia de enfermedades fungosas, por lo que la producción mundial se ha caracterizado por períodos de contracción, seguidos de períodos de estabilización y luego de rápida expansión (Centro de Comercio Internacional, 2001). En ese contexto, se desarrollan a nivel mundial investigaciones que generan variedades mejoradas o conservan material genético de importancia para su uso en posteriores trabajos de manipulación genética, para mejorar calidad o resistencias; no obstante existe aún una gran deficiencia en el campo de la propagación de material genético del cacao, considerando que, los programas tradicionales de multiplicación se basan en la reproducción sexual, lo cual trae como consecuencia la segregación de los caracteres y por ende la pérdida de las características deseadas (Paredes et al., 2003). Una forma de mantener caracteres importantes tanto en variedades obtenidas por mejoramiento como de variedades elite encontradas en los centros de origen es mediante la reproducción asexual, sin embargo, existen muchas desventajas asociadas a la propagación de plantas de cacao vía acodo, injerto o estaca, donde se emplea una intensiva labor y elevados costos de operación, acompañados de una baja tasa de multiplicación (Li et al., 1998) y que a la actualidad poco han sido mejoradas. En consecuencia, se ha visto conveniente evaluar nuevos métodos de propagación, uno de ellas es mediante el empleo de la técnica de cultivo de tejidos vegetales o cultivo *in vitro*.

La obtención de embriones somáticos de cacao vía embriogénesis somática a partir de explantes florales (pétalos y estaminodios) ha prestado bastante atención en los últimos años, donde cada genotipo responde de forma diferencial (Chanatásig, 2004; Henao et al., 2018; Li et al., 1998; Maximova et al., 2002; Maximova et al., 2008; Solano, 2008; Urrea, et al. 2011).

Los primeros trabajos relacionados expresamente a la embriogénesis de cacao fueron realizados por Alemanno et al. (1996), ellos realizaron un trabajo titulado “*Histology of somatic embryogenesis from floral tissues cocoa*” en el cual comprobaron que los estaminodios de cacao generan embriones somáticos, obteniendo que las respuestas morfológicas e histológicas fueron diferentes para los genotipos embriogénicos o no embriogénicos. Para los genotipos embriogénicos, solo los estaminodios y los filamentos de estambres fueron capaces de producir embriones somáticos: después de algunos días en el medio de expresión, los grupos de células de callo pasaron por las etapas meristemáticas y luego embrionarias, y finalmente formaron embriones somáticos.

Posteriormente, Li et al., (1998) realizaron otro trabajo titulado “*Somatic Embryogenesis And Plant Regeneration From Floral Explants Of Cacao (Theobroma cacao L.) Using Thidiazuron*” en el cual desarrollaron un procedimiento para la regeneración de plantas de cacao (*Theobroma cacao*) a partir de explantes de estaminodio mediante embriogénesis somática adicionando diferentes concentraciones de thidiazuron en los medios de cultivo utilizados, es el primer trabajo donde se reporta el uso de TDZ para favorecer la embriogénesis somática en cacao. Los callos de crecimiento rápido se indujeron cultivando explantes de estaminodio en medio primario (PCG) basado en sales DKW suplementado con 20 g de glucosa por L, 2,4-D y thidiazuron (TDZ) a varias concentraciones. El procedimiento descrito en este trabajo definió el uso práctico de la embriogénesis somática para la propagación clonal de árboles de cacao elite y otras aplicaciones que requieren la producción de un gran número de plantas de materiales de fuente limitada.

Una vez comprobada la eficiencia de los explantes florales de cacao para la inducción de la embriogénesis somática investigadores como Tan y Furtek (2003) estudiaron la inducción de la embriogénesis somática de los tejidos en los botones florales del cacao

sin abrir con respecto a la edad fisiológica, tipo de explante floral, genotipo y composición del medio y fitohormonas, encontrando que estaminodios de dos a tres semanas de edad podrían ser el mejor explante para la embriogénesis. Además de mencionar que la concentración de azúcares afecta la embriogénesis somática.

Ese mismo año, Maximova et al. (2003) iniciaron los trabajos en el campo de la genética relacionada a la embriogénesis somática del cacao con un estudio, donde se describe un protocolo de transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens* empleándose explantes cotiledonales de embriones somáticos primarios.

Posteriormente, se siguieron realizando trabajos para la optimización de las variables que intervienen en la inducción de la embriogénesis somática en cacao, así, Maximova et al. (2005), publicaron un sistema integrado para la propagación de Cacao donde se describe paso a paso el procedimiento para la inducción de embriogénesis somática en cacao hasta obtener plantas aclimatadas y listas para su trasplante a campo definitivo.

Florez, et al. (2015) ”, estudiaron la expresión del gen homólogo en cacao BABY BOOM (*TcBBM*) presente en *Arabidopsis thaliana* (*AtBBM*) y validaron que *TcBBM* es un homólogo de *AtBBM* y tiene un papel específico en la embriogénesis somática (SE) y zigótica. Además, estos estudios revelaron que los niveles de transcripción de *TcBBM* podrían ser utilizados como un biomarcador para la embriogénesis en el tejido de cacao. Los resultados de la expresión transitoria de *TcBBM* proporcionan la confirmación de que los factores de transcripción pueden usarse para mejorar la SE sin comprometer el desarrollo de la planta y evitar la producción de plantas genéticamente modificadas (PGM).

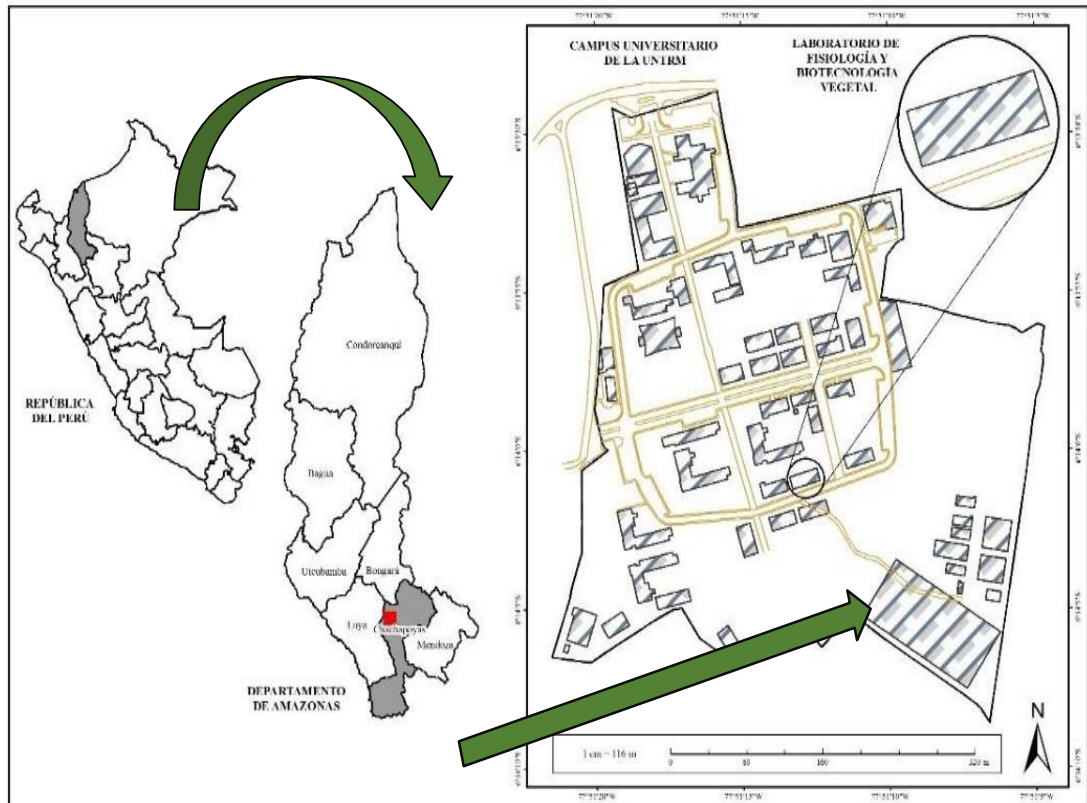
Los últimos estudios en relación a la reproducción de cacao vía embriogénesis somática son los de Urrea et al. (2011), donde estudiaron dos protocolos de propagación vía embriogénesis somática a partir de explantes florales en dos clones élite BIOB e ICS95 de *Theobroma cacao* L., obtuvieron un 50 y 32% de callo embriogénico en ICS95 y BIOB respectivamente con el protocolo de (Fontanel et al., 2002) modificado después de un periodo de cultivo de tres meses, así mismo Henao et al., (2018) establecieron protocolos para la propagación *in vitro* de diferentes genotipos de cacao colombianos utilizando diferentes medios de cultivo, explantes y tiempo de cultivo.

Por lo antes expuesto, en el presente trabajo de tesis se tuvo como objetivo determinar el efecto de Thidiazuron (TDZ) sobre la respuesta embriogénica de 10 genotipos de cacao nativo fino de aroma de la Región Amazonas a partir de estaminodios florales, esto permitió conocer la capacidad de respuesta de los clones de cacao superiores y su potencial de uso en técnicas de mejoramiento genético.

## II. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1. Lugar de ejecución

La investigación fue realizada en el área de cultivo de tejidos vegetales del Laboratorio de Fisiología y Biotecnología Vegetal del Instituto de Investigación para el Desarrollo Sustentable de Ceja de Selva (INDES-CES) de la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas.



**Figura 1:** Mapa de ubicación del Laboratorio de Fisiología y Biotecnología Vegetal del Instituto de Investigación para el Desarrollo Sustentable de Ceja de Selva (INDES-CES) de la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas.

### 2.2. Material Vegetal

Para este estudio se utilizaron botones florales de cacao de 10 genotipos de la colección INDES-CES. La ubicación y algunas características de estos árboles se presentan en la tabla 1.

**Tabla 1:** Características de los clones estudiados

<b>Código de Genotipo</b>	<b>UTM</b>	<b>Sector</b>	<b>Altitud (m.s.n.m.)</b>	<b>Color del fruto Inmaduro</b>
<b>I06</b>	9369168 17M 787894	El Chalán	754	Verde
<b>I11</b>	9369112 17M 787792	El Chalán	736	Verde
<b>I14</b>	9366961 17M 793728	El Limoncito	817	Verde
<b>I32</b>	9367833 17M 779564	Quebrada Seca	421	Verde
<b>I52</b>	9366649 17M 794441	Diamante Bajo	725	Verde
<b>I53</b>	9366665 17M 794453	Diamante Bajo	757	Verde
<b>I63</b>	9365734 17M 793806	Naranjos Alto	727	Verde
<b>I64</b>	9364133 17M 792251	Naranjos Alto	665	Rojo
<b>I66</b>	9364181 17M 792346	Naranjos Alto	667	Verde
<b>I70</b>	9371938 17M 787756	Lluhuana	970	Verde

### **2.3. Población muestra y muestreo**

Fueron dispuestos 30 tratamientos, con 3 repeticiones (25 estaminodios por repetición) cada uno; lo que generó un total de 2250 explantes en observación, Para efectos del estudio se evaluaron todos los explantes instalados.



## **2.4. Métodos**

### **2.4.1. Recolección de material vegetal**

Para la recolección de material vegetal se siguieron los pasos descritos a continuación:

- Se ubicaron los árboles identificados como élites y seleccionados para el ensayo.
- Una vez identificados y codificados los árboles se procedió a obtener los capullos florales con ayuda de un bisturí. La colecta se hizo durante las primeras horas de la mañana.
- Los botones colectados se colocaron en frascos plásticos con mezcla DKW de sales (macronutrientes y micronutrientes) fría para mantener la humedad del tejido obtenido.
- A cada frasco se le identificó con el código del árbol del que se hizo la colecta, las muestras se transportaron al laboratorio con la mayor premura posible para su procesamiento y uso en los ensayos propuestos.
- Para su transporte, los frascos con flores se colocaron en posición horizontal en una bolsa de plástico. Se acondicionó un recipiente aislado, colocando una bolsa de hielo picado en el fondo y cubriéndolo con algunas capas de papel toalla. Se colocó la bolsa con los frascos conteniendo los botones en la parte superior del papel toalla y se cubrió con más papel toalla en los lados y en la parte superior. Se colocaron más bolsas con hielo picado en los lados y la parte superior de las flores, manteniéndolas separadas del hielo con papel toalla.
- En el laboratorio las flores se mantuvieron a 8°C en un refrigerador. Las flores fueron procesadas al día siguiente de la colecta.

### **2.4.2. Preparación de Soluciones stock**

El medio de cultivo a utilizado en el estudio fue el de sales minerales DKW, enriquecido con: Glutamina 250 mg/L; Myo-inositol 200 mg/L; Tiamina-HCL 2 mg/L; Ácido nicotínico 1 mg/L; Glicina 2 mg/L; Glucosa 20 g/L; 2,4 D 9  $\mu$ M/L y Thidiazuron en diferentes concentraciones.

El medio de cultivo fue preparado diluyendo las siguientes soluciones stock:

**a) DKW 10X solución de macroelementos A y B:**

- **Solución Stock A:** Para un litro

Nitrato de calcio tetra hidratado: 19.69 g.

Nitrato de amonio: 14.16 g.

- **Solución Stock B:** Para un litro

Cloruro de calcio dihidratado: 1.49 g (agregar primero)

Sulfato de potasio: 15.59 g.

Sulfato de magnesio heptahidratado: 7.4 g.

Fosfato de potasio monobásico: 2.65 g

**b) DKW 100X Solución de microelementos**

Para un litro:

Nitrato de Zinc Hexahidratado: 1.7 g.

Sulfato de manganeso monohidratado: 3.34 g.

Sulfato de cobre pentahidratado: 0.025g.

Ácido bórico: 0.48 g.

Molibdato de sodio dihidratado: 0.039 g.

Sulfato de hierro heptahidratado: 3.38 g.

EDTA sal de disodio: 4.540 g

**c) DKW 1000X solución de vitaminas:**

Para un litro:

Mio-inositol: 10 g.

Tiamina-HCL: 0.2 g.

Ácido Nicotínico: 0.1 g.

Glicina: 0.2 g.

**d) B5 DKW 1000X solución de vitaminas:**

Para un litro:

Mio-inositol: 5.0 g.

Tiamina-HCL: 500 mg.

Ácido Nicotínico: 50 mg.

Pyridoxina: 50 mg.

**2.4.3. Preparación de medios de cultivo**

Teniendo estas soluciones stock los medios de cultivo fueron preparados como a continuación se detalla:

**a) Medio de desarrollo de callo primario(PCG):**

Por un litro:

DKW macro nutrientes A: 100 ml.

DKW macro nutrientes B: 100 ml.

DKW micro nutrientes 100X: 10 ml.

DKW vitaminas 1000X: 1 ml.

Glucosa: 20 g.

Myo-Inositol: 100 mg.

Glutamina: 250 mg.

2,4-D (stock 1mg/ ml): 2 ml.

TDZ: diferentes concentraciones según tratamientos.

Se ajustó el pH a 5,8 +- (0.5), se agregaron 2g de Phytigel y se autoclavó por 18 minutos.

**b) Medio de desarrollo de callo secundario (SCG):**

Por un litro:

Sales McCown's: 2,3 g.

B5 (Stock de Vitaminas): 1 ml.

Glucosa: 20 g.

2, 4-D (Stock 1 mg/ ml): 2 ml

6-BA (1 mg/ml): 50 ul

El pH se reguló a 5,7 se agregaron 2,2 g de phytigel y se autoclavó por 18 minutos.

**c) Medio de desarrollo embrionario (ED):**

Para un litro:

DKW macro nutrientes A: 100 ml.

DKW macro nutrientes B: 100 ml.

DKW micro nutrientes 100X: 10 ml.

DKW vitaminas 1000X: 1 ml.

Sacarosa: 30 g.

Glucosa: 1 g.

El pH se reguló a 5,7 se agregaron 2,2 g de phytigel y se autoclavó por 18 minutos.

**2.4.4. Ensayo de inducción de embriogénesis somática en estaminodios de cacao**

Según la metodología descrita por Maximova et al. (2005) se implementó el siguiente procedimiento.

**a) Desinfección de explantes**

La esterilización superficial de los botones florales se hizo con una solución de hipoclorito de calcio al 1% (p/v) usando agua ultra pura en un recipiente estéril de vidrio. Los siguientes pasos de este protocolo se realizarán dentro de cámara de flujo laminar.

- Se eliminó el agua fría del recipiente de recolección y se transferirá todos los botones florales en un recipiente nuevo (tubo de centrifuga de 50 ml.) con solución de hipoclorito de calcio. Los botones florales se mantuvieron en inmersión en la solución por espacio de 20 minutos. Para asegurar el contacto de los botones florales con la solución de esterilización se invirtieron suavemente los tubos varias veces.

- Después de 20 minutos, se retiró completamente la solución de esterilización y se realizaron tres lavados con de agua autoclavada y a temperatura ambiente para enjuagar los botones florales, para asegurar un enjuague adecuado se invirtieron los tubos varias veces y se eliminó completamente el agua en cada enjuague.
- Con fórceps estériles, se transfirieron los botones florales a una placa de Petri estéril para mantener la humedad hasta su disección.

#### **b) Disección de explantes**

- Para la disección los botones florales estériles se transfirieron a una placa de Petri estéril cuidando de no transferir exceso de humedad. En este nuevo contenedor, con una hoja de bisturí estéril, se cortaron los botones florales en una posición de 1/3 de la longitud de la flor desde la base.
- Se extrajeron los estaminodios y se desecharon las otras partes de la flor.

#### **c) Inducción de callo**

- Los estaminodios se distribuyeron uniformemente en toda la superficie del medio PCG (25 explantes por placa), asegurando un buen contacto de los explantes con el medio sin llegar a sumergirlos.
- Posteriormente se sellaron las placas de Petri con parafilm y se incubaron los cultivos en condiciones de oscuridad a 25-30°C durante 14 días.
- Luego de 14 días se transferirán los explantes a una placa de Petri que contiene 25-30 ml de medio SCG (Maximova et al., 2002).Se volvieron a sellar las placas y se mantuvieron en oscuridad por otros 14 días. Del mismo modo debe asegurarse el contacto de los explantes sin sumergirlos.

#### d) Inducción de embriogénesis

- Después de las primeras 4 semanas, se transfirieron todos los explantes callogénicos a placas de Petri conteniendo 30 ml de medio ED (Li et al., 1998) y se incubaron en la oscuridad durante 14 días.
- Se subcultivaron los explantes en medio ED nuevo cada 14 días, manteniéndolos siempre en la oscuridad.

#### 2.5. Análisis de los datos

La investigación se estableció un Diseño Completamente Aleatorizado (DCA) con arreglo factorial 10 x 3. Donde el factor A estuvo representado por las diferentes variedades de cacao en estudio y el factor B por las diferentes concentraciones de Thidiazuron utilizadas en el ensayo. Cada tratamiento tuvo 3 repeticiones, cada repetición se considera como unidad experimental y está representada por la caja Petri donde se realizan los cultivos, conteniendo 25 estaminodios de 5 flores por placa. Cada estaminodio se constituye como una unidad de observación.

**Tabla 2:** Detalle de tratamientos establecidos en el estudio.

		Factor B: Concentraciones de TDZ		
		[0nM] TDZ	[10nM] TDZ	[20nM] TDZ
Factor A: Genotipos de cacao	INDES 06	Y <sub>1,1</sub>	Y <sub>1,2</sub>	Y <sub>1,3</sub>
	INDES 11	Y <sub>2,1</sub>	Y <sub>2,2</sub>	Y <sub>2,3</sub>
	INDES 14	Y <sub>3,1</sub>	Y <sub>3,2</sub>	Y <sub>3,3</sub>
	INDES 32	Y <sub>4,1</sub>	Y <sub>4,2</sub>	Y <sub>4,3</sub>
	INDES 52	Y <sub>5,1</sub>	Y <sub>5,2</sub>	Y <sub>5,3</sub>
	INDES 53	Y <sub>6,1</sub>	Y <sub>6,2</sub>	Y <sub>6,3</sub>
	INDES 63	Y <sub>7,1</sub>	Y <sub>7,2</sub>	Y <sub>7,3</sub>
	INDES 64	Y <sub>8,1</sub>	Y <sub>8,2</sub>	Y <sub>8,3</sub>
	INDES 66	Y <sub>9,1</sub>	Y <sub>9,2</sub>	Y <sub>9,3</sub>
	INDES 70	Y <sub>10,1</sub>	Y <sub>10,2</sub>	Y <sub>10,3</sub>

### 2.5.1. Variables respuesta

Para evaluar la respuesta de cada uno de los genotipos a los diferentes tratamientos establecidos en el estudio se utilizaron variables respuesta referidas a la capacidad de formación de callo fueron la frecuencia de callogénesis y el índice de formación de callo.

