

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



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

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

**EVALUACIÓN DEL IMPACTO DE  
OSMORREGULADORES EN LA SINCRONIZACIÓN  
EMBRIONARIA DE CÉLULAS FRIABLES DE CACAO  
(*Theobroma cacao* L.)**

**Autora :  
Bach. Roxanita Paisic Ramirez**

**Asesor :  
Ing. M.Sc. Walter Daniel Sánchez Aguilar**

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

**Registro: (.....)**

**CHACHAPOYAS - PERÚ**

**2021**

## **DEDICATORIA**

**A Dios**, por proteger e iluminar siempre mi camino, por darme sabiduría, salud y paciencia para poder lograr con mis metas.

**A mis padres Manuel y María**, los motores y motivos de mi vida, los que me inspiran a superarme; por los valores inculcados, por el apoyo incondicional y constante durante todo este tiempo, por sus virtudes infinitas, y por ser mi ejemplo cada día.

**A mi mamita Escolástica**, que me acompañó durante todo este tiempo, la que estuvo conmigo en todo momento, apoyándome, inculcándome valores, y que hoy en día desde el Cielo, me protege, y sigue siendo mi mayor inspiración para seguir a delante.

**A mis familiares y amigos**, por haber estado conmigo durante toda esta etapa universitaria y por su apoyo incondicional.

**Roxanita Paisic Ramirez**

## AGRADECIMIENTO

Agradecer a **Dios** por este gran logro, por brindarme salud, paciencia, fortaleza e inteligencia, para poder superar cada obstáculo que se presentó durante este proceso y por darme la oportunidad de cumplir con esta meta.

A mis padres **Manuel** y **María**, por su sacrificio y dedicación, para hacer posible este gran logro, por todo el amor que me brindan y por ser el pilar fundamental de mi vida.

A mis asesores, Ing. M. Sc Walter Daniel Sánchez Aguilar y PhD. Juan Carlos Guerrero Abad, por la oportunidad brindada, el apoyo durante todo este periodo y la confianza que tuvieron en mí para desarrollar este proyecto.

A mi alma mater la **Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza**, en especial a la Escuela Profesional de Ingeniería Agrónoma, de la facultad de Ingeniería y Ciencia Agrarias, por las experiencias y conocimientos adquiridos durante mi periodo de estudios.

Un agradecimiento especial al Instituto de Investigación, Innovación y Desarrollo para el Sector Agrario y Agroindustrial de la Región Amazonas (**IIDAA**), al proyecto “INNOVACIÓN BIOTECNOLÓGICA PARA LA PRODUCCIÓN MASIVA DE EMBRIONES SOMÁTICOS DE CACAO (*Theobroma cacao* L.) FINO DE AROMA EN LA REGIÓN AMAZONAS” con Resolución Rectoral N°286 – 2019-UNTRM/R, y a cada uno de los investigadores que lo conforman, por el apoyo financiero, moral y académico durante todo este periodo.

Un agradecimiento especial al CONCYTEC que a través de su unidad ejecutora FONDECYT apoyó con el financiamiento y monitoreo, para la ejecución del proyecto.

Al INDESCES por brindarme la disponibilidad de las instalaciones del Laboratorio de Fisiología y Biotecnología Vegetal (FISIOBVEG) en el área de Cultivos Vegetales para poder ejecutar mi proyecto de tesis, y a todos los que conforman esta área.

A mis Jurados, por el tiempo dedicado a la Tesis, en especial a la PhD. Magali, por siempre estar presta a ayudarme a resolver mis dudas y el apoyo brindado, y a la Ingeniera Carito, por toda la ayuda brindada.

A toda mi familia y amigos por todo el apoyo moral, en especial a mi Mamita Escolástica, Gladys y Carlos Torrejón, mi apoyo incondicional, quienes fueron la fuente de entrega e inspiración para lograr mis metas.