La frecuencia de callogénesis se estableció con la siguiente fórmula:

$$\text{Frecuencia de callogénesis} = \frac{\# \text{ de explantes con formación de callo}}{\# \text{ total de explantes}} \times 100$$

El índice de formación de callo está dado por la siguiente fórmula:

$$IC = \sum (\text{Estado} \times \text{número de explantes en ese estado})$$

Los estados son el resultado de la observación de los explantes durante el estudio. Se tomaron 8 estados de explante, propuestos por Chanaatásig (2004), modificado para este estudio estos van de 0 a 7. Los primeros 4 estados se observaron en los primeros 14 días de cultivo: 0= crecimiento nulo; 1= inicio de formación de callo; 2= es callo cubre hasta 50% del explante; 3=el explante cubre más del 50% del explante. Los estados de explante de 4 a 7 se utilizaron en las observaciones posteriores y se establecieron los siguientes parámetros: 4= callo <2mm; 5= callo entre 2-4mm; 6= callo entre 4-6mm y 7= callo >6mm. En ese sentido en cada unidad experimental en los primeros 14 días de cultivo el IC tiene valores de entre 0-75, donde el 0 indica crecimiento nulo y 75 indica el máximo desarrollo en esta etapa. El valor de 75 se puede alcanzar en caso de que todos los explantes instalados alcancen el estado tres de desarrollo. Para los subcultivos posteriores el IC tiene valores de entre 4-175 por cada repetición donde 4 es el mínimo desarrollo y 100 el desarrollo máximo con todos los explantes alcanzando el estado 7 de desarrollo de callo.

Además, como variable respuesta más relevante para el trabajo se tuvo la evaluación de la aptitud de los genotipos en estudio para la embriogénesis

somática. En ese sentido, se establecieron la frecuencia de aparición de embriogénesis y el número promedio de embriones somáticos por explante embriogénico.

La frecuencia de embriogénesis se estableció con la siguiente fórmula:

$$\text{Frecuencia de embriogénesis} = \frac{\text{\# de explantes con formación de embrión}}{\text{\#total de explantes callogénicos}} \times 100$$

Adicionalmente, se observaron características de los callos obtenidos como el cambio de coloración y la posición de aparición de callo en el estaminodio. Finalmente fue realizado el conteo del número de embriones por explante embriogénico con el objetivo de correlacionar la capacidad embriogénica con el desarrollo de callos que se alcanzan en cada genotipo.



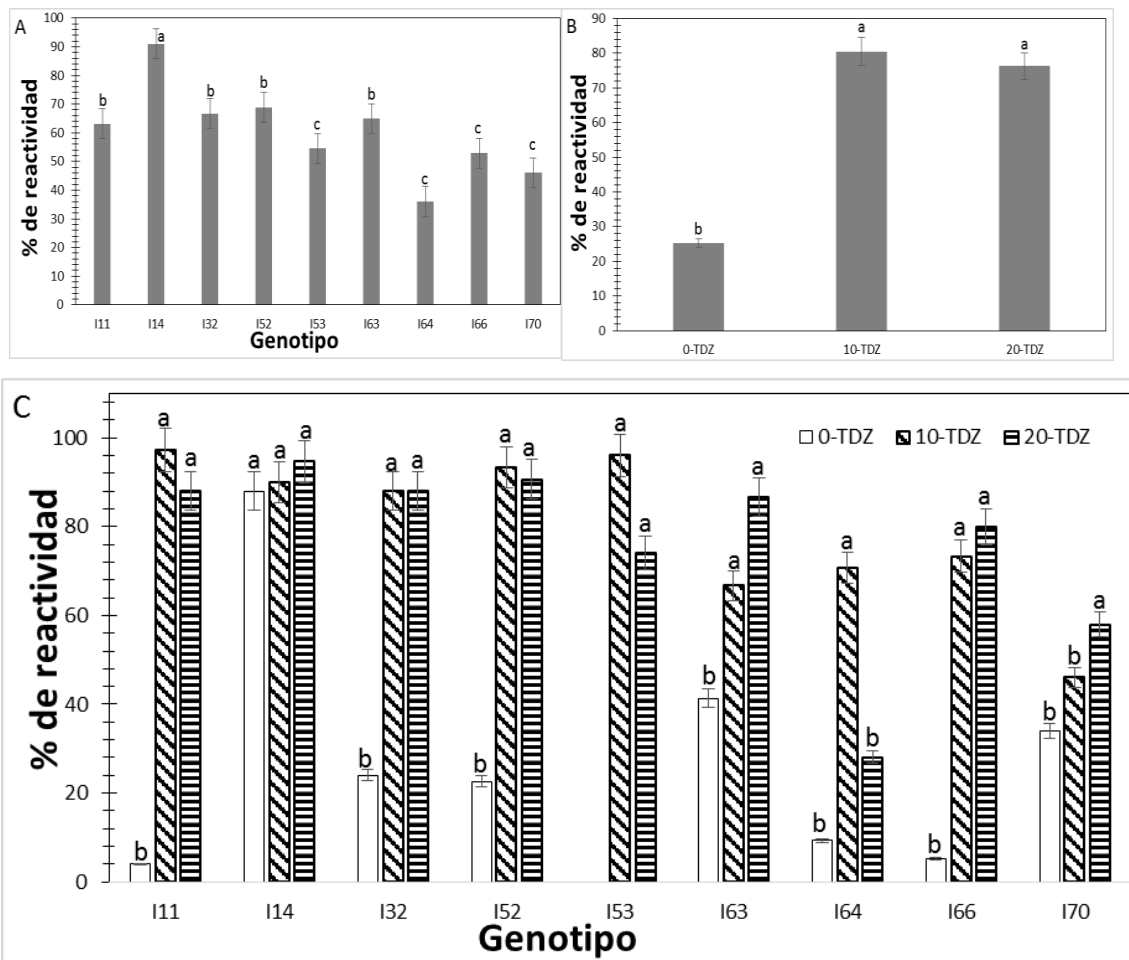
### III. RESULTADOS

#### 3.1. Inducción de callo primario

##### 3.1.1. Reactividad de explantes

El análisis independiente de factores indicó que cada factor tuvo (genotipo y TDZ) efecto significativo sobre la respuesta de los estaminodios a la callogénesis durante la inducción de callo primario ( $p < 0.05$ ) (Figura 2 A, B), la interacción de estos factores también tuvo un efecto significativo sobre esta variable respuesta.

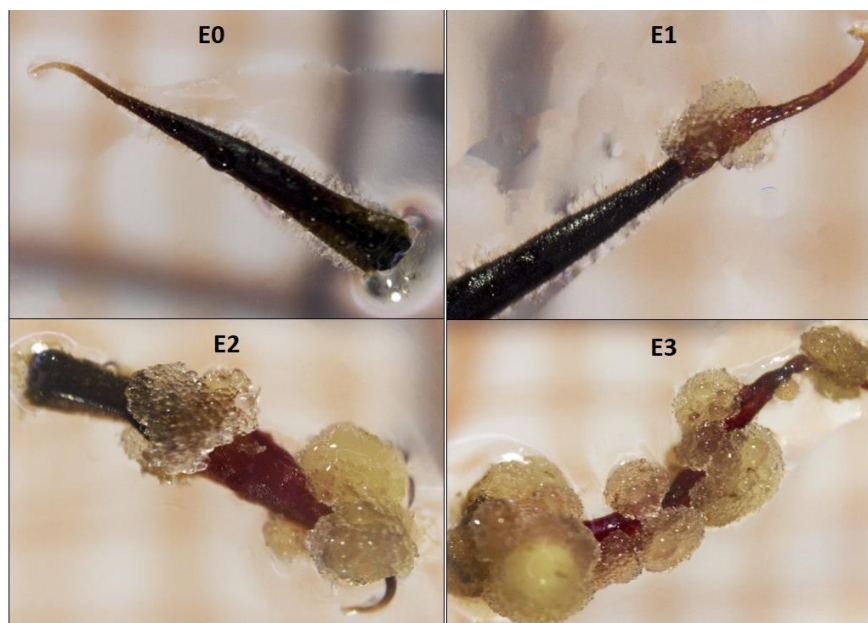
Durante los primeros 14 días de cultivo en medio PCG los explantes tuvieron diferentes respuestas al tratamiento aplicado, muchos iniciaron el desarrollo del callo y muchos otros solo se volvieron turgentes para dar lugar a la formación de callo en la siguiente etapa. La figura 2(C) muestra el porcentaje de reactividad, es decir el porcentaje de explantes que logró formar callo en las primeras semanas de cultivo; nueve de los diez genotipos en observación formaron callos, una observación diferente para el genotipo I06 que no alcanzó a formar callo bajo ninguno de los tratamientos estudiados. El porcentaje promedio de reactividad de los explantes estuvo comprendido en un rango muy amplio desde 4% (I11 sin TDZ) hasta 94.6% (I14 con 20nM de TDZ/L). Cuando se evalúa la respuesta de cada genotipo según la concentración de TDZ aplicada al medio de cultivo, en la mayoría de los casos se observa que los tratamientos sin TDZ obtienen menor porcentaje de explantes callogénicos, sin embargo esto no se cumple para todos los genotipos examinados, este es el caso del genotipo I14 donde el tratamiento sin TDZ alcanzó porcentaje de explantes callogénicos de 88% siendo este valor estadísticamente similar al tratamiento con 10nM y 20nM de TDZ/L, que alcanzaron porcentajes promedio de 90% y 94.6% respectivamente. Cabe notar que el genotipo I06 no logró formar callos en ningún explante durante los primeros 14 días de cultivo (Figura 2C).



**Figura 2:** Porcentaje de reactividad de estaminodios de 9 genotipos de cacao nativo a 14 días de cultivo (A: Por genotipo; B: Por concentración de TDZ y C: Interacción de factores). Letras diferentes indican diferencias entre las medias de los tratamientos (Scott Knott,  $p < 0.05$ ).

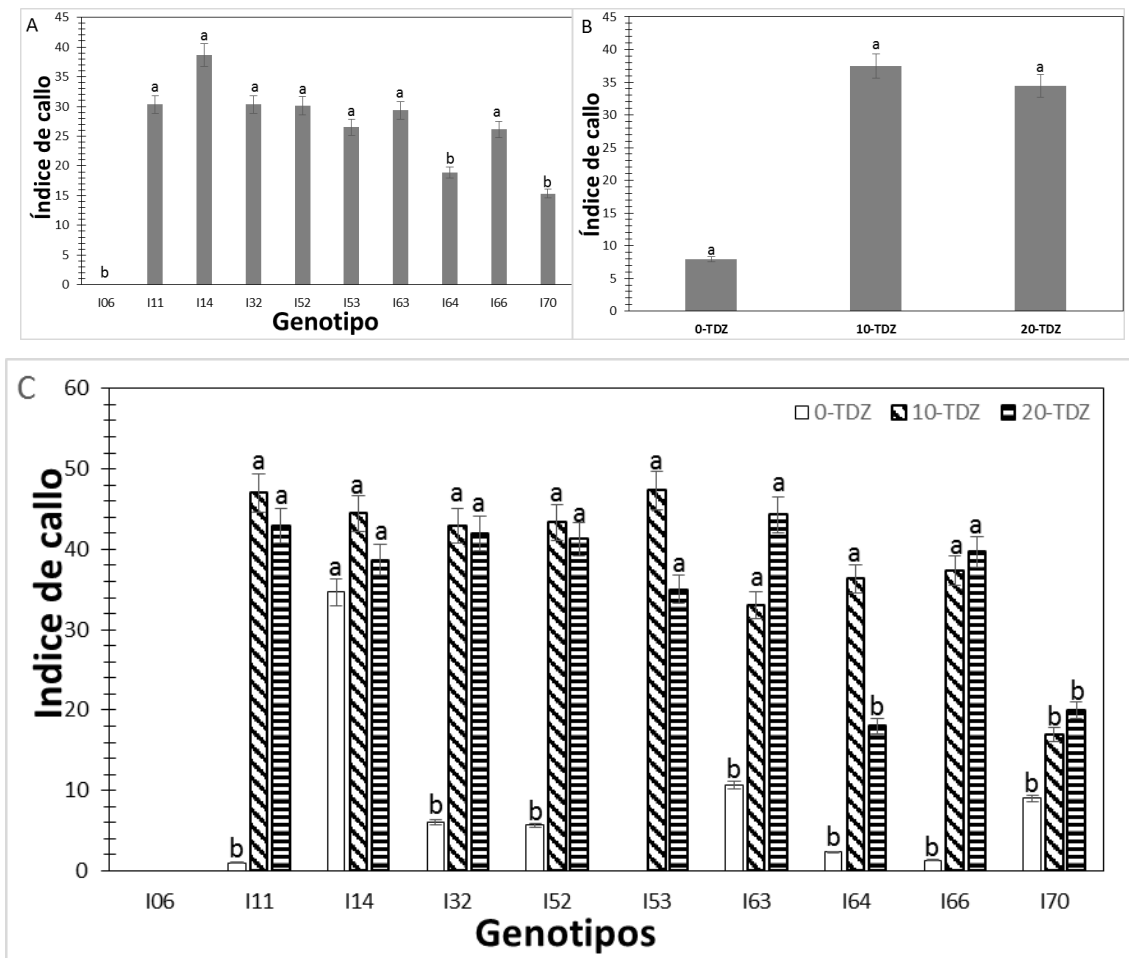
### 3.1.2. Índice de desarrollo de callo (IC) en inducción de callo primario

El IC nos permite analizar la intensidad del desarrollo del callo en los tratamientos evaluados, se observaron diferentes estados de desarrollo del callo (Figura 3), con estas observaciones se obtuvieron los IC para cada tratamiento. Se reporten diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en el efecto de los factores genotipo y concentración de TDZ y en la interacción de estos factores.



**Figura 3:** Estados de desarrollo del callo en el medio de inducción de callo primario (PCG)

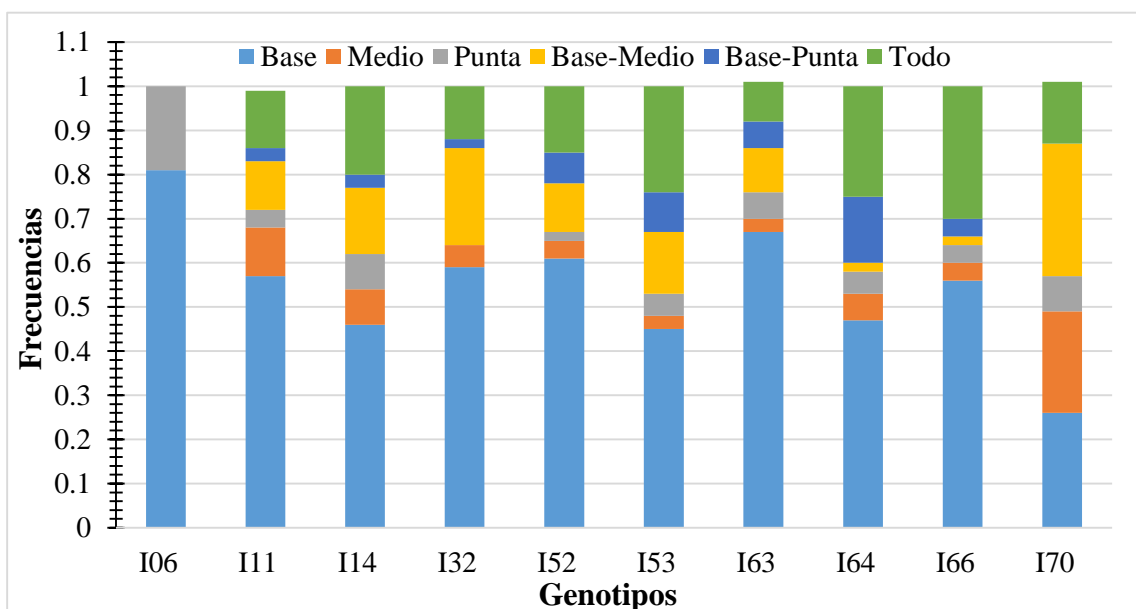
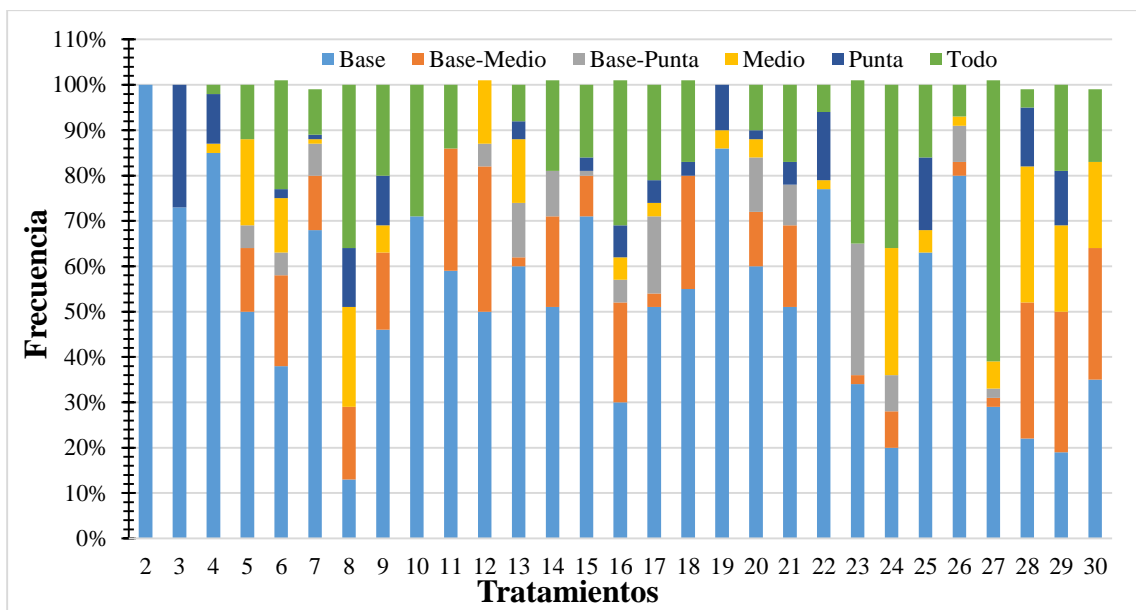
En la figura 4 se muestran los IC promedio para cada genotipo según la concentración de TDZ utilizada. Los IC se distribuyeron en un amplio rango, en esta etapa el IC promedio más bajo se obtuvo en los explantes del genotipo I11 en medio sin TDZ (IC=1), mientras que el IC promedio más alto se obtuvo con los explantes del genotipo I53 en medio de cultivo con 10nM de TDZ/L. En todos los casos se observa un desarrollo de callo mínimo en los tratamientos sin TDZ, en los genotipos I11, I14, I32, I52, I53 e I63, se observan IC promedio numéricamente superiores en los tratamientos con 10nM de TDZ/L en el medio de cultivo, aunque estadísticamente son similares a los IC promedio obtenidos en los tratamientos con 20nM de TDZ/L (Figura), a excepción del genotipo I64 en el que estos dos tratamientos si fueron estadísticamente diferentes (Scott Knott,  $p < 0.05$ ).



**Figura 4:** Índice de callo de 10 genotipos de cacao nativo a 14 días de cultivo. (A: Por genotipo; B: Por concentración de TDZ y C: Interacción de factores) (Letras diferentes indican diferencias entre las medias de los tratamientos (Scott Knott,  $p < 0.05$ )).

### 3.1.3. Posición de aparición del callo

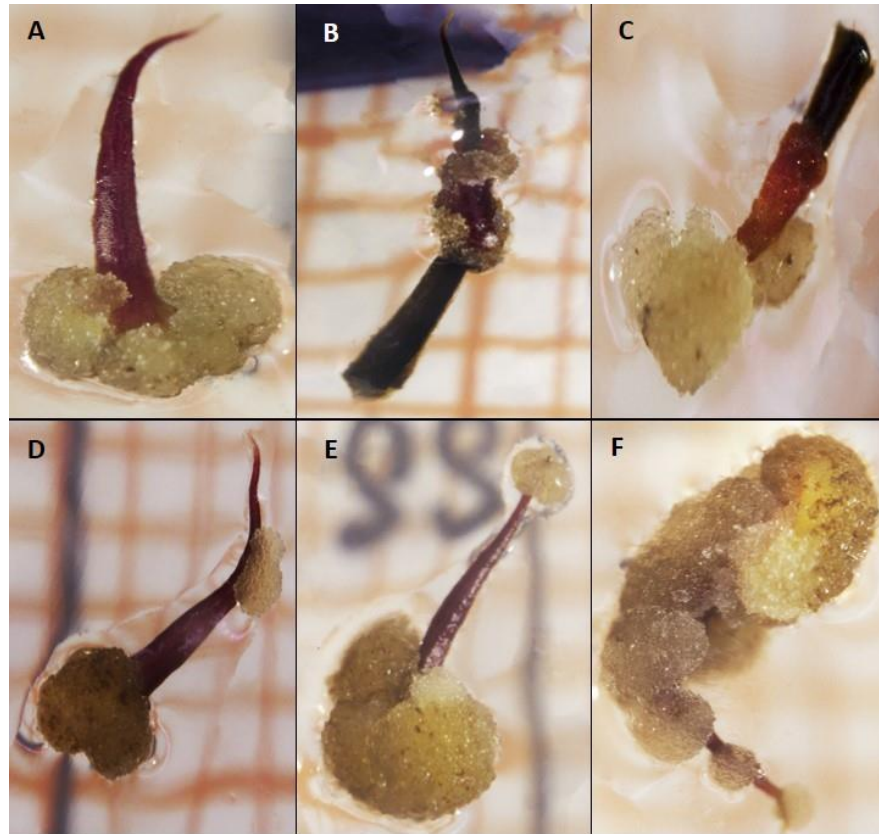
La posición de aparición del callo en medio de inducción (PCG) se presenta en la figura 5 como las frecuencias obtenidas por los tratamientos y los genotipos, así como los resultados del test de independencia y del ANOVA no paramétrico de Kruskal-Wallis. Se observa una fuerte relación entre los tratamientos y los genotipos con los patrones de aparición del callo, por lo tanto se identifican también diferencias significativas entre los tratamientos y los genotipos para las frecuencias observadas de posición de aparición del callo.



**Figura 5:** Superior: Gráfico de barras apiladas para la distribución de frecuencias relativas de los tratamientos para la posición de aparición del callo (Pearson Chi Cuadrado: 695.46\*\*\*) (Kruskall Wallis: 191.14\*\*\*). Inferior: Gráfico de barras apiladas para la distribución de frecuencias relativas de los genotipos para la posición de aparición del callo (Pearson Chi Cuadrado: 230.52\*\*\*) (Kruskall Wallis: 43.49\*\*\*)

Se observaron diferentes posiciones de aparición del callo (figura 6), la posición en la que aparece el estaminodio no es exclusiva para un genotipo o tratamiento, sin embargo existen patrones que sugieren una relación entre el genotipo y la zona del explante donde aparece el callo. Por lo general, el callo

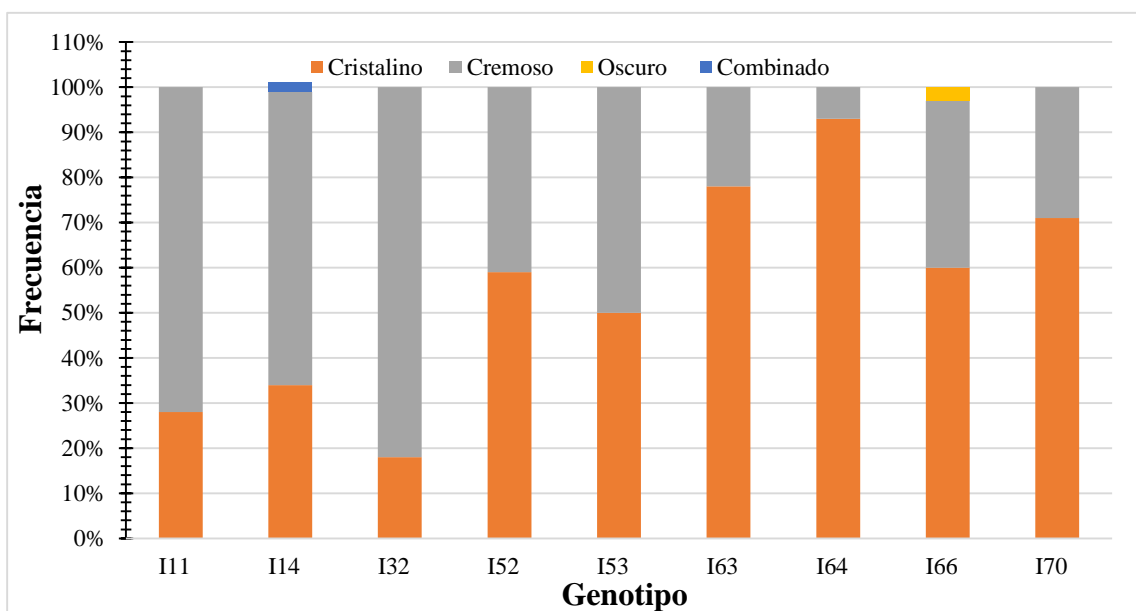
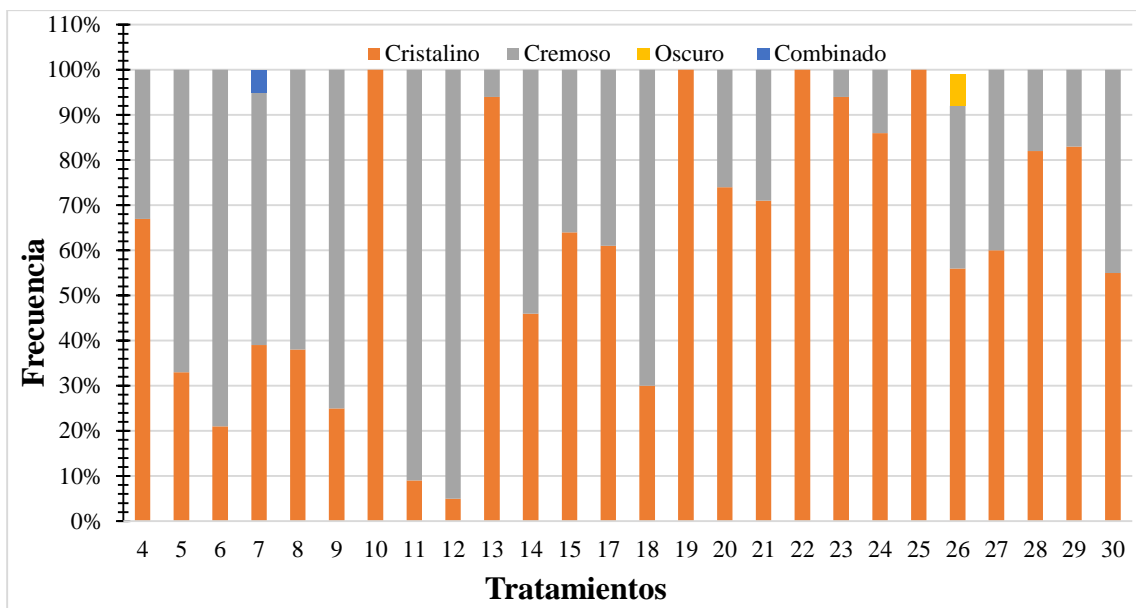
aparecerá en la zona basal del estaminodio, justo donde se realizó el corte, con menos frecuencia el callo apareció en la zona media del estaminodio, así mismo en los genotipos I64 e I66 se observó con mayor frecuencia la aparición de callo a lo largo del estaminodio cubriéndolo completamente.



**Figura 6:** Posiciones de aparición del callo en estaminodios de cacao nativo. A: Callo en la base del estaminodio; B: Callo en la parte media del estaminodio; C: Callo en las partes distal del estaminodio; D: Callo en las partes basal y media del estaminodio; E: Callo en las partes basal y distal del estaminodio; y E: Callo en todo el estaminodio.

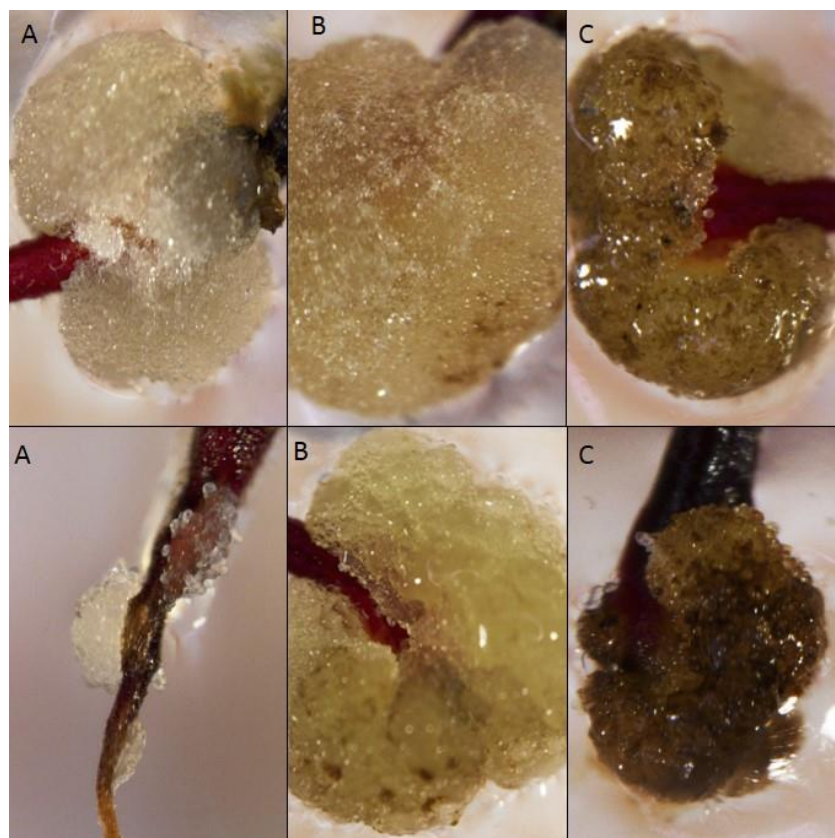
#### 3.1.4. Coloración del callo

Existe una fuerte relación entre los tratamientos y la característica de coloración del callo, por lo tanto se observan diferencias significativas entre tratamientos para las frecuencias observadas de color de callos a los primeros 14 días de cultivo (Figura 7). Esta relación también se observa cuando analizamos las frecuencias de coloración para los genotipos que presentaron callogénesis en esta etapa.



**Figura 7:** Superior: Gráfico de barras apiladas para la distribución de frecuencias relativas de los tratamientos para la coloración del callo (Pearson Chi Cuadrado: 373.36\*\*\*) (Kruskall Wallis: 188.63\*\*\*). Inferior: Gráfico de barras apiladas de la distribución de frecuencias relativas de los genotipos para la coloración del callo (Pearson Chi Cuadrado: 235.03\*\*\*). (Kruskall Wallis: 140.35\*\*\*).

En esta primera etapa la gran mayoría de callos fueron de color cristalino o cremoso, ejemplos de las coloraciones y tipos que se observaron con mayor frecuencia se pueden ver en la figura 8.



**Figura 8:** Coloraciones de callo primario. A: Explantes con callo cristalino fino en formaciones redondeadas (superior), y formaciones de callo cristalino grueso (inferior). B: Callo de coloración cremosa con formaciones granulosas. C: Callo de coloración oscura.

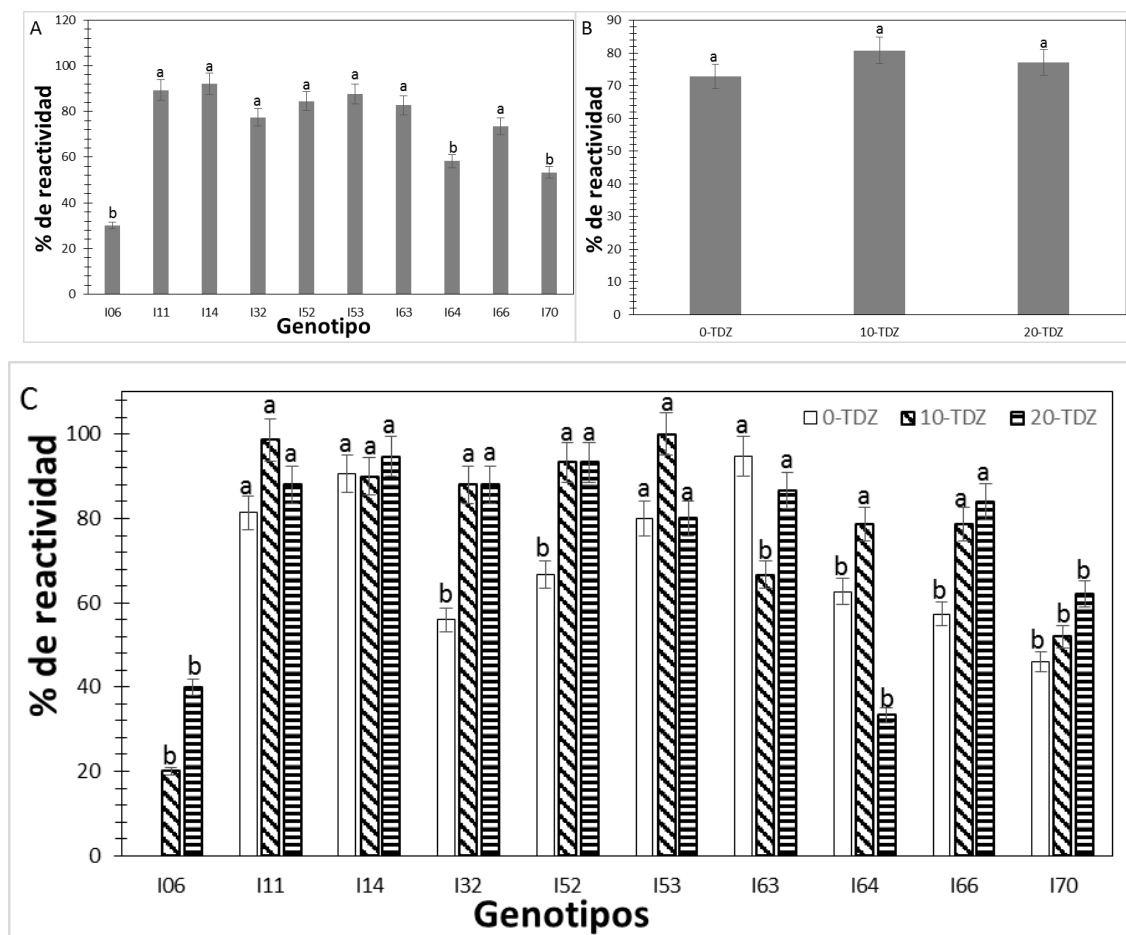
### 3.2. Desarrollo de callo secundario

#### 3.2.1. Reactividad de explantes

En esta etapa se volvió a evaluar el porcentaje de reactividad de los explantes, a los 28 días de cultivo todos los genotipos mostraron ser capaces de generar callo, el porcentaje de explantes con formación de callo estuvo entre 20-94.67% en promedio, en los tratamientos donde no se adicionó TDZ al medio de cultivo se obtuvieron por lo general los valores promedio de reactividad más bajos, con algunas excepciones en los genotipos I63 e I64 los cuales mostraron menor porcentaje promedio de formación de callo cuando los explantes se cultivaron en medio con 10nM de TDZ/L y 20nM de TDZ/L respectivamente. En la figura 9 se presentan las comparaciones de medias del porcentaje de reactividad de los explantes en medio SCG, el ANOVA evidenció diferencias



significativas entre los genotipos y la interacción de factores genotipo y concentración de TDZ, la concentración de TDZ como factor no tuvo efectos significativos. (Figura 9).

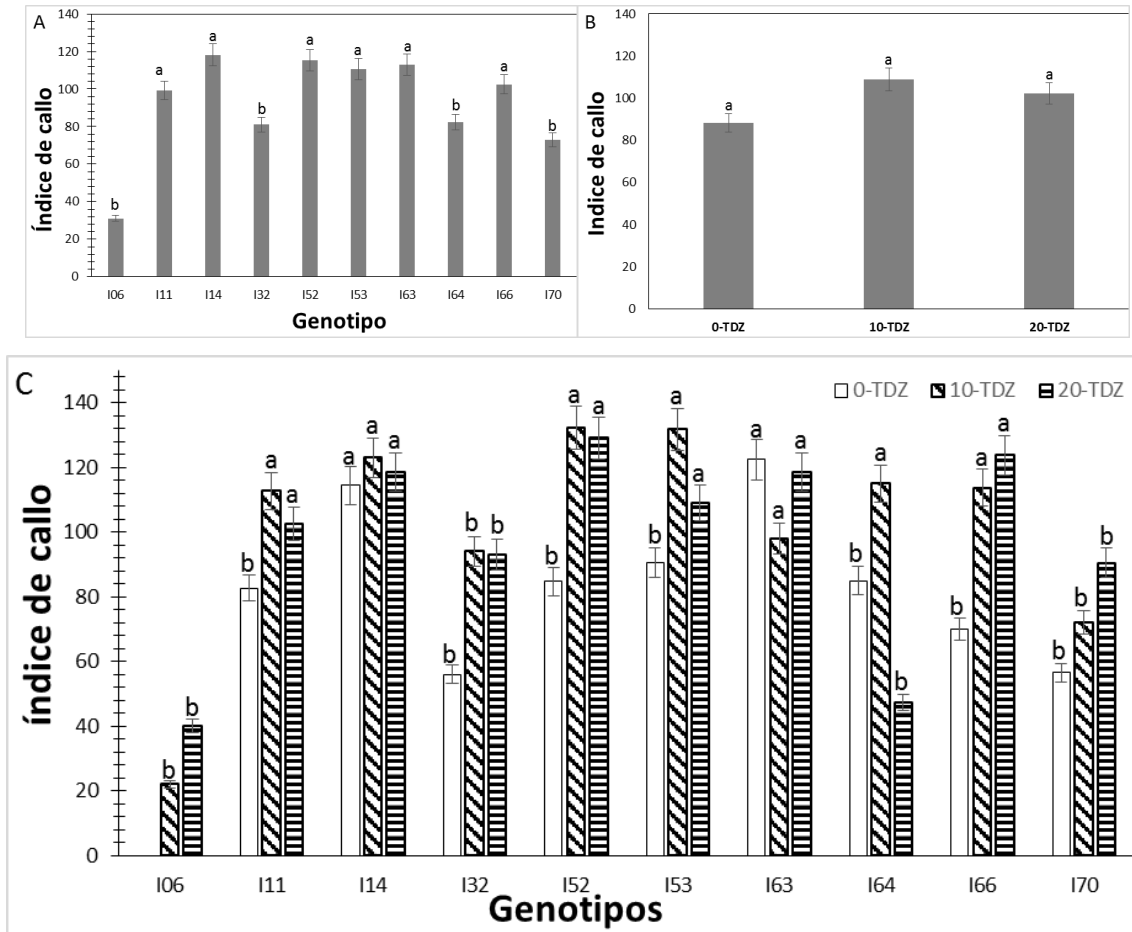


**Figura 9:** Porcentaje de reactividad de estaminodios de 10 genotipos de cacao nativo a 28 días de cultivo. (A: Por genotipo; B: Por concentración de TDZ y C: Interacción de factores). Letras diferentes indican diferencias entre las medias de los tratamientos (Scott Knott,  $p < 0.05$ ).