**Roxanita Paisic Ramirez**

**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**

**Dr. ERICK ALDO AUQUÍÑIVÍN SILVA  
DECANO DE LA FACULTAD  
DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGRARIAS**

## VISTO BUENO DEL ASESOR DE LA TESIS



**REGLAMENTO GENERAL**  
PARA EL OTORGAMIENTO DEL GRADO ACADÉMICO DE  
BACHILLER, MAÉSTRO O DOCTOR Y DEL TÍTULO PROFESIONAL

### ANEXO 3-K

#### VISTO BUENO DEL ASESOR DE TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL

El que suscribe el presente, docente de la UNTRM (X)/Profesional externo ( ), hace constar que ha asesorado la realización de la Tesis titulada "EVALUACIÓN DEL IMPACTO DE OSMORREGULADORES EN LA SINCRONIZACIÓN EMBRIONARIA DE CÉLULAS FRIABLES DE CACAO (Theobroma cacao L.)"; del egresado Bach. Roxanita Paisic Ramirez de la Facultad de Ingeniería y Ciencias Agrarias Escuela Profesional de Ingeniería Agrónoma de esta Casa Superior de Estudios.

El suscrito da el Visto Bueno a la Tesis mencionada, dándole pase para que sea sometida a la revisión por el Jurado Evaluador, comprometiéndose a supervisar el levantamiento de observaciones que formulen en Acta en conjunto, y estar presente en la sustentación.

Chachapoyas, 10 de Marzo de 2021

Firma y nombre completo del Asesor

Ms. C. Watter Daniel Sánchez Aguilar



VISTO BUENO DEL COASESOR DE LA TESIS



**REGLAMENTO GENERAL**  
PARA EL OTORGAMIENTO DEL GRADO ACADÉMICO DE  
BACHILLER, MAESTRO O DOCTOR Y DEL TÍTULO PROFESIONAL

ANEXO 3-K

VISTO BUENO DEL ASESOR DE TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL

El que suscribe el presente, docente de la UNTRM ( )/Profesional externo (X), hace constar que ha asesorado la realización de la Tesis titulada "EVALUACIÓN DEL IMPACTO DE OSMORREGULADORES EN LA SINCRONIZACIÓN EMBRIONARIA DE CÉLULAS FRIABLES DE CACAO (Theobroma cacao L.)"; del egresado Bach. Roxanita Paisic Ramirez de la Facultad de Ingeniería y Ciencias Agrarias Escuela Profesional de Ingeniería Agrónoma de esta Casa Superior de Estudios.

El suscrito da el Visto Bueno a la Tesis mencionada, dándole pase para que sea sometida a la revisión por el Jurado Evaluador, comprometiéndose a supervisar el levantamiento de observaciones que formulen en Acta en conjunto, y estar presente en la sustentación.



Chachapoyas, 09 de Marzo de 2021

Firma y nombre completo del Asesor

Ph. D. Juan Carlos Guerrero Abad

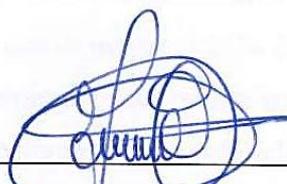
**JURADO EVALUADOR DE LA TESIS**



---

M.Sc. GUILLERMO IDROGO VÁSQUEZ

**PRESIDENTE**



---

Dr. SEGUNDO MANUEL OLIVA CRUZ

**SECRETARIO**



---

PhD. LIGIA MAGALI GARCÍA ROSERO

**VOCAL**

## CONSTANCIA DE ORIGINALIDAD DE LA TESIS



**UNTRM**

**RELAMENTO GENERAL  
PARA EL OTORGAMIENTO DEL GRADO ACADÉMICO  
DE BACHILLER, MAESTRO O Y DEL TÍTULO PROFESIONAL**

### ANEXO 3-0

#### CONSTANCIA DE ORIGINALIDAD DE LA TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL

Los suscritos miembros del jurado evaluador de la tesis titulada: “EVALUACIÓN DEL IMPACTO DE OSMORREGULADORES EN LA SINCRONIZACIÓN EMBRIONARIA DE CÉLULAS FRIABLES DE CACAO (*Theobroma cacao* L.)”, Presentada por la estudiante ( )/egresada (X) Roxanita Paisic Ramirez, de la escuela profesional de Ingeniería Agrónoma, con correo electrónico institucional [roxanita.paisic@untrm.edu.pe](mailto:roxanita.paisic@untrm.edu.pe)