### 3.2.2. Índice de callo en inducción de callo secundario.

El índice de callo nos permitió evidenciar las diferencias entre los tratamientos, a partir de esta etapa los callos fueron examinados en función del tamaño, la escala utilizada se detalla en la sección materiales y métodos. Diferentes valores de índice callo se presentaron para los diez genotipos evaluados, el análisis de varianza muestra la existencia de diferencias significativas entre los genotipos y la interacción de los factores genotipos y concentración de TDZ

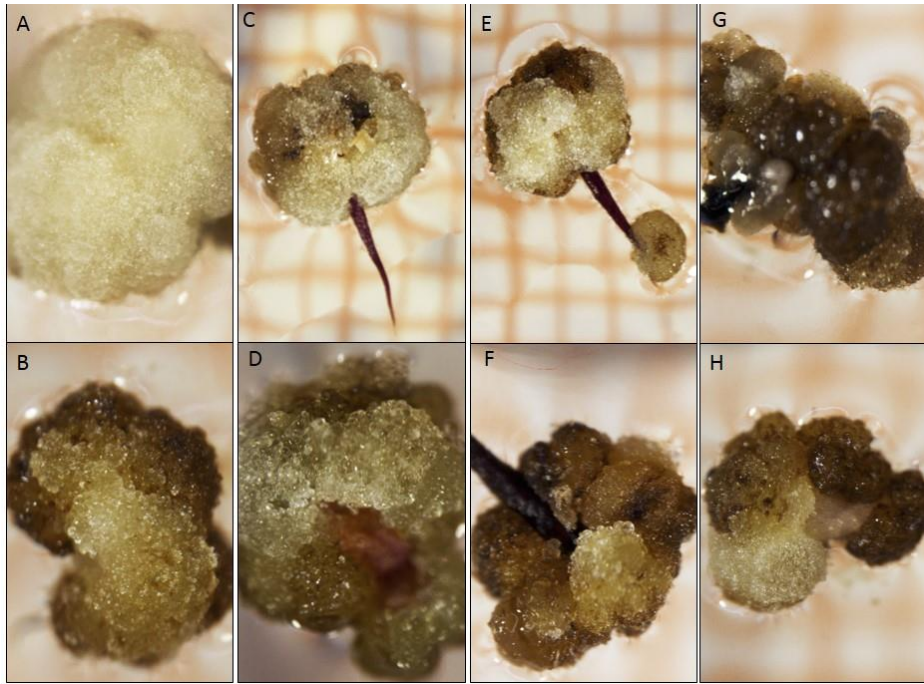
(Scott Knott,  $p < 0.05$ ). El factor concentración de TDZ por sí solo no tuvo un efecto significativo. Dependiendo del genotipo y la concentración de TDZ hubo diversos patrones de IC, así, I06, I64 e I70 presentaron IC de callo más bajo en los cultivos con 20 TDZ, el caso del genotipo I63 es excepcional, el IC promedio más alto se observó en el tratamiento sin TDZ.



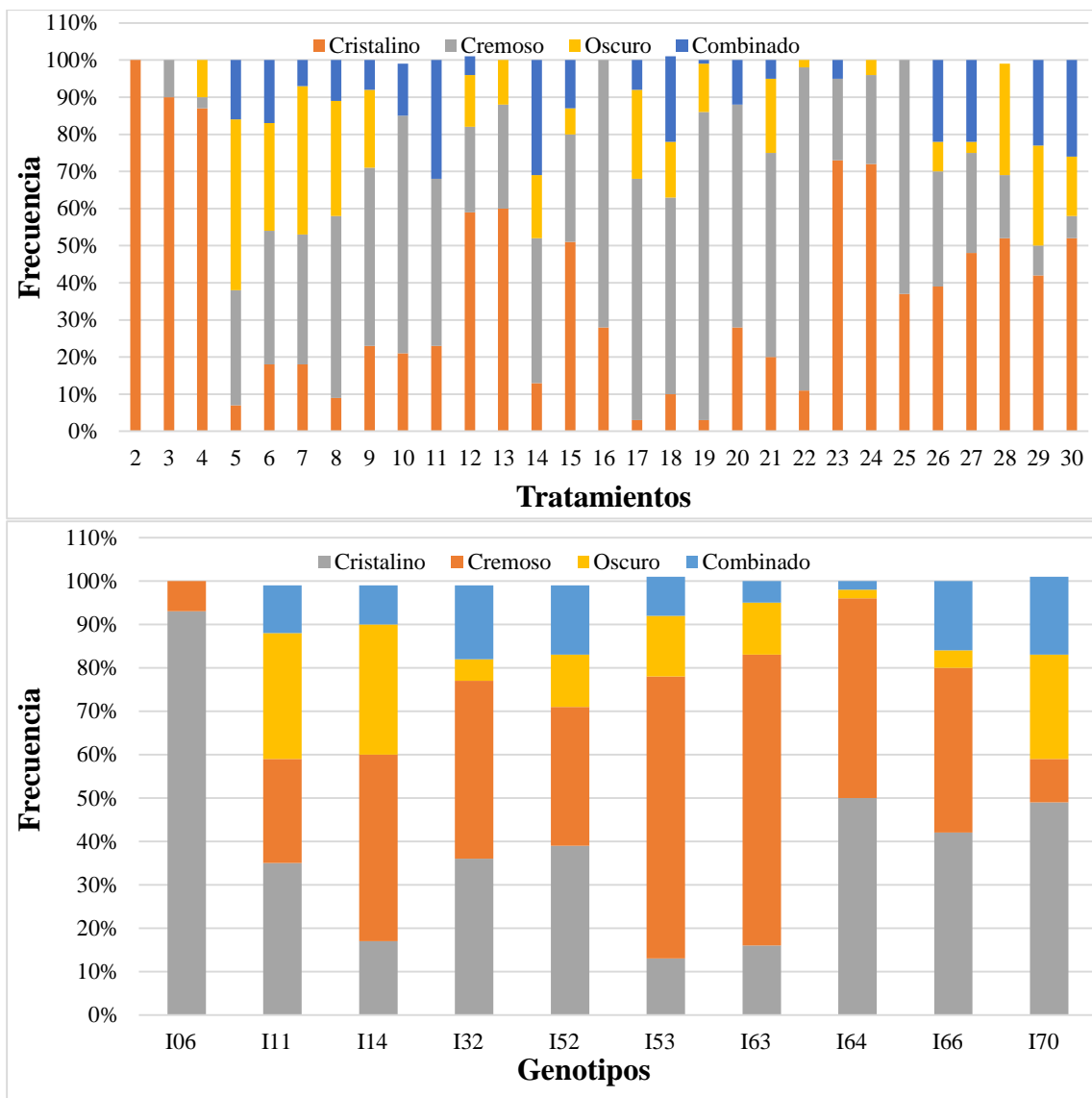
**Figura 10:** Índice de callo de 10 genotipos de cacao nativo a 28 días de cultivo. Letras diferentes indican diferencias entre las medias de los tratamientos (Scott Knott,  $p < 0.05$ ).

### 3.2.3. Coloración del callo

También en esta etapa se observaron diferentes tipos de callos que difirieron entre ellos por la coloración que tomaban, vistas de las coloraciones y tipos de callos observados se presentan en la figura 11, se observaron callos cristalinos, algunos se tornaron de coloración oscura y de textura granulosa.



**Figura 11:** Tipos de callo secundario.



**Figura 12:** Superior: Gráfico de barras apiladas para la distribución de frecuencias relativas de los tratamientos para la coloración del callo (Pearson Chi Cuadrado: 691.15\*\*\*) (Kruskall Wallis: 274.63\*\*\*). Inferior: Gráfico de barras apiladas de la distribución de frecuencias relativas de los genotipos para la coloración del callo (Pearson Chi Cuadrado: 316.57\*\*\*) (Kruskall Wallis: 82.86\*\*\*).

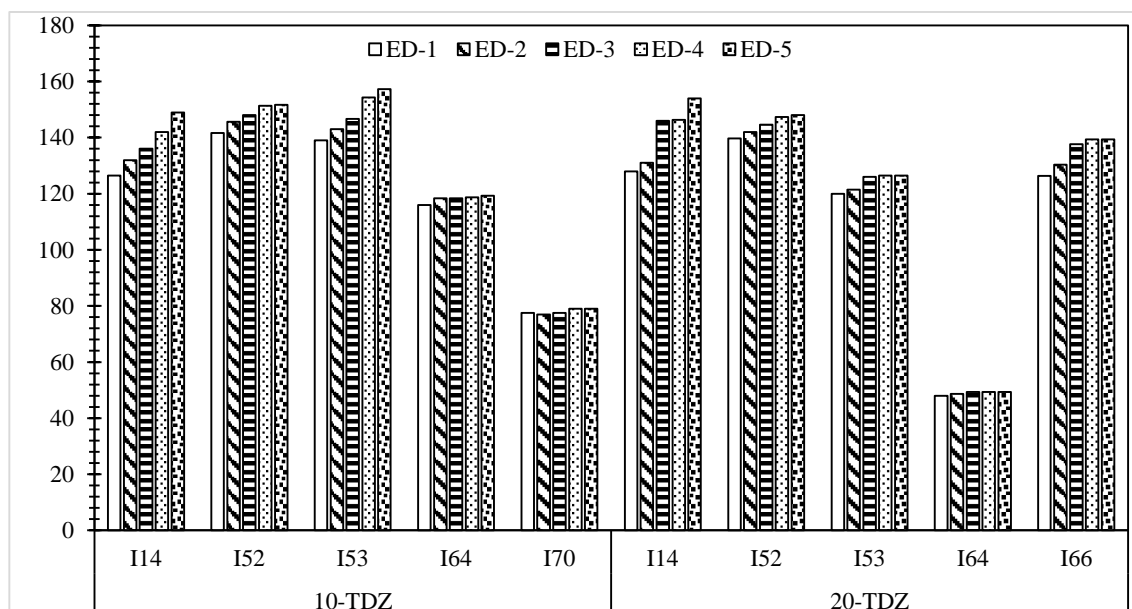
Se observó una fuerte relación entre el color del callo y los tratamientos aplicados, por lo tanto se apreciaron diferencias significativas entre tratamientos para las frecuencias observadas de coloración (Figura 12). El mismo nivel de relación se observó entre la coloración del callo secundario y los genotipos en evaluación.

### 3.3. Expresión de la embriogénesis somática (ED)

Durante la fase de expresión de la embriogénesis somática se realizaron cinco observaciones cada 14 días. Cada observación se nombró con un número estas fueron. ED1, ED2, ED3, ED4 y ED5.

#### 3.3.1. Índice de callo durante la expresión de embriogénesis somática.

Los callos siguieron desarrollándose durante la expresión de la embriogénesis somática, muchos de ellos siguieron su desarrollo normal sin cambiar de coloración, mientras que otros se necrosaban y detenían su crecimiento. La mayoría de tratamientos alcanzaron índices de desarrollo de callo por encima de 100 hasta alrededor de 160 (Figura 13). Además en todas las etapas de cultivo se observaron diferencias significativas entre las medias de los tratamientos (Anexo 1).

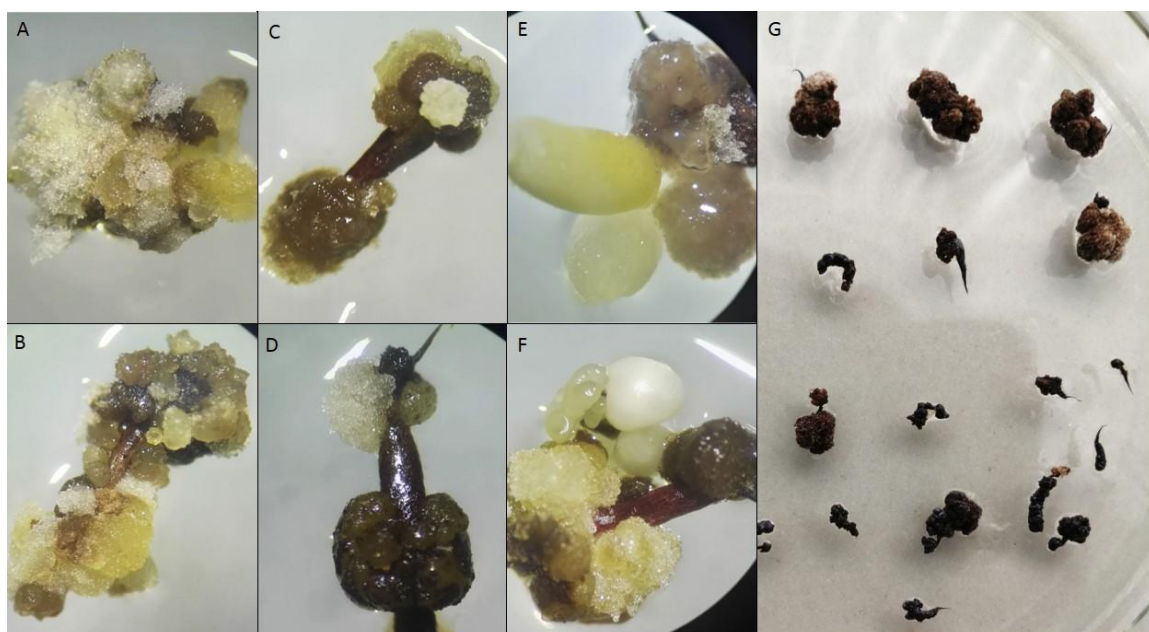


**Figura 13:** Índice de callo de 05 genotipos de cacao nativo durante la expresión de la embriogénesis somática.

Se observó que los tratamientos donde ocurrió la embriogénesis por lo general cesan totalmente su crecimiento en el segundo mes de cultivo en medio ED, sin embargo esto no se cumple en todos los tratamientos.

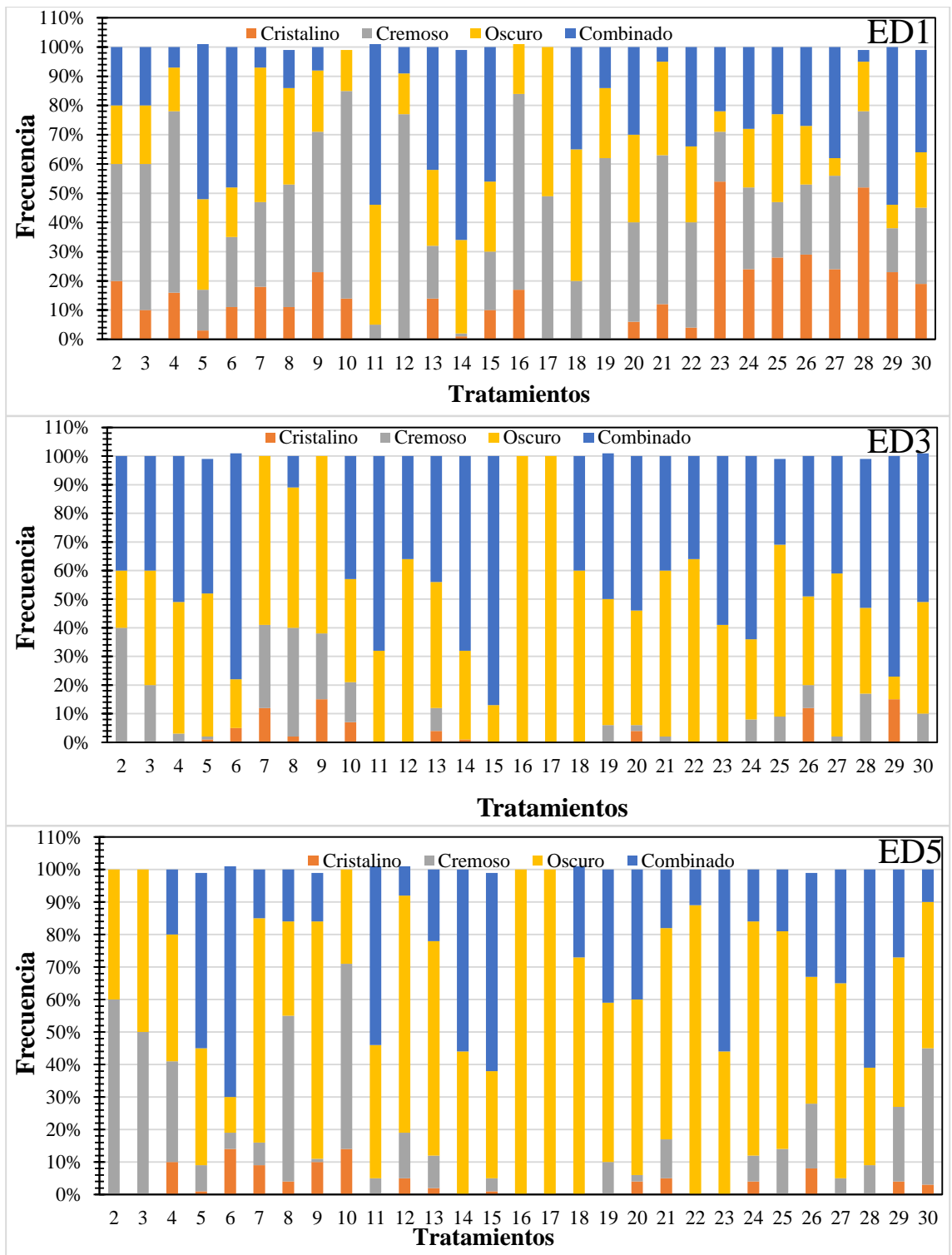
### 3.3.2. Coloración del callo

Durante la expresión de embriogénesis somática, la coloración de los callos fue cambiando de forma no sincronizada, muchos callos se tornaban oscuros llegando a necrosarse, se observa que conforme se avanzaba con los subcultivos la coloración de los callos tendía a ser oscura u combinación de callo oscuro necrótico con apariciones de callo cristalino o cremoso a consecuencia del crecimiento de nuevos callos. Diferentes tipos y colores de callo se observaron en esta etapa (Figura 14).

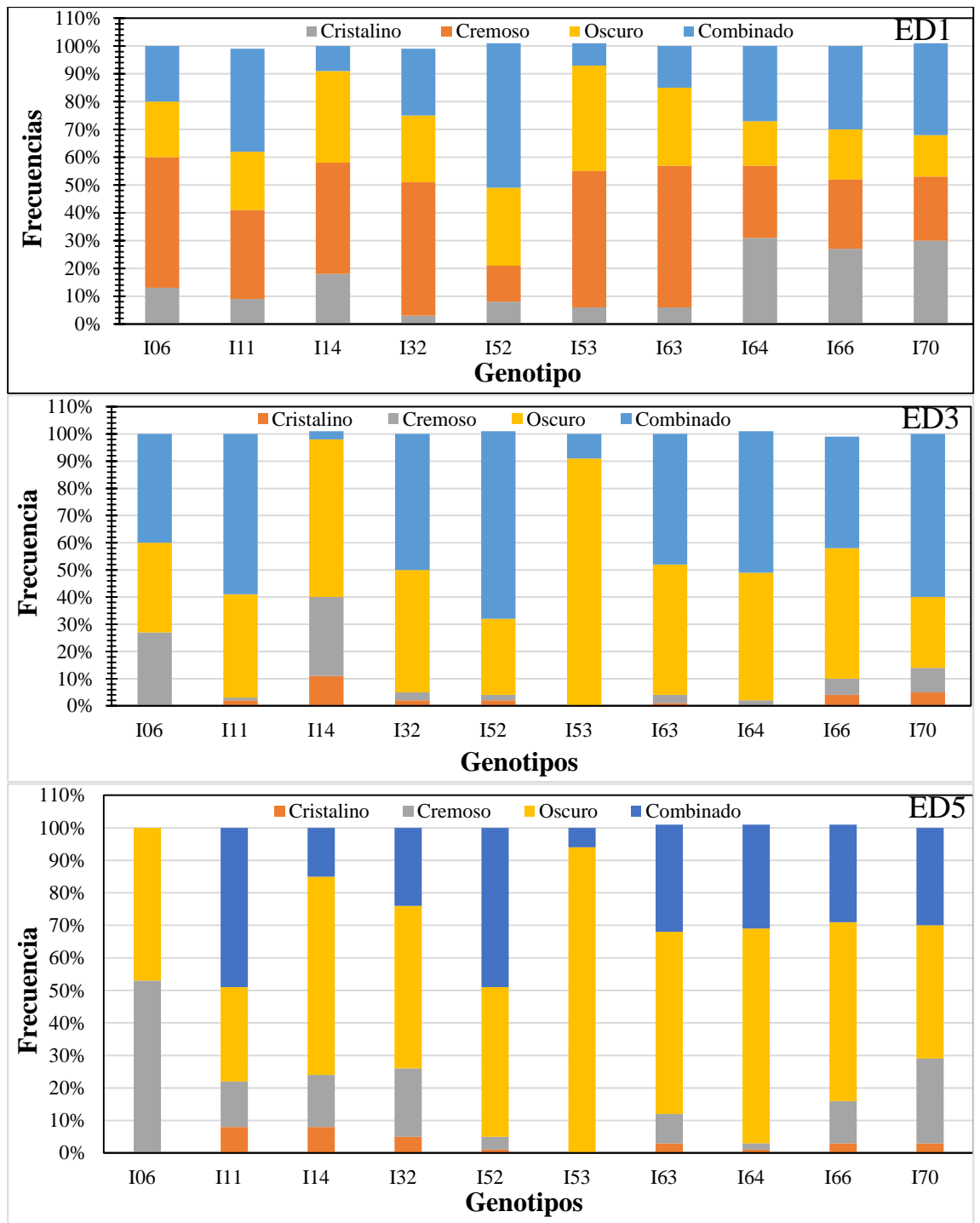


**Figura 14:** Tipos de callo en diferentes estados de desarrollo. A: Callo desarrollándose sobre callo en proceso de necrosamiento. B, C, D: Callos con partes necrosadas y partes vivas con crecimiento activo. E y F: callos de coloración combinada con presencia de embriones somáticos. F: Callos completamente necrosados pero sin desarrollo de embriones.