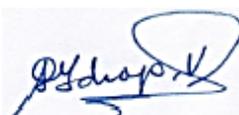
Después de revisar con el software Turnitin el contenido de la citada tesis, acordamos:

- La citada tesis tiene 12% de similitud según el reporte del software Turnitin que se adjunta a la presente, el que es menor ( ) / igual ( ) al 25% de similitud que es el máximo permitido en la UNTRM.
- La citada tesis tiene \_\_\_\_\_% de similitud según el reporte del software Turnitin que se adjunta a la presente, el que es mayor al 25% de similitud que es el máximo permitido en la UNTRM, por lo que el aspirante debe revisar su tesis para corregir la redacción de acuerdo al informe Turnitin que se adjunta a la presente debe presentar al presidente del jurado evaluador su Tesis corregida para nueva revisión con el Software Turnitin.



Chachapoyas 12 de Abril del 2021

  
M. Sc. Segundo Manuel Oliva Cruz  
DNI 05374749  
SECRETARIO

  
PRESIDENTE

  
VOCAL

OBSERVACIONES.....

# ACTA DE SUSTENTACIÓN DE LA TESIS



**REGLAMENTO GENERAL**  
PARA EL OTORGAMIENTO DEL GRADO ACADÉMICO DE  
BACHILLER, MAESTRO O DOCTOR Y DEL TÍTULO PROFESIONAL

## ANEXO 3-Q

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

En la ciudad de Chachapoyas, el día 06 de Mayo del año 2021, siendo las 17:00 horas, el aspirante: Bach. Roxanita Paisic Ramirez, defiende en sesión pública presencial ( ) / a distancia (X) la Tesis titulada: "EVALUACIÓN DEL IMPACTO DE OSMORREGULADORES EN LA SINCRONIZACIÓN EMBRIONARIA DE CÉLULAS PREIABLES DE CACAO (Theobroma cacao L.)", teniendo como asesor a Ing. M.Sc Walter Daniel Sánchez Aguilar, 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: M.Sc. Guillermo Idrogo Vázquez

Secretario: Dr. Segundo Manuel Oliva Cruz

Vocal: Ph.D. Ligia Magali García Posero

Procedió el aspirante a hacer la exposición de la Introducción, Material y métodos, 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 de sustentación, para que formulen las cuestiones u objeciones que consideren pertinentes.

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

Aprobado ( X )

Desaprobado ( )

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

Siendo las 18:00 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 GENERAL

	Pág.
<b>DEDICATORIA</b> .....	ii
<b>AGRADECIMIENTO</b> .....	iii
<b>AUTORIDADES DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL TORIBIO RODRÍGUEZ DE MENDOZA DE AMAZONAS</b> .....	v
<b>VISTO BUENO DEL ASESOR DE LA TESIS</b> .....	vi
<b>VISTO BUENO DEL COASESOR DE LA TESIS</b> .....	vii
<b>JURADO EVALUADOR DE LA TESIS</b> .....	viii
<b>CONSTANCIA DE ORIGINALIDAD DE LA TESIS</b> .....	ix
<b>ACTA DE SUSTENTACIÓN DE LA TESIS</b> .....	x
<b>ÍNDICE GENERAL</b> .....	xi
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	xiii
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	xiv
<b>ÍNDICE DE IMÁGENES</b> .....	xvii
<b>ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS</b> .....	xviii
<b>RESUMEN</b> .....	xix
<b>ABSTRACT</b> .....	xx
<b>I. INTRODUCCION</b> .....	21
<b>1.1. OBJETIVOS</b> .....	22
<b>1.1.1. Objetivo general</b> .....	22
<b>1.1.2. Objetivos específicos</b> .....	23
<b>II. MATERIAL Y METODOS</b> .....	24
<b>2.1. Lugar de ejecución</b> .....	24
<b>2.2. Material biológico</b> .....	24
<b>2.3. Metodología</b> .....	25
<b>2.4. Análisis de datos</b> .....	26
<b>2.5. Características del experimento</b> .....	27