Al igual que en la etapas anteriores se observó una fuerte relación entre la característica de coloración de los callos y los tratamientos (Figura 15). Esta relación también fue observada para los genotipos (Figura 16).



**Figura 15:** Gráfico de barras apiladas para la distribución de frecuencias relativas de los tratamientos para la coloración del callo. ED1: Pearson Chi Cuadrado: 592.52\*\*\*;Kruskall Wallis: 262.62\*\*\*. ED3: Pearson Chi Cuadrado: 689.16\*\*\*;Kruskall Wallis: 321.04\*\*\*. ED5: Pearson Chi Cuadrado: 650.15\*\*\*;Kruskall Wallis: 223.51\*\*\*

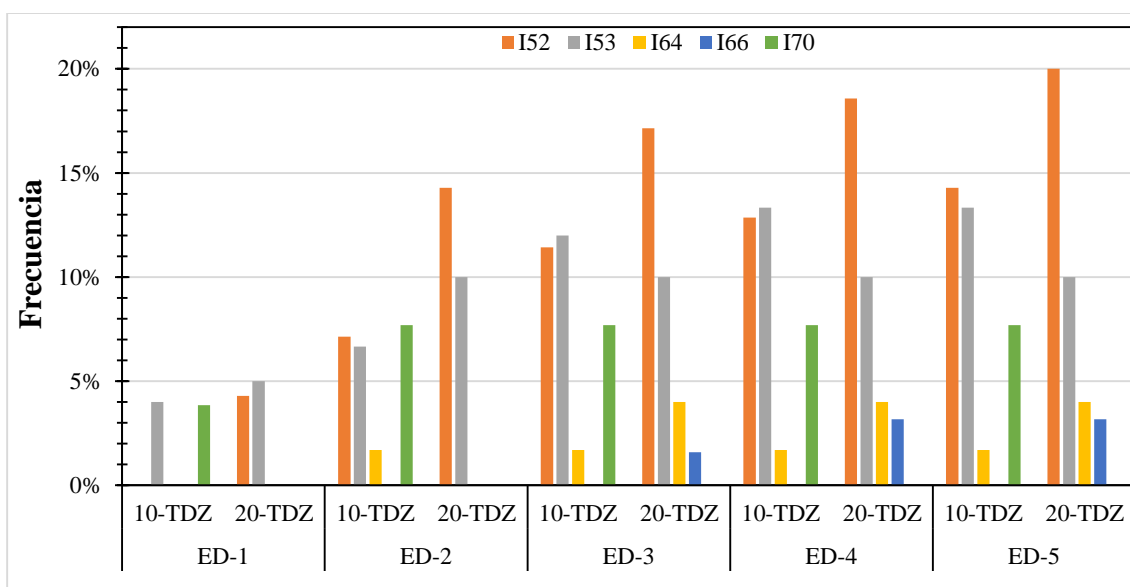


**Figura 16:** Gráfico de barras apiladas para la distribución de frecuencias relativas de los genotipos para la coloración del callo. ED1: Pearson Chi Cuadrado: 296.20\*\*\*;Kruskall Wallis: 101.09\*\*\*. ED3: Pearson Chi Cuadrado: 506.73\*\*\*;Kruskall Wallis: 267.33\*\*\*. ED5: Pearson Chi Cuadrado: 312.47\*\*\*;Kruskall Wallis: 86.07\*\*\*.



### 3.3.3. Porcentaje de callos embriogénicos

La evaluación de embriogénesis se extendió por 70 días, en este periodo solo 8 tratamientos involucrando cinco genotipos lograron formar embriones somáticos (Figura 17). Los porcentajes promedio de callo embriogénico, se presentaron en rangos entre: 2% para el genotipo I64 en medio con 10 nM TDZ y, 20% como valor máximo promedio para el genotipo I52 en medio con 20 nM de TDZ/L a los 70 días. Cabe notar que ningún genotipo logró formar embriones en ausencia de TDZ. Los genotipos I52, I53 e I70 lograron formar embriones a los 14 días de cultivo en medio ED.

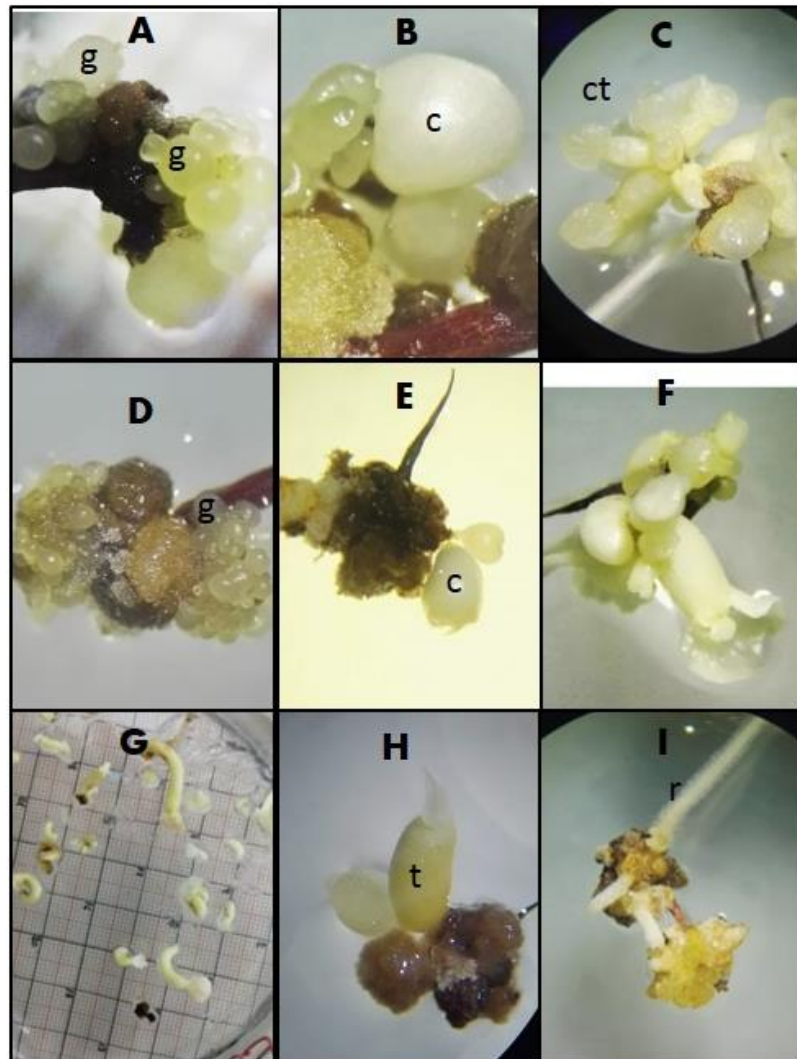


**Figura 17:** Frecuencia embriogénica de cinco genotipos de cacao nativo. De izquierda a derecha se observan las frecuencias embriogénicas por días de observación en medio de cultivo ED (ED-1: 14 días; ED-2: 28 días; ED-3: 42 días; ED-4: 56 días; y ED-5: 70 días).

### 3.3.4. Número promedio de embriones por explante.

La observación del número de embriones muestra un aspecto de la capacidad de regenerar embriones somáticos de cada genotipo y tratamiento específico. En ese sentido, el genotipo I52 cultivado en medio con 20nM de TDZ/L, es el que posee mejor capacidad de embriogénesis somática, los datos mostrados en la tabla 3, nos muestran que es este genotipo el que posee promedios de embriones por explante más bajos que otros genotipos, sin embargo esta condición es compensada con una mayor frecuencia embriogénica, el genotipo

I52 cultivado en medio con 20nM de TDZ/L tiene la capacidad de producir 237 embriones por cada 75 explantes introducidos en medio de cultivo con 20 nM de TDZ/L. En general, se observó, en los tratamientos donde fue posible comparar, que los tratamientos con 20 nM de TDZ/L obtienen embriones totales más altos que los tratamientos con 10 nM de TDZ/L (Tabla 3). Durante todo el periodo de cultivo en medio ED se observaron diversas etapas de desarrollo del embrión hasta llegar a embriones maduros, en la figura 18 se observan algunas vistas de embriones producidos en el presente estudio.



**Figura 18:** Estados embriogénicos de la embriogénesis somática del cacao (A-H). Globular (g); Corazón (c); Torpedo (t); Cotiledonar (ct); (I) formación de raíces en callo no embriogénico.

**Tabla 3:** Resultados de frecuencia embriogénica y número de embriones a los largo de 70 días de cultivo en medio ED para los genotipos I52, I53, I64, I66 e I70.

Genotipo	[TDZ]	Trat.	ED1 (14 días)				ED2 (28 días)				ED3 (42 días)				ED4 (56 días)				ED5 (70 días)			
			F.E.	μE.e.	M.E.e.	T.E.	F.E.	μE.e.	M.E.e.	T.E.	F.E.	μE.e.	M.E.e.	T.E.	F.E.	μE.e.	M.E.e.	T.E.	F.E.	μE.e.	M.E.e.	T.E.
I52	10-TDZ	14	0	0	0	0	5	6.2	12	31	8	11.5	25	92	9	15.33	32	138	10	17.6	44	176
I52	20-TDZ	15	3	4.33	9	13	10	5.5	12	55	12	9.58	21	115	13	11.92	25	155	14	16.93	39	237
I53	10-TDZ	17	3	2.67	5	8	5	2	3	10	9	2.78	6	25	10	4	10	40	10	5.1	10	51
I53	20-TDZ	18	2	11	15	22	4	8.25	20	33	4	9.5	24	38	4	9.75	24	39	4	15.5	38	62
I64	10-TDZ	23	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
I64	20-TDZ	24	0	0	0	0	0	0	0	0	1	10	10	10	1	10	10	10	1	22	22	22
I66	20-TDZ	27	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	2	2	2	4	2	3.5	4	7
I70	10-TDZ	29	1	3	3	3	2	15	15	30	2	22	24	44	2	24	24	48	2	28	32	56

**F.E.:** Frecuencia absoluta de callos embriogénicos.

**μE.e.:** Media de embriones por explante.

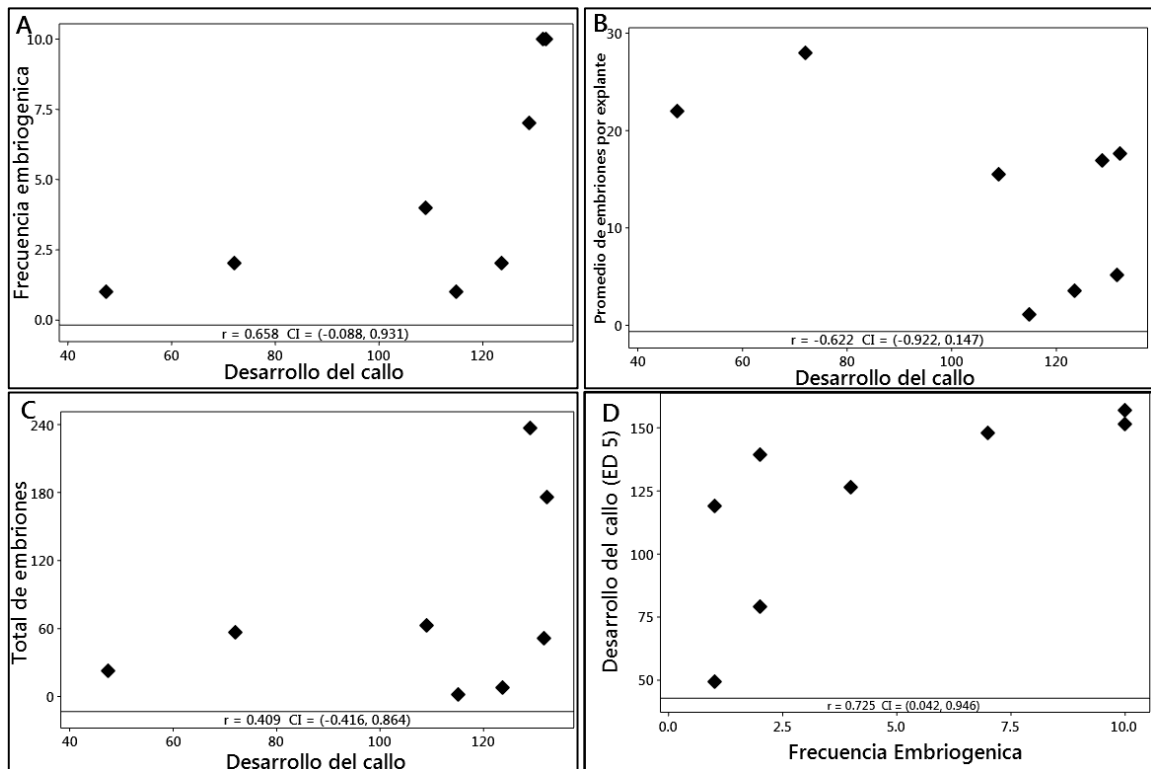
**M.E.e.:** Número máximo de embriones por explante.

**T.E.:** Total de embriones.

### 3.4. Correlación de desarrollo del callo con la embriogénesis somática.

Una vez que el desarrollo del callo y respuesta embriogénica fueron analizados por separado, se intentó determinar el nivel de correlación entre el desarrollo del callo y variables respuesta de la embriogénesis somática.

En los gráficos de correlación (Figura 19), la dispersión de los puntos de los puntos indica que no existe correlación entre el nivel de desarrollo de los callos al final de la segunda etapa de cultivo (SCG) y ninguna de las variables respuesta de la embriogénesis somática. Sin embargo, si existe correlación entre el desarrollo de los callos en la etapa final del estudio y la frecuencia embriogénica alcanzada por los tratamientos (Figura 19, Anexo 2). La prueba de correlación de Pearson respalda estos resultados.



**Figura 19:** Diagramas de correlación entre el desarrollo del callo a los 28 días de cultivo y, A: frecuencia embriogénica de los tratamientos, B: promedio de embriones por explante y C: total de embriones producidos por tratamientos. D: Diagrama de correlación entre desarrollo del callo en ED5 (98 días de cultivo) y la frecuencia embriogénica de los tratamientos.

#### IV. DISCUSIONES

Diversos autores han medido la respuesta a la inducción de callogénesis en explantes florales de cacao, con diferentes resultados según el genotipo utilizado y la composición del medio de cultivo (Ajijah et al., 2016; Ajijah et al., 2014; Chantásig, 2004; Kan et al., 2017; Li et al., 1998; Solano, 2008). En el presente estudio se obtuvieron resultados afines, ya que, a pesar de haber modificado solo un componente del medio de cultivo, en todos los tratamientos donde se produjo callogénesis la respuesta fue variable, dependiendo de los genotipos y composición del medio de cultivo.

En general se alcanzaron promedios de entre 4 y 95% de reactividad (Figura 2), no existen aún trabajos anteriores sobre embriogénesis en cacao nativo de Amazonas, sin embargo en trabajos realizados sobre variedades de cacao en otros países dan cuenta de lo variable que puede ser esta respuesta, por ejemplo, Solano, (2008), reportó porcentajes de formación de callo primario de entre 72-100% en explantes pétalos y estaminodios de cinco clones de cacao del jardín clonal del CATIE, observando los valores más altos de reactividad para explantes estaminodios (ICS-95, CC-137; UF-273; EET-183 y CATIE R7). En Perú, Gárate-navarro & Arévalo-gardini (2017) evaluaron la respuesta embriogénica de estaminodios de 10 genotipos de cacao de colección del Instituto de Cultivos Tropicales (ICT) en San Martín, utilizando medio DKW y diferentes concentraciones de 2,4-D (1,50 mg/L y 2, 5 mg/L) y TDZ (5.0 µg/L y 7.5 µg/L) y obtuvieron porcentajes de formación de callo de entre 42-100%. En nuestro caso utilizamos únicamente como explante los estaminodios y se observaron respuestas contrastantes, ya que en algunos casos solo el 4 % de estaminodios lograron formar callos en medio PCG. Observaciones similares se registraron en café, donde se observaron porcentajes de callogénesis variables según el genotipo, López-gómez et al. (2010), observaron frecuencias de callogénesis de entre 18 a 100% según genotipos evaluados, Sánchez, Cabrera, & Jiménez, (2019) lograron porcentajes de callogénesis de entre 92-100%.

En esta etapa de cultivo, bajo la premisa de haber observado ya respuestas diferenciales, algunos explantes mostraron aumento de tamaño y aparición posterior del callo primario, en otros casos, los explantes no cambiaban de tamaño llegando a necrosarse en algunos casos y formaban una pequeña cantidad de callo.

Estas reacciones de los explantes no fueron exclusivas para un tratamiento o genotipo específico, se presentaron de forma independiente pudiendo verse ambos casos en todos los tratamientos. Sin embargo, los explantes de los genotipos I11 e I14 mostraron una mayor predisposición a aumentar su tamaño y volverse turgente antes de la aparición de los callos, en contraste, los explantes de I70 e I66 tuvieron mayor ocurrencia de necrosamiento. La variabilidad de la respuesta pudiera ser el resultado de la reacción genotípica relacionada al uso de TDZ, que según algunos autores provoca diferentes reacciones de acuerdo al genotipo evaluado (Chanatásig, 2004; Li et al., 1998).

El índice de callo permitió generar la evaluación cuantitativa del desarrollo de los callos en etapa de inducción de callo primario a partir de la observación de las etapas de desarrollo del callo. En este estudio utilizamos el IC, propuesto por Chanatásig (2004), los valores de este índice van a variar según el número de explantes introducidos, en el caso de Chanatásig el valor del IC fue de 0 a 35 ya que introdujo solo 5 explantes por repetición, en nuestro caso el valor fue de 0-75 en etapa de inducción de callo primario, ya que se introdujeron 25 explantes por repetición. Los resultados obtenidos para el IC (Figura 4) también muestran diferentes respuestas entre los tratamientos y genotipos, por lo general se obtienen los IC más bajos en los tratamientos sin adición de TDZ.

El efecto de la relación auxinas/citocininas sobre la capacidad de formar callo en explantes de cacao fue evaluado por Kan Kouassi et al., (2017), y demostraron que la interacción entre reguladores de crecimiento pueden afectar la producción de callos y posteriormente la embriogénesis. En nuestro caso, al eliminar la fuente de citocinina en los tratamientos sin TDZ se afectó en gran medida esta relación, ya que no existía, como consecuencia se obtuvieron resultados bajos de respuesta. Similares resultados fueron observados por Li et al. (1998), reportaron que en ausencia de TDZ el porcentaje de estaminodios responsivos era mucho menor al que se obtenía en presencia de TDZ en el medio de cultivo, sin embargo cuando la concentración era mayor a 22 nM el porcentaje de estaminodios responsivos bajaba en la mayoría de los casos.

La prueba de comparación de medias, muestra que la interacción de genotipo y concentración de TDZ, tienen efectos significativos sobre el porcentaje de reactividad ( $p < 0.0001$ ) y el IC ( $p < 0.0001$ ) obtenido. Los efectos del medio de

cultivo, genotipo y explante fueron medidos también por otros autores, y se ha identificado que la fuente de carbono o los reguladores de crecimiento son factores que interactúan fuertemente con el genotipo para determinar el nivel de reactividad de los explantes. Lopez-Báez et al.(2001) y Chantásig (2004) determinaron que el uso de sacarosa y glucosa como fuente de carbono favorece el desarrollo de callos, Li et al. (1998) encontró que la adición de TDZ como regulador de crecimiento favorece la callogénesis. Kan et al. (2017) mostró que la adición de auxinas como 2,4-D también favorece la callogénesis en cacao. Sin embargo, como se ha de observar más adelante la respuesta a la inducción no depende únicamente de un factor sino más bien de la interacción de muchos factores (Kan et al., 2017; Maximova et al., 2002).

La observación de la posición de aparición del callo, indica que los callos pueden aparecer en la base del callo (zona de corte), en la zona media, en simultáneo en la base y zona media, en simultáneo en la base y el ápice del estaminodio y en algunos casos cubriendo todo el explante (figura 6). La distribución de frecuencias estuvo fuertemente relacionada con los genotipos y los tratamientos aplicados (figura 5). Por lo general se presentó el inicio de la callogénesis en la base del explante, en la zona de corte, similar observación fue realizada por Aguilar (1990), quien identificó la aparición de callo compacto en la zona de corte del explante. La aparición de callo en las zonas de corte fue observada también en otros cultivos como Café (López-gómez et al., 2010), esto se debe a que el contacto del medio de cultivo con células expuestas es más activo en estas zonas del explante. La presencia de reguladores de crecimiento endógenos puede también favorecer la aparición de callo en sectores específicos (de la Cruz et al., 2017)

La observación de los callos formados en esta etapa de cultivo permitió definir diferentes tipos de callo, en nuestro estudio mayormente se observaron callos granulados de color entre cristalina y cremosa, en algunos casos se presentaban coloraciones oscuras, y en otras una combinación de colores y texturas en el mismo callo (figura 8). Similares observaciones se han realizado en estudios de otros autores, Chantásig (2014), observó que callo cristalino y cremoso de texturas compactas o granuloso. Henao et al, (2018) observaron también diferentes tipos de, el primer tipo estaba compuesto por células vítreas blancas, redondas y translúcidas; el segundo tipo consistía en células amarillas cerosas y finalmente un callo blanco

filamentoso, en genotipos de cacao peruano, Gárate-navarro y Arévalo-gardini (2017), observaron también diferentes tipos de callo como cristalinos friables y compactos, otros de coloración cremosa. Un tipo de callo no es exclusivo de un tratamiento o genotipo en específico, pueden observarse los diferentes tipos de callo en el mismo tratamiento, sin embargo, las frecuencias con que se presentan los tipos de callo, basados en su coloración, mostraron una fuerte relación con el genotipo y el tratamiento aplicados. Los genotipos I11, I14 e I32 formaron mayormente callos de coloración cremosa y textura granulosa, mientras que los genotipos I63, I64 e I70 desarrollaron callos primarios de coloración mayormente cristalina (Figura 7). La diferenciación de callos embriogénicos y no embriogénicos en esta etapa no es posible ya que el desarrollo y diferenciación de callos es muy temprana (Chanatásig, 2004).

Respecto a la etapa del desarrollo secundario, se observaron porcentajes de reactividad más altos, explantes que no alcanzaron desarrollar callo en medio PCG desarrollaron callo en esta etapa de cultivo, sin embargo las diferencias entre tratamientos y genotipos respecto del porcentaje de reactividad se mantienen, I06 e I70 presentaron los porcentajes de reactividad más bajos en esta etapa de cultivo, porcentajes variables entre 40 y 100% se registraron en los demás tratamientos (Figura 9). Esto sugeriría que es necesario mantener los explantes por mayor tiempo en medio PCG para favorecer la formación de callo primario antes de ser expuestos al medio SCG con presencia de BAP. Anteriormente, Chanatásig (2004), evaluó el efecto de cultivar los explantes por 14 y 28 días en medio PCG, cuando cultivaron los explante 28 días en medio con sacarosa, parecido al usado en nuestro estudio, obtienen mejores resultados de desarrollo del callo. La interacción de los factores evaluados tiene efectos significativos sobre los parámetros evaluados al final del cultivo en medio SCG ( $p < 0.0001$ ). En esta etapa el medio de cultivo contiene BAP y 2,4-D que anteriormente ya fueron probados por otros autores, coincidiendo en que su acción sobre la callogénesis y posterior embriogénesis está ligada a la interacción con el genotipo y el tipo de explante (Chanatásig, 2004; Henao et al., 2018; Solano, 2008; Urrea et al., 2011), específicamente Chanatásig (2004) observó que el efecto de las citocininas era significativo en un determinado periodo de tiempo en el proceso de cultivo, ya que sus efectos dejaban de ser significativos



cuando se cultivaban los explantes por 28 días en medio PCG. Observaciones similares se reportan en nuestro estudio.

El IC fue medido en esta etapa muestra las diferencias entre los tratamientos, los genotipos I06, I32 e I70 alcanzaron IC similares entre ellos y significativamente menores a los IC alcanzados por otros tratamientos, los IC alcanzados por los explantes cultivados sin TDZ también son menores a los que fueron cultivados con TDZ (Figura 10). La interacción de factores, como genotipos y composición del medio de cultivo explicarían estas diferencias.

En esta etapa también se observaron diferentes tipos de callo (Figura 11), el cambio de coloración de cristalina a cremosa y a callos de coloración oscura fue observada al final de este periodo de cultivo (Figura 12). La presencia de fenoles en los callos explica el cambio de coloración, la formación de callo cristalino sobre formaciones de callo oscuro fue recurrente también este periodo.

Observaciones de diferentes tipos de callo fueron realizadas por otros autores, sin embargo la diferenciación de callos embriogénicos y no embriogénicos es todavía motivo de controversia, ya que diversas respuestas se han dado respecto de los tipos de callo observadas en este periodo y no se coinciden entre sí, el único consenso que existe hasta ahora es que el cambio de coloración a tonos oscuros es precedente para el inicio de la embriogénesis somática (Chanatásig, 2004; Henao et al., 2018; Issali et al., 2010; Traore & Gultinan, 2006; Traore et al., 2003).

Luego de transferir los cultivos a medio ED se observó necrosamiento no sincronizado en todos los tratamientos, en algunos casos este necrosamiento fue completo mientras que en otros se presentaba solo en algunos sectores del callo manteniendo crecimiento activo en otros sectores (Figuras 14, 15, 16), el necrosamiento fue progresivo y un mayor número de explantes experimentaron necrosamiento conforme se avanzaba con los subcultivos, algunos explantes no experimentaron necrosamiento y mantuvieron crecimiento durante todo el periodo de cultivo. Los explantes que no presentaron necrosamiento en ningún caso alcanzaron desarrollar embriones. Observaciones similares fueron reportados por otros autores y coinciden en que el crecimiento excesivo de callos es el mayor cuello de botella para la regeneración de plantas vía embriogénesis somática (Alemanno et al., 1996; Chanatásig, 2004). El cambio de coloración se identificó como un efecto de la acumulación de fenoles durante el cultivo (Alemanno, 1996), respecto

de estos compuestos, Ndoumou et al. (1997) y Quiroz-Figueroa et al., (2001) expresan que la presencia de fenoles afectan la embriogénesis somática, ya que los fenoles como antioxidantes podrían representar un mejor sustrato para las enzimas oxidativas, cuya acción permite la liberación de las auxinas para promover la diferenciación embriogénica. Esto indicaría que en cacao los fenoles actúan como inductores de la embriogénesis, sin embargo Gallego et al. (2016), concluyeron que es necesaria una distribución y concentración equilibrada de los compuestos fenólicos para favorecer la embriogénesis, ya que concentraciones altas fueron asociadas con una respuesta no regenerativa de embriones, recomendando que la localización histológica de estos compuestos sería una herramienta para distinguir entre callos regenerativos y no regenerativos (Alemanno et al., 2003; Gallego et al., 2016).

Respecto del crecimiento del callo durante el cultivo en medio ED, en la mayoría de tratamientos se observó que el crecimiento se estabiliza a partir del día 42 de cultivo en medio ED (Figura 13), esto podría deberse a que la mayoría de explantes superan los 6mm de desarrollo, etapa máxima de desarrollo planteada para el estudio, en otros casos cuando los explantes se necrosaron detuvieron su crecimiento. Chantásig (2004) también observó que los explantes necrosados detenían su crecimiento.

La aparición de estructuras pro-embriónicas ocurrió de manera progresiva desde las primeras semanas de cultivo en medio ED, hasta el final del periodo de evaluación (70 días de cultivo en medio ED) solo 5 genotipos en 8 tratamientos fueron capaces de regenerar embriones somáticos pese a que virtualmente todos llegaron a formar callos de diferentes tipos. Los genotipos I52, I53 e I70 desarrollaron estructuras embriónicas desde los primeros 15 días de cultivo en medio ED, los genotipos I64 e I66 iniciaron la formación de embriones durante el segundo mes de cultivo (Figura 17). Estos resultados contrastan con los reportados por Chantásig (2004), Li et al. (1998) y Henao et al. (2018), quienes observaron la formación de embriones a partir de la octava semana de cultivo en medio ED.

El hecho de que algunos genotipos no hayan respondido a la inducción de embriogénesis somática pese a recibir el mismo tratamiento y la observación de las respuestas embriónicas de los genotipos que si fueron responsivos (Anexo 3), respaldan los resultados reportados por otros autores que expresan la fuerte

influencia del genotipo y su interacción con otros factores durante la inducción sobre la respuesta embriogénica ya que según el genotipo evaluado se pueden regenerar fácilmente embriones en un medio de cultivo específico, mientras que otros genotipos no muestran la misma respuesta (Chanatásig, 2004; Henao et al., 2018; Maximova et al., 2002; Solano, 2008; Tan & Furtek, 2003; Urrea et al., 2011)). En otras especies también se reportan estas diferencias (Fernández, et al. 2016; Fisichella et al., 2000; Litz, 1984; Sánchez et al., 2019).

Lopez-Báez 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. Sin embargo, diferentes autores coinciden en que la embriogénesis es el resultado de la interacción de múltiples factores como, composición del medio, uso de reguladores de crecimiento, tipo de explante y genotipos evaluados (Gárate-navarro & Arévalo-gardini, 2017; Henao Ramírez et al., 2018; Issali et al., 2010; Kan et al., 2017; Minyaka et al., 2008; Solano, 2008; Urrea et al., 2011). Chanatásig, (2004), al evaluar el clon UF273 obtuvo mayor porcentaje formación de callo embriogénico en pétalos de cacao, sin embargo el explante que produjo más embriones totales fueron los estaminodios. Para el clon SCA6 no obtuvo respuesta embriogénica al utilizar estaminodios como explante.

Las frecuencias embriogénicas fueron más altas en medio con 10 nM de TDZ/L en los genotipos I52 e I53, el genotipo I64 alcanzó mejores frecuencias embriogénicas en medio de cultivo con 20 nM de TDZ/L, el genotipo I70 solo respondió al ser cultivado en medio con 10 nM de TDZ/L, finalmente el genotipo I66 solo respondió al tratamiento con 20 nM de TDZ/L. No obstante, para analizar correctamente la capacidad de respuesta de un genotipo en específico, es necesario evaluar en conjunto la frecuencia embriogénica y el número promedio de embriones por explante (Chanatásig, 2004), en ese caso, se afirma que, el genotipo I52 es el que mejor respuesta tuvo al tratamiento aplicado, ya que hasta los 70 días de cultivo llegó a formar 276 embriones cuando la inducción se hizo en medio de cultivo con 20 nM de TDZ/L, de igual forma cuando la inducción se hizo en medio con 10nM de TDZ/L se obtuvieron 176 embriones en total, siendo estos los valores más altos de embriones totales. Entonces, si para I52 se considera una frecuencia embriogénica relativa final de 20% y un promedio de 16.93 embriones por explante

(Figura 17; Tabla 3) indicaría que virtualmente se pueden obtener 338.6 embriones por cada 100 estaminodios introducidos para inducción en medio con 20 nM de TDZ/L. Para I53, el mejor tratamiento también fue cuando la inducción se hizo en medio con 20 nM de TDZ/L, ya que pese a obtener una menor frecuencia el promedio de embriones por explante (15.5) fue superior al que se obtiene al realizar la inducción en medio con 10 nM de TDZ/L (5.1) (Tabla 3). No existen reportes para frecuencia embriogénica en cacao peruano, sin embargo, otros autores han evaluado el efecto de fuente de carbono, reguladores de crecimiento y tiempo de cultivo sobre la respuesta embriogénica de diversos genotipos de cacao en Colombia y Centroamérica, así, (Li et al., 1998), obtuvieron frecuencias embriogénicas de entre 0 y 100% al evaluar la respuesta entre clones centroamericanos, Chantásig (2004) alcanzó frecuencias embriogénicas de entre 4 y 24 % para el clon UF273 y de entre 4 y 20% para el clon SCA6, son embargo los promedios de embriones por explante fueron menores a los que se reportan en nuestro estudio. Por su parte, Kan et al. (2017) al evaluar la respuesta de estaminodios y pétalos de 4 genotipos elites de Costa de Marfil a diferentes medios de cultivo obtuvieron porcentajes de 0 y 4% para estaminodios, en general diversas respuestas se han logrado con cada genotipo, tipo de explante, medio de cultivo y condiciones de cultivo que se han evaluado. Al contrastar esta diversidad de resultados con los nuestros se respalda la fuerte injerencia del genotipo y su interacción con otros factores del cultivo para el éxito de la reproducción de cacao vía embriogénesis somática.

Pocos autores han intentado establecer una relación entre el desarrollo de los callos y la respuesta embriogénica de los mismos. En ese sentido, Chantásig (2004) no encontró que el desarrollo del callo expresado por el IC obtenido al final del periodo de desarrollo del callo secundario (SCG) esté correlacionado a la frecuencia embriogénica o el número de embriones por explante.

En nuestro caso, tampoco se pudo establecer que exista una correlación entre el desarrollo del callo al finalizar la inducción y la frecuencia embriogénica o el número de embriones por explante (Figura 19, Anexo 2). Sin embargo, al analizar el desarrollo de los callos hacia el mes final de cultivo en medio ED se pudo

encontrar que el desarrollo de los callos estuvo relacionado positivamente con la frecuencia embriogénica alcanzada, mas no con ninguna otra variable evaluada. Esta respuesta podría deberse a que en nuestro estudio el desarrollo de los callos se dio de forma continua durante toda la etapa de cultivo, además la aparición de embriones con frecuencia se dio en callos que presentaban al mismo tiempo callo necrosado y callo vivo con crecimiento activo. Chantásig (2004) también observó que los callos derivados del cultivo de estaminodios continuaban creciendo de forma continua durante todo el cultivo.

## V. CONCLUSIONES

- Todos los genotipos evaluados respondieron a la inducción de callos, sin embargo las respuestas fueron diferentes según los tratamientos aplicados, demostrando la influencia del genotipo sobre la callogénesis.
- La embriogénesis está muy ligada al factor genético, ya que según el genotipo evaluado se obtienen respuestas diferenciales, en nuestro caso solo 5 genotipos de 10 fueron adecuados para generar embriogénesis somática.
- La frecuencia embriogénica alcanzada en este estudio es baja, sin embargo, se obtuvieron embriones totales relativamente altos para el genotipo I52, y en general el hecho de haber logrado la generación de embriones somáticos en genotipos superiores sugiere un gran potencial para trabajos que busquen mejorar la escala de multiplicación o pretendan utilizar esta herramienta como vía para el mejoramiento genético del cacao en Amazonas.
- No existe correlación directa entre el desarrollo del callo al final de la inducción y la respuesta embriogénica de los explantes, sin embargo se pudo reconocer una relación entre el desarrollo de los callos al final del cultivo y la frecuencia embriogénica final.
- Se observó que los embriones somáticos se originan a partir de callos necrosados, sin embargo el necrosamiento de callos como precedente para la embriogénesis no es algo que se cumpla en todos los casos, ya que se observaron callos necrosados que no formaron embriones.

## **VI. RECOMENDACIONES**

- En base a los resultados obtenidos en el presente estudio se puede identificar otros factores de estudio tales como; fuentes auxinas y otros reguladores de crecimiento, medios de cultivo y protocolos de introducción, tipos de explantes como pétalos.
- Se recomienda seguir con el cultivo de los embriones obtenidos y continuar con trabajos que evalúen la respuesta de los mismos al proceso de conversión y germinación. Además, se debe indagar sobre la respuesta de estos embriones a la inducción de embriogénesis secundaria, ya que existen reportes de que se pueden mejorar las frecuencias embriogénicas y la cantidad de embriones producidos mediante este tipo de embriogénesis.
- Continuar con la investigación para generar protocolos eficientes para cada uno de los genotipos de interés para la región y el país.
- El potencial de regenerar plantaciones de calidad mediante la producción masiva de plantas vía embriogénesis somática es grande, esto permitirá ofertar a los cacaoteros de la región semillas de cacao de calidad, solucionando el problema de la escasez de semillas superiores.

## VII.REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguilar, M. . (1990). *Obtención de plantas de cacao (Theobroma cacao L.) a partir de microinjerto de embriones somáticos*. CATIE.
- Ajjah, N., Hartati, R. S., Rubiyo, Sukma, D., & Sudarsono. (2016). Effective cacao somatic embryo regeneration on kinetin supplemented DKW medium and somaclonal variation assessment using SSRs markers. *Agrivita*, 38(1), 80–92. <https://doi.org/10.17503/agrivita.v38i1.619>
- Ajjah, N., Rubiyo, & Sudarsono, D. (2014). Callogenesis and somatic embryogenesis of cacao using thidiazuron through one step of callus induction. *Jurnal Penelitian Tanaman Industri*, 20, 179–186.
- Alemanno, L., Berthouly, M., & Michaux-Ferrière, N. (1996). Histology of somatic embryogenesis from floral tissues cocoa. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 46(3), 187–194. <https://doi.org/10.1007/BF02307094>
- Alemanno, L., Ramos, T., Gargadenec, A., Andary, C., & Ferriere, N. (2003). Localization and identification of phenolic compounds in *Theobroma cacao* L . somatic embryogenesis. *Annals of Botany*, 92, 613–623. <https://doi.org/10.1093/aob/mcg177>
- Centro de Comercio Internacional. (2001). *Cacao: Guía de prácticas comerciales*. Ginebra: UNCTAD/OMC.
- Chanatásig, C. I. (2004). *Inducción de la embriogénesis somática en clones superiores de cacao ( Theobroma cacao L .), con resistencia a enfermedades fungosas*. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza CATIE.
- de la Cruz, D. I., Ruiz-sanchez, M. E., & Guerrero-abad, J. C. (2017). Respuesta de la embriogénesis somática directa en tres regiones foliares de *Phalaenopsis amabilis*. *Rev. de Investig. Agroproduccion Sustentable*, 1(3), 72–78. <https://doi.org/10.25127/aps.20173.377>
- Fernández, R., Villarroel, A., Cuamo, L., & Storaci, V. (2016). Evaluation of a somatic



- embryogenesis regeneration system for Neem ( *Azadirachta indica*). *Acta Biologica Colombiana*, 21(3), 581–592.
- 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.
- Florez, S. L., Erwin, R. L., Maximova, S. N., Guiltinan, M. J., & Curtis, W. R. (2015). Enhanced somatic embryogenesis in *Theobroma cacao* using the homologous BABY BOOM transcription factor. *BMC Plant Biology*, 15(1), 121. <https://doi.org/10.1186/s12870-015-0479-4>
- Fontanel, A., Gire-Bobin, S., Labbé, G., Favereau, P., Álvarez, M., Rutte, S., & Pétiard, V. (2002). In vitro multiplication and plant regeneration of *Theobroma cacao* L. via stable embryogenic calli. In *10 IAPTC Congress, Plant Biotechnology*.
- Gallego, A., Henao, A. M., Urrea, A., & Atehortúa, L. (2016). Análisis de distribución de polifenoles y sustancias de reserva en embriogénesis somática de cacao. *Acta Biologica Colombiana*, 21(2), 335–345.
- Gárate-navarro, M. A., & Arévalo-gardini, E. (2017). Induction of somatic embryogenesis from cocoa farmer field collection of ICT - Peru. *International Annals of Science*, 2(1), 6–11.
- Henao Ramírez, A. M., de la Hoz Vasquez, T., Ospina Osorio, T. M., Atehortúa Garcés, L., & Urrea Trujillo, A. I. (2018). Evaluation of the potential of regeneration of different Colombian and commercial genotypes of cocoa (*Theobroma cacao* L.) via somatic embryogenesis. *Scientia Horticulturae*, 229(2018), 148–156. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.10.040>
- INEI. (2013). *IV Censo Nacional Agropecuario. Resultados Definitivos. IV Censo Nacional Agropecuario*. Lima: Punto&Grafía. Retrieved from <http://proyectos.inei.gob.pe/web/DocumentosPublicos/ResultadosFinalesIVCENA GRO.pdf>

- Issali, A. E., Traoré, A., Konan, J. L., Mpika, J., Andi, J., Ngoran, K., & Sangaré, A. (2010). Relationship between five climatic parameters and somatic embryogenesis from sporophytic floral explants of *Theobroma cacao* L., (November).
- Kan Kouassi, M., Kahia, J., Kouame, C. N., Tahi, M. G., & Kouablan, K. (2017). Comparing the Effect of Plant Growth Regulators on Callus and Somatic Embryogenesis Induction in Four Elite. *HortScience*, 52(1), 142–145. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI11092-16>
- Li, Z., Traore, A., Maximova, S., & Gultinan, M. J. (1998). Somatic embriogenesis and plant rengeneration from floral explants of cacao (*Theobroma cacao* L.) using thidiazuron. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 34, 293–299.
- Litz, R. (1984). In vitro Somatic embriogénesis from nucellar callus of monoembryonic mango. *HortScience*, 19, 715–717.
- Lopez-Báez, O., Moreno, J., & Pacheco, S. (2001). Avanzos en propagación de cacao *Theobroma cacao*- por embriogénesis somática en México. In *Ingenic. Proceedings of the International Workshop on new Technologies and Cocoa Breeding* (pp. 163–176). Malasya: Ingenic.
- López-gómez, P., Iracheta-donjuan, L., Castellanos-juárez, M., Méndez-lópez, I., Sandoval-esquivez, A., Aguirre-medina, J. F., ... Gutiérrez-Díez, A. (2010). Influence of explante and culture medium on somatic embryogenesis of coffe leaves. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 33(3), 205–213.
- Maximova, S. N., Alemanno, L., Young, A., Ferriere, N., Traore, A., & Gultinan, M. J. (2002a). Efficiency, genotypic variability, and cellular origin of primary and secondary somatic embryogenesis of *Theobroma cacao* L. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 38(3), 252–259. <https://doi.org/10.1079/IVP2001257>
- Maximova, S. N., Alemanno, L., Young, A., Ferriere, N., Traore, A., & Gultinan, M. J. (2002b). Efficiency, genotypic variability, and cellular origin of primary and secondary somatic embryogenesis of *Theobroma cacao* L. *In Vitro Cellular &*

- Developmental Biology - Plant*, 38, 252–259. <https://doi.org/10.1079/IVP2001257>
- Maximova, S. N., Miller, C. R., Antúnez de Mayolo, G., Pishak, S., Young, A., & Gultinan, M. J. (2003). Stable transformation of *Theobroma cacao* L. and influence of matrix attachment regions on GFP expression. *Plant Cell Reports*, 21(9), 872–883. <https://doi.org/10.1007/s00299-003-0596-7>
- Maximova, S. N., Young, A., Pishak, S., & Gultinan, M. J. (2008). Field performance of *Theobroma cacao* L. plants propagated via somatic embryogenesis. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 44, 487–493. <https://doi.org/10.1007/s11627-008-9130-5>
- Maximova, S., Young, A., Pishak, S., Miller, C., Traore, A., & Gultinan, M. J. (2005). Integrated system for propagation of theobroma cacao. *Forestry Sciences*, 77, 1–14. <https://doi.org/10.1007/1-4020-2985-3>
- Minyaka, E., Nimeenak, N., Fotso, Sangara, A., & Ndoumuo, D. (2008). Effect of MgSO<sub>4</sub> and K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> on somatic embryo differentiation in *Theobroma cacao* L. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 94, 149–160. <https://doi.org/10.1007/s11240-008-9398-5>
- Ndoumou, D. O., Ndzomo, G. ., & Niemenak, N. (1997). Phenol content, acidic peroxidase and IAA-oxidase during somatic embryogenesis in *Theobroma cacao* L. *Biologia Plantarum*, 39, 337–347. <https://doi.org/https://doi.org/10.1023/A:1001041222799>
- Paredes, J., Canals, M., González, A., & Ventura, M. (2003). Evaluación de sustratos en el enraizamiento de estacas de cacao (*Theobroma cacao* L.). In *14th International Cocoa Research Conference Ghana 2003* (pp. 497–400).
- Quiroz-Figueroa, F., Mendez-Zeel, M., Larque-Saavedra, A., & Layola-Vargas. (2001). Picomolar concentrations of salicylates induce cellular growth and enhance somatic embryogenesis in *Coffea arabica* tissue culture. *Plant Cell Reports*, 20, 679–684.
- Sánchez, K., Cabrera, R., & Jiménez, J. (2019). Induction of somatic embryogenesis from

- foliar explants in three varieties of coffee. *Scientia Agropecuaria*, 10(2), 259–264.  
<https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2019.02.11>
- Solano, W. (2008). *Embriogénesis Somática En Clones Superiores De Cacao (Theobroma Cacao L.) Obtenidos En El Programa De Mejoramiento Genético Del Catie*. Centro Agronomico Tropical de Investigacion y Enseñanza.
- Tan, C. ., & Furtek, D. . (2003). Development of an in vitro regeneration system for Theobroma cacao from mature tissues. *Plant Science*, 164(3), 407–412.  
[https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(02\)00428-4](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(02)00428-4)
- Traore, A., & Gultinan, M. J. (2006). Effects of carbon source and explant type on somatic embryogenesis of four cacao genotypes. *HortScience*, 41(3), 753–758.  
<https://doi.org/10.21273/hortsci.41.3.753>
- Traore, A., Maximova, S. N., & Gultinan, M. J. (2003). Micropropagation of Theobroma cacao L. using somatic embryo-derived plants. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 39(3), 332–337. <https://doi.org/10.1079/IVP2002409>
- UNODC/DEVIDA. (2014). *Paquete tecnológico del cultivo del cacao*. Lima: Devida.
- Urrea, A. I., Atehortúa, L., & Gallego, A. M. (2011). Regeneración vía embriogénesis somática de una variedad colombiana élite de Theobroma cacao L. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 13(2), 39–50. Retrieved from <https://revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/27916/38317>
- Zarrillo, S., Gaikwad, N., Lanaud, C., Powis, T., Viot, C., Lesur, I., ... Valdez, F. (2018). The use and domestication of Theobroma cacao during the mid-Holocene in the upper Amazon. *Nature Ecology and Evolution*, 2(12), 1879–1888.  
<https://doi.org/10.1038/s41559-018-0697-x>

## VIII. ANEXOS

### ANEXO 1: Cuadros de análisis de varianza

**Tabla 4:** Análisis de varianza para el porcentaje de callogénesis en los periodos PCG y SCG.

	Callogénesis PCG		Callogénesis SCG	
	F	p-valor	F	p-valor
<b>Genotipo</b>	3.58	0.0029	4.68	0.00001
<b>[TDZ]</b>	38.42	<0.0001	1.85	0.1663
<b>Gen*[TDZ]</b>	2.07	0.0064	2.32	0.0019

**Tabla 5:** Análisis de varianza para el índice de callo durante todas las etapas de cultivo.

	PCG		SCG		ED1		ED2		ED3		ED4		ED5	
	F	P-valor	F	P-valor	F	P-valor	F	P-valor	F	P-valor	F	P-valor	F	P-valor
<b>Genotipo</b>	5.71	<0.0001	3.97	0.001	4.75	0.0002	5.21	0.0001	5.14	0.0001	5.42	0.0001	5.74	<0.0001
<b>[TDZ]</b>	86.24	<0.0001	2.54	0.0865	1.7	0.1908	1.68	0.1942	1.43	0.2456	1.29	0.2816	1.19	0.3108
<b>Gen*[TDZ]</b>	9.47	<0.0001	2.47	0.0037	2.75	0.0014	2.9	0.0008	2.72	0.0015	2.82	0.0011	2.9	0.0008

**Tabla 6:** Análisis de varianza para Índice de formación de callo en cada uno de los periodos de cultivo en medio ED.

Tratamiento	ED1	ED2	ED3	ED4	ED5
<b>2</b>	24.00b	26.00b	28.00b	28.00b	28.00b
<b>3</b>	49.00b	49.00b	49.00b	49.00b	49.00b
<b>4</b>	110.67a	112.33a	120.33a	120.67a	121.33a
<b>5</b>	149.00a	152.33a	155.67a	156.00a	156.00a
<b>6</b>	123.67a	131.33a	132.00a	132.00a	132.00a
<b>7</b>	121.67a	130.33a	133.67a	134.67a	140.00a
<b>8</b>	126.50a	132.00a	136.00a	142.00a	149.00a
<b>9</b>	128.00a	131.00a	146.00a	146.33a	154.00a
<b>10</b>	73.00b	80.00b	80.00b	80.00b	80.00b
<b>11</b>	94.00b	130.00a	134.00a	133.00a	133.00a
<b>12</b>	125.00a	130.00a	132.00a	130.00a	130.00a
<b>13</b>	93.67b	96.67b	99.00b	100.33b	102.00b
<b>14</b>	141.67a	145.67a	148.00a	151.33a	151.67a
<b>15</b>	139.67a	142.00a	144.67a	147.33a	148.00a

16	97.00b	105.33b	115.67a	125.00a	128.67a
17	139.00a	143.00a	146.67a	154.33a	157.33a
18	120.00a	121.50a	126.00a	126.5a	126.50a
19	133.67a	135.33a	137.33a	141.33a	141.67a
20	98.33b	101.67b	104.00b	105.67b	105.67b
21	128.33a	133.67a	134.00a	134.67a	135.67a
22	89.00b	90.67b	91.67b	92.33b	92.33b
23	116.00a	118.33a	118.33a	118.67a	119.33a
24	48.00b	48.67b	49.33b	49.33.00b	49.33.00b
25	80.00b	84.00b	85.33b	88.00b	88.00b
26	116.67a	119.67a	126.33a	128.33a	129.00a
27	126.33a	130.33a	137.67a	139.33a	139.33a
28	64.50b	65.00b	65.00b	70.00b	70.00b
29	77.50b	77.00b	77.50b	79.00b	79.00b
30	96.50b	98.00b	100.00b	101.50b	101.50b
	F=2.75	F=2.9	F=2.72	F=2.82	F=2.9
	p=0.0014	p=0.0008	P=0.0015	P=0.0011	p=0.0008

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

**ANEXO 2:** Frecuencias absolutas y relativas de coloración de los callos en cada etapa de cultivo.

**Tabla 7:** Frecuencias de coloración de callos a los 14 días de cultivo (medio PCG).

Genotipo	[TDZ]	Trat.	PCG							
			Cristalino		Cremoso		Oscuro		Combinado	
			Abs	Rel	Abs	Rel	Abs	Rel	Abs	Rel
I06	10-TDZ	2	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%
I06	20-TDZ	3	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%
I11	0-TDZ	4	2	67%	1	33%	0	0%	0	0%
I11	10-TDZ	5	24	33%	49	67%	0	0%	0	0%
I11	20-TDZ	6	14	21%	52	79%	0	0%	0	0%
I14	0-TDZ	7	26	39%	37	56%	0	0%	3	5%
I14	10-TDZ	8	17	38%	28	62%	0	0%	0	0%
I14	20-TDZ	9	18	25%	53	75%	0	0%	0	0%
I32	0-TDZ	10	6	100%	0	0%	0	0%	0	0%
I32	10-TDZ	11	2	9%	20	91%	0	0%	0	0%
I32	20-TDZ	12	1	5%	21	95%	0	0%	0	0%

I52	0-TDZ	13	16	94%	1	6%	0	0%	0	0%
I52	10-TDZ	14	32	46%	38	54%	0	0%	0	0%
I52	20-TDZ	15	43	64%	24	36%	0	0%	0	0%
I53	0-TDZ	16	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%
I53	10-TDZ	17	44	61%	28	39%	0	0%	0	0%
I53	20-TDZ	18	11	30%	26	70%	0	0%	0	0%
I63	0-TDZ	19	31	100%	0	0%	0	0%	0	0%
I63	10-TDZ	20	37	74%	13	26%	0	0%	0	0%
I63	20-TDZ	21	46	71%	19	29%	0	0%	0	0%
I64	0-TDZ	22	7	100%	0	0%	0	0%	0	0%
I64	10-TDZ	23	50	94%	3	6%	0	0%	0	0%
I64	20-TDZ	24	18	86%	3	14%	0	0%	0	0%
I66	0-TDZ	25	4	100%	0	0%	0	0%	0	0%
I66	10-TDZ	26	31	56%	20	36%	4	7%	0	0%
I66	20-TDZ	27	36	60%	24	40%	0	0%	0	0%
I70	0-TDZ	28	14	82%	3	18%	0	0%	0	0%
I70	10-TDZ	29	19	83%	4	17%	0	0%	0	0%
I70	20-TDZ	30	16	55%	13	45%	0	0%	0	0

**Tabla 8:** Frecuencias de coloración de callos a los 28 días de cultivo (medio SCG).

SCG										
Genotipo	[TDZ]	Trat.	Cristalino		Cremoso		Oscuro		Combinado	
			Abs	Rel	Abs	Rel	Abs	Rel	Abs	Rel
I06	10-TDZ	2	5	100%	0	0%	0	0%	0	0%
I06	20-TDZ	3	9	90%	1	10%	0	0%	0	0%
I11	0-TDZ	4	53	87%	2	3%	6	10%	0	0%
I11	10-TDZ	5	5	7%	23	31%	34	46%	12	16%
I11	20-TDZ	6	12	18%	24	36%	19	29%	11	17%
I14	0-TDZ	7	12	18%	24	35%	27	40%	5	7%
I14	10-TDZ	8	4	9%	22	49%	14	31%	5	11%
I14	20-TDZ	9	16	23%	34	48%	15	21%	6	8%
I32	0-TDZ	10	3	21%	9	64%	0	0%	2	14%
I32	10-TDZ	11	5	23%	10	45%	0	0%	7	32%
I32	20-TDZ	12	13	59%	5	23%	3	14%	1	5%
I52	0-TDZ	13	30	60%	14	28%	6	12%	0	0%
I52	10-TDZ	14	9	13%	28	39%	12	17%	22	31%
I52	20-TDZ	15	36	51%	20	29%	5	7%	9	13%
I53	0-TDZ	16	17	28%	43	72%	0	0%	0	0%
I53	10-TDZ	17	2	3%	49	65%	18	24%	6	8%

<b>I53</b>	<b>20-TDZ</b>	<b>18</b>	4	10%	21	53%	6	15%	9	23%
<b>I63</b>	<b>0-TDZ</b>	<b>19</b>	2	3%	59	83%	9	13%	1	1%
<b>I63</b>	<b>10-TDZ</b>	<b>20</b>	14	28%	30	60%	0	0%	6	12%
<b>I63</b>	<b>20-TDZ</b>	<b>21</b>	13	20%	36	55%	13	20%	3	5%
<b>I64</b>	<b>0-TDZ</b>	<b>22</b>	5	11%	41	87%	1	2%	0	0%
<b>I64</b>	<b>10-TDZ</b>	<b>23</b>	43	73%	13	22%	0	0%	3	5%
<b>I64</b>	<b>20-TDZ</b>	<b>24</b>	18	72%	6	24%	1	4%	0	0%
<b>I66</b>	<b>0-TDZ</b>	<b>25</b>	16	37%	27	63%	0	0%	0	0%
<b>I66</b>	<b>10-TDZ</b>	<b>26</b>	23	39%	18	31%	5	8%	13	22%
<b>I66</b>	<b>20-TDZ</b>	<b>27</b>	30	48%	17	27%	2	3%	14	22%
<b>I70</b>	<b>0-TDZ</b>	<b>28</b>	12	52%	4	17%	7	30%	0	0%
<b>I70</b>	<b>10-TDZ</b>	<b>29</b>	11	42%	2	8%	7	27%	6	23%
<b>I70</b>	<b>20-TDZ</b>	<b>30</b>	16	52%	2	6%	5	16%	8	26%

**Tabla 9:** Frecuencias de coloración de callos a los 42 días de cultivo (medio ED1).

Genotipo	[TDZ]	Trat.	ED1							
			Cristalino		Cremoso		Oscuro		Combinado	
			Abs	Rel	Abs	Rel	Abs	Rel	Abs	Rel
<b>I06</b>	<b>10-TDZ</b>	<b>2</b>	1	20%	2	40%	1	20%	1	20%
<b>I06</b>	<b>20-TDZ</b>	<b>3</b>	1	10%	5	50%	2	20%	2	20%
<b>I11</b>	<b>0-TDZ</b>	<b>4</b>	10	16%	38	62%	9	15%	4	7%
<b>I11</b>	<b>10-TDZ</b>	<b>5</b>	2	3%	10	14%	23	31%	39	53%
<b>I11</b>	<b>20-TDZ</b>	<b>6</b>	7	11%	16	24%	11	17%	32	48%
<b>I14</b>	<b>0-TDZ</b>	<b>7</b>	12	18%	20	29%	31	46%	5	7%
<b>I14</b>	<b>10-TDZ</b>	<b>8</b>	5	11%	19	42%	15	33%	6	13%
<b>I14</b>	<b>20-TDZ</b>	<b>9</b>	16	23%	34	48%	15	21%	6	8%
<b>I32</b>	<b>0-TDZ</b>	<b>10</b>	2	14%	10	71%	2	14%	0	0%
<b>I32</b>	<b>10-TDZ</b>	<b>11</b>	0	0%	1	5%	9	41%	12	55%
<b>I32</b>	<b>20-TDZ</b>	<b>12</b>	0	0%	17	77%	3	14%	2	9%
<b>I52</b>	<b>0-TDZ</b>	<b>13</b>	7	14%	9	18%	13	26%	21	42%
<b>I52</b>	<b>10-TDZ</b>	<b>14</b>	1	1%	1	1%	23	32%	46	65%
<b>I52</b>	<b>20-TDZ</b>	<b>15</b>	7	10%	14	20%	17	24%	32	46%



<b>I53</b>	<b>0-TDZ</b>	<b>16</b>	10	17%	40	67%	10	17%	0	0%
<b>I53</b>	<b>10-TDZ</b>	<b>17</b>	0	0%	37	49%	38	51%	0	0%
<b>I53</b>	<b>20-TDZ</b>	<b>18</b>	0	0%	8	20%	18	45%	14	35%
<b>I63</b>	<b>0-TDZ</b>	<b>19</b>	0	0%	44	62%	17	24%	10	14%
<b>I63</b>	<b>10-TDZ</b>	<b>20</b>	3	6%	17	34%	15	30%	15	30%
<b>I63</b>	<b>20-TDZ</b>	<b>21</b>	8	12%	33	51%	21	32%	3	5%
<b>I64</b>	<b>0-TDZ</b>	<b>22</b>	2	4%	17	36%	12	26%	16	34%
<b>I64</b>	<b>10-TDZ</b>	<b>23</b>	32	54%	10	17%	4	7%	13	22%
<b>I64</b>	<b>20-TDZ</b>	<b>24</b>	6	24%	7	28%	5	20%	7	28%
<b>I66</b>	<b>0-TDZ</b>	<b>25</b>	12	28%	8	19%	13	30%	10	23%
<b>I66</b>	<b>10-TDZ</b>	<b>26</b>	17	29%	14	24%	12	20%	16	27%
<b>I66</b>	<b>20-TDZ</b>	<b>27</b>	15	24%	20	32%	4	6%	24	38%
<b>I70</b>	<b>0-TDZ</b>	<b>28</b>	12	52%	6	26%	4	17%	1	4%
<b>I70</b>	<b>10-TDZ</b>	<b>29</b>	6	23%	4	15%	2	8%	14	54%
<b>I70</b>	<b>20-TDZ</b>	<b>30</b>	6	19%	8	26%	6	19%	11	35%

**Tabla 10:** Frecuencias de coloración de callos a los 56 días de cultivo (medio ED2).

Genotipo	[TDZ]	Trat.	ED2							
			Cristalino		Cremoso		Oscuro		Combinado	
			Abs	Rel	Abs	Rel	Abs	Rel	Abs	Rel
<b>I06</b>	<b>10-TDZ</b>	<b>2</b>	0	0%	3	60%	2	40%	0	0%
<b>I06</b>	<b>20-TDZ</b>	<b>3</b>	0	0%	7	70%	3	30%	0	0%
<b>I11</b>	<b>0-TDZ</b>	<b>4</b>	6	10%	19	31%	24	39%	12	20%
<b>I11</b>	<b>10-TDZ</b>	<b>5</b>	1	1%	6	8%	27	36%	40	54%
<b>I11</b>	<b>20-TDZ</b>	<b>6</b>	9	14%	3	5%	7	11%	47	71%
<b>I14</b>	<b>0-TDZ</b>	<b>7</b>	18	26%	5	7%	43	63%	2	3%
<b>I14</b>	<b>10-TDZ</b>	<b>8</b>	11	24%	3	7%	28	62%	3	7%
<b>I14</b>	<b>20-TDZ</b>	<b>9</b>	12	17%	9	13%	42	59%	8	11%
<b>I32</b>	<b>0-TDZ</b>	<b>10</b>	2	14%	8	57%	4	29%	0	0%
<b>I32</b>	<b>10-TDZ</b>	<b>11</b>	0	0%	1	5%	9	41%	12	55%
<b>I32</b>	<b>20-TDZ</b>	<b>12</b>	1	5%	3	14%	16	73%	2	9%
<b>I52</b>	<b>0-TDZ</b>	<b>13</b>	2	4%	4	8%	21	42%	23	46%
<b>I52</b>	<b>10-TDZ</b>	<b>14</b>	1	1%	0	0%	20	28%	50	70%

<b>I52</b>	<b>20-TDZ</b>	<b>15</b>	0	0%	0	0%	9	13%	61	87%
<b>I53</b>	<b>0-TDZ</b>	<b>16</b>	6	10%	9	15%	45	75%	0	0%
<b>I53</b>	<b>10-TDZ</b>	<b>17</b>	0	0%	22	29%	52	69%	1	1%
<b>I53</b>	<b>20-TDZ</b>	<b>18</b>	0	0%	0	0%	26	65%	14	35%
<b>I63</b>	<b>0-TDZ</b>	<b>19</b>	2	3%	28	39%	15	21%	26	37%
<b>I63</b>	<b>10-TDZ</b>	<b>20</b>	2	4%	11	22%	17	34%	20	40%
<b>I63</b>	<b>20-TDZ</b>	<b>21</b>	0	0%	11	17%	31	48%	23	35%
<b>I64</b>	<b>0-TDZ</b>	<b>22</b>	0	0%	6	13%	23	49%	18	38%
<b>I64</b>	<b>10-TDZ</b>	<b>23</b>	22	37%	11	19%	4	7%	22	37%
<b>I64</b>	<b>20-TDZ</b>	<b>24</b>	0	0%	4	16%	8	32%	13	52%
<b>I66</b>	<b>0-TDZ</b>	<b>25</b>	5	12%	6	14%	18	42%	14	33%
<b>I66</b>	<b>10-TDZ</b>	<b>26</b>	19	32%	4	7%	13	22%	23	39%
<b>I66</b>	<b>20-TDZ</b>	<b>27</b>	14	22%	14	22%	10	16%	25	40%
<b>I70</b>	<b>0-TDZ</b>	<b>28</b>	0	0%	4	17%	7	30%	12	52%
<b>I70</b>	<b>10-TDZ</b>	<b>29</b>	4	15%	0	0%	2	8%	20	77%
<b>I70</b>	<b>20-TDZ</b>	<b>30</b>	0	0%	3	10%	12	39%	16	52%

**Tabla 11:** Frecuencias de coloración de callos a los 70 días de cultivo (medio ED3).

Genotipo	[TDZ]	Trat.	ED3							
			Cristalino		Cremoso		Oscuro		Combinado	
			Abs	Rel	Abs	Rel	Abs	Rel	Abs	Rel
<b>I06</b>	<b>10-TDZ</b>	<b>2</b>	0	0%	2	40%	1	20%	2	40%
<b>I06</b>	<b>20-TDZ</b>	<b>3</b>	0	0%	2	20%	4	40%	4	40%
<b>I11</b>	<b>0-TDZ</b>	<b>4</b>	0	0%	2	3%	28	46%	31	51%
<b>I11</b>	<b>10-TDZ</b>	<b>5</b>	1	1%	1	1%	37	50%	35	47%
<b>I11</b>	<b>20-TDZ</b>	<b>6</b>	3	5%	0	0%	11	17%	52	79%
<b>I14</b>	<b>0-TDZ</b>	<b>7</b>	8	12%	20	29%	40	59%	0	0%
<b>I14</b>	<b>10-TDZ</b>	<b>8</b>	1	2%	17	38%	22	49%	5	11%
<b>I14</b>	<b>20-TDZ</b>	<b>9</b>	11	15%	16	23%	44	62%	0	0%
<b>I32</b>	<b>0-TDZ</b>	<b>10</b>	1	7%	2	14%	5	36%	6	43%
<b>I32</b>	<b>10-TDZ</b>	<b>11</b>	0	0%	0	0%	7	32%	15	68%
<b>I32</b>	<b>20-TDZ</b>	<b>12</b>	0	0%	0	0%	14	64%	8	36%
<b>I52</b>	<b>0-TDZ</b>	<b>13</b>	2	4%	4	8%	22	44%	22	44%

<b>I52</b>	<b>10-TDZ</b>	<b>14</b>	<b>1</b>	<b>1%</b>	<b>0</b>	<b>0%</b>	<b>22</b>	<b>31%</b>	<b>48</b>	<b>68%</b>
<b>I52</b>	<b>20-TDZ</b>	<b>15</b>	<b>0</b>	<b>0%</b>	<b>0</b>	<b>0%</b>	<b>9</b>	<b>13%</b>	<b>61</b>	<b>87%</b>
<b>I53</b>	<b>0-TDZ</b>	<b>16</b>	<b>0</b>	<b>0%</b>	<b>0</b>	<b>0%</b>	<b>60</b>	<b>100%</b>	<b>0</b>	<b>0%</b>
<b>I53</b>	<b>10-TDZ</b>	<b>17</b>	<b>0</b>	<b>0%</b>	<b>0</b>	<b>0%</b>	<b>75</b>	<b>100%</b>	<b>0</b>	<b>0%</b>
<b>I53</b>	<b>20-TDZ</b>	<b>18</b>	<b>0</b>	<b>0%</b>	<b>0</b>	<b>0%</b>	<b>24</b>	<b>60%</b>	<b>16</b>	<b>40%</b>
<b>I63</b>	<b>0-TDZ</b>	<b>19</b>	<b>0</b>	<b>0%</b>	<b>4</b>	<b>6%</b>	<b>31</b>	<b>44%</b>	<b>36</b>	<b>51%</b>
<b>I63</b>	<b>10-TDZ</b>	<b>20</b>	<b>2</b>	<b>4%</b>	<b>1</b>	<b>2%</b>	<b>20</b>	<b>40%</b>	<b>27</b>	<b>54%</b>
<b>I63</b>	<b>20-TDZ</b>	<b>21</b>	<b>0</b>	<b>0%</b>	<b>1</b>	<b>2%</b>	<b>38</b>	<b>58%</b>	<b>26</b>	<b>40%</b>
<b>I64</b>	<b>0-TDZ</b>	<b>22</b>	<b>0</b>	<b>0%</b>	<b>0</b>	<b>0%</b>	<b>30</b>	<b>64%</b>	<b>17</b>	<b>36%</b>
<b>I64</b>	<b>10-TDZ</b>	<b>23</b>	<b>0</b>	<b>0%</b>	<b>0</b>	<b>0%</b>	<b>24</b>	<b>41%</b>	<b>35</b>	<b>59%</b>
<b>I64</b>	<b>20-TDZ</b>	<b>24</b>	<b>0</b>	<b>0%</b>	<b>2</b>	<b>8%</b>	<b>7</b>	<b>28%</b>	<b>16</b>	<b>64%</b>
<b>I66</b>	<b>0-TDZ</b>	<b>25</b>	<b>0</b>	<b>0%</b>	<b>4</b>	<b>9%</b>	<b>26</b>	<b>60%</b>	<b>13</b>	<b>30%</b>
<b>I66</b>	<b>10-TDZ</b>	<b>26</b>	<b>7</b>	<b>12%</b>	<b>5</b>	<b>8%</b>	<b>18</b>	<b>31%</b>	<b>29</b>	<b>49%</b>
<b>I66</b>	<b>20-TDZ</b>	<b>27</b>	<b>0</b>	<b>0%</b>	<b>1</b>	<b>2%</b>	<b>36</b>	<b>57%</b>	<b>26</b>	<b>41%</b>
<b>I70</b>	<b>0-TDZ</b>	<b>28</b>	<b>0</b>	<b>0%</b>	<b>4</b>	<b>17%</b>	<b>7</b>	<b>30%</b>	<b>12</b>	<b>52%</b>
<b>I70</b>	<b>10-TDZ</b>	<b>29</b>	<b>4</b>	<b>15%</b>	<b>0</b>	<b>0%</b>	<b>2</b>	<b>8%</b>	<b>20</b>	<b>77%</b>
<b>I70</b>	<b>20-TDZ</b>	<b>30</b>	<b>0</b>	<b>0%</b>	<b>3</b>	<b>10%</b>	<b>12</b>	<b>39%</b>	<b>16</b>	<b>52%</b>

**Tabla 12:** Frecuencias de coloración de callos a los 84 días de cultivo (medio ED4).

<b>ED4</b>										
<b>Genotipo</b>	<b>[TDZ]</b>	<b>Trat.</b>	<b>Cristalino</b>		<b>Cremoso</b>		<b>Oscuro</b>		<b>Combinado</b>	
			<b>Abs</b>	<b>Rel</b>	<b>Abs</b>	<b>Rel</b>	<b>Abs</b>	<b>Rel</b>	<b>Abs</b>	<b>Rel</b>
<b>I06</b>	<b>10-TDZ</b>	<b>2</b>	<b>0</b>	<b>0%</b>	<b>3</b>	<b>60%</b>	<b>2</b>	<b>40%</b>	<b>0</b>	<b>0%</b>
<b>I06</b>	<b>20-TDZ</b>	<b>3</b>	<b>0</b>	<b>0%</b>	<b>5</b>	<b>50%</b>	<b>5</b>	<b>50%</b>	<b>0</b>	<b>0%</b>
<b>I11</b>	<b>0-TDZ</b>	<b>4</b>	<b>6</b>	<b>10%</b>	<b>19</b>	<b>31%</b>	<b>24</b>	<b>39%</b>	<b>12</b>	<b>20%</b>
<b>I11</b>	<b>10-TDZ</b>	<b>5</b>	<b>1</b>	<b>1%</b>	<b>6</b>	<b>8%</b>	<b>27</b>	<b>36%</b>	<b>40</b>	<b>54%</b>
<b>I11</b>	<b>20-TDZ</b>	<b>6</b>	<b>9</b>	<b>14%</b>	<b>3</b>	<b>5%</b>	<b>7</b>	<b>11%</b>	<b>47</b>	<b>71%</b>
<b>I14</b>	<b>0-TDZ</b>	<b>7</b>	<b>6</b>	<b>9%</b>	<b>16</b>	<b>24%</b>	<b>37</b>	<b>54%</b>	<b>9</b>	<b>13%</b>
<b>I14</b>	<b>10-TDZ</b>	<b>8</b>	<b>2</b>	<b>4%</b>	<b>13</b>	<b>29%</b>	<b>23</b>	<b>51%</b>	<b>7</b>	<b>16%</b>
<b>I14</b>	<b>20-TDZ</b>	<b>9</b>	<b>9</b>	<b>13%</b>	<b>16</b>	<b>23%</b>	<b>39</b>	<b>55%</b>	<b>7</b>	<b>10%</b>
<b>I32</b>	<b>0-TDZ</b>	<b>10</b>	<b>2</b>	<b>14%</b>	<b>8</b>	<b>57%</b>	<b>4</b>	<b>29%</b>	<b>0</b>	<b>0%</b>
<b>I32</b>	<b>10-TDZ</b>	<b>11</b>	<b>0</b>	<b>0%</b>	<b>1</b>	<b>5%</b>	<b>9</b>	<b>41%</b>	<b>12</b>	<b>55%</b>
<b>I32</b>	<b>20-TDZ</b>	<b>12</b>	<b>1</b>	<b>5%</b>	<b>3</b>	<b>14%</b>	<b>16</b>	<b>73%</b>	<b>2</b>	<b>9%</b>

I52	0-TDZ	13	2	4%	5	10%	33	66%	10	20%
I52	10-TDZ	14	0	0%	0	0%	28	39%	43	61%
I52	20-TDZ	15	0	0%	3	4%	19	27%	48	69%
I53	0-TDZ	16	0	0%	0	0%	60	100%	0	0%
I53	10-TDZ	17	0	0%	0	0%	75	100%	0	0%
I53	20-TDZ	18	0	0%	0	0%	27	68%	13	33%
I63	0-TDZ	19	0	0%	4	6%	31	44%	36	51%
I63	10-TDZ	20	2	4%	1	2%	27	54%	20	40%
I63	20-TDZ	21	3	5%	8	12%	39	60%	15	23%
I64	0-TDZ	22	0	0%	0	0%	41	87%	6	13%
I64	10-TDZ	23	0	0%	0	0%	26	44%	33	56%
I64	20-TDZ	24	1	4%	2	8%	11	44%	11	44%
I66	0-TDZ	25	0	0%	7	16%	29	67%	7	16%
I66	10-TDZ	26	5	8%	12	20%	23	39%	19	32%
I66	20-TDZ	27	0	0%	3	5%	38	60%	22	35%
I70	0-TDZ	28	0	0%	2	9%	7	30%	14	61%
I70	10-TDZ	29	1	4%	6	23%	12	46%	7	27%
I70	20-TDZ	30	1	3%	13	42%	11	35%	6	19%

**Tabla 13:** Frecuencias de coloración de callos a los 98 días de cultivo (medio ED5).

ED5										
Genotipo	[TDZ]	Trat.	Cristalino		Cremoso		Oscuro		Combinado	
			Abs	Rel	Abs	Rel	Abs	Rel	Abs	Rel
I06	10-TDZ	2	0	0%	3	60%	2	40%	0	0%
I06	20-TDZ	3	0	0%	5	50%	5	50%	0	0%
I11	0-TDZ	4	6	10%	19	31%	24	39%	12	20%
I11	10-TDZ	5	1	1%	6	8%	27	36%	40	54%
I11	20-TDZ	6	9	14%	3	5%	7	11%	47	71%
I14	0-TDZ	7	6	9%	5	7%	47	69%	10	15%
I14	10-TDZ	8	2	4%	23	51%	13	29%	7	16%
I14	20-TDZ	9	7	10%	1	1%	52	73%	11	15%
I32	0-TDZ	10	2	14%	8	57%	4	29%	0	0%
I32	10-TDZ	11	0	0%	1	5%	9	41%	12	55%

<b>I32</b>	<b>20-TDZ</b>	<b>12</b>	1	5%	3	14%	16	73%	2	9%
<b>I52</b>	<b>0-TDZ</b>	<b>13</b>	1	2%	5	10%	33	66%	11	22%
<b>I52</b>	<b>10-TDZ</b>	<b>14</b>	0	0%	0	0%	31	44%	40	56%
<b>I52</b>	<b>20-TDZ</b>	<b>15</b>	1	1%	3	4%	23	33%	43	61%
<b>I53</b>	<b>0-TDZ</b>	<b>16</b>	0	0%	0	0%	60	100%	0	0%
<b>I53</b>	<b>10-TDZ</b>	<b>17</b>	0	0%	0	0%	75	100%	0	0%
<b>I53</b>	<b>20-TDZ</b>	<b>18</b>	0	0%	0	0%	29	73%	11	28%
<b>I63</b>	<b>0-TDZ</b>	<b>19</b>	0	0%	7	10%	35	49%	29	41%
<b>I63</b>	<b>10-TDZ</b>	<b>20</b>	2	4%	1	2%	27	54%	20	40%
<b>I63</b>	<b>20-TDZ</b>	<b>21</b>	3	5%	8	12%	42	65%	12	18%
<b>I64</b>	<b>0-TDZ</b>	<b>22</b>	0	0%	0	0%	42	89%	5	11%
<b>I64</b>	<b>10-TDZ</b>	<b>23</b>	0	0%	0	0%	26	44%	33	56%
<b>I64</b>	<b>20-TDZ</b>	<b>24</b>	1	4%	2	8%	18	72%	4	16%
<b>I66</b>	<b>0-TDZ</b>	<b>25</b>	0	0%	6	14%	29	67%	8	19%
<b>I66</b>	<b>10-TDZ</b>	<b>26</b>	5	8%	12	20%	23	39%	19	32%
<b>I66</b>	<b>20-TDZ</b>	<b>27</b>	0	0%	3	5%	38	60%	22	35%
<b>I70</b>	<b>0-TDZ</b>	<b>28</b>	0	0%	2	9%	7	30%	14	61%
<b>I70</b>	<b>10-TDZ</b>	<b>29</b>	1	4%	6	23%	12	46%	7	27%
<b>I70</b>	<b>20-TDZ</b>	<b>30</b>	1	3%	13	42%	14	45%	3	10%

**ANEXO 3:** Respuesta embriogénica de los tratamientos responsivos.

**Tabla 14:** Frecuencia embriogénica en 5 genotipos de cacao durante el periodo de cultivo en medio de expresión de la embriogénesis.

Genotipo	[TDZ]	Trat	ED1		ED2		ED3		ED4		ED5	
			F.Rel	F. Abs	F.Rel	F. Abs	F.Rel	F. Abs	F.Rel	F. Abs	F.Rel	F. Abs
<b>I52</b>	<b>10-TDZ</b>	<b>14</b>	0.00%	0.00	7.14%	5.00	11.43%	8.00	12.86%	9.00	14.29%	10.00
<b>I52</b>	<b>20-TDZ</b>	<b>15</b>	4.29%	3.00	14.29%	10.00	17.14%	12.00	18.57%	13.00	20.00%	14.00
<b>I53</b>	<b>10-TDZ</b>	<b>17</b>	4.00%	3.00	6.67%	5.00	12.00%	9.00	13.33%	10.00	13.33%	10.00
<b>I53</b>	<b>20-TDZ</b>	<b>18</b>	5.00%	2.00	10.00%	4.00	10.00%	4.00	10.00%	4.00	10.00%	4.00
<b>I64</b>	<b>10-TDZ</b>	<b>23</b>	0.00%	0.00	1.69%	1.00	1.69%	1.00	1.69%	1.00	1.69%	1.00
<b>I64</b>	<b>20-TDZ</b>	<b>24</b>	0.00%	0.00	0.00%	0.00	4.00%	1.00	4.00%	1.00	4.00%	1.00
<b>I66</b>	<b>20-TDZ</b>	<b>27</b>	0.00%	0.00	0.00%	0.00	1.59%	1.00	3.17%	2.00	3.17%	2.00
<b>I70</b>	<b>10-TDZ</b>	<b>29</b>	3.85%	1.00	7.69%	2.00	7.69%	2.00	7.69%	2.00	7.69%	2.00