2.6. Variable respuesta.....	29
2.7. Métodos y técnicas e instrumentos para la recolección de datos y procedimiento.....	29
<b>III. RESULTADO .....</b>	<b>37</b>
3.1. Determinar la eficiencia de tres osmorreguladores como Poly (ethylene glicol) 6000, D-Manitol y D-Sorbitol en la sincronía embrionaria de células friable de cacao.....	37
3.1.1. Poly (ethylene glicol) 6000 (PEG).....	37
3.2. D-Manitol (MAN).....	43
3.3. D-Sorbitol (SOR).....	49
4.2. Establecer la concentración óptima de como Poly (ethylene glicol) 6000, D-Manitol y D-Sorbitol favorece una mayor sincronía embrionaria en células friables de cacao .....	55
<b>IV. DISCUSION.....</b>	<b>63</b>
4.1 Determinar la eficiencia de tres osmorreguladores como Poly (ethylene glicol) 6000, D-Manitol y D-Sorbitol en la sincronía embrionaria de células friable de cacao .....	63
4.2 Establecer la concentración óptima de como Poly (ethylene glicol) 6000, D-Manitol y D-Sorbitol favorece una mayor sincronía embrionaria en células friables de cacao .....	66
<b>V. CONCLUSIONES.....</b>	<b>68</b>
<b>VI. RECOMENDACIONES .....</b>	<b>69</b>
<b>VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....</b>	<b>70</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>75</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
<b>Tabla 1.</b> Características de los ecotipos estudiados. ....	25
<b>Tabla 2.</b> Detalle de tratamientos establecidos en el estudio.....	27
<b>Tabla 3.</b> Características generales del experimento.....	27
<b>Tabla 4.</b> Resumen de medias .....	75
<b>Tabla 5.</b> Prueba de hipótesis del estado globular.....	77
<b>Tabla 6.</b> Comparaciones multiples-fisher del estado globular.....	77
<b>Tabla 7.</b> Medias ajustadas y errores estándares para OSMORREGULADORES*CONCENTRACIONES del estado globular .....	77
<b>Tabla 8.</b> Prueba de hipótesis del estado corazón.....	78
<b>Tabla 9.</b> Medias ajustadas y errores estándares para OSMORREGULADORES*CONCENTRACIONES del estado corazón .....	78
<b>Tabla 10:</b> Prueba de hipótesis del estado torpedó.....	78
<b>Tabla 11.</b> Medias ajustadas y errores estándares para OSMORREGULADORES*CONCENTRACIONES del estado torpedó. ....	79
<b>Tabla 12.</b> Pruebas de hipótesis del estado cotiledonar.....	79
<b>Tabla 13.</b> Medias ajustadas y errores estándares para OSMORREGULADORES.....	79
<b>Tabla 14.</b> Medias ajustadas y errores estándares para CONCENTRACIONES .....	80
<b>Tabla 15.</b> Medias ajustadas y errores estándares para OSMORREGULADORES*CONCENTRACIONES.....	80
<b>Tabla 16.</b> Prueba de hipótesis de formación de callos embrionarios.....	80
<b>Tabla 17.</b> Medias ajustadas y errores estándares para CONCENTRACIONES .....	81
<b>Tabla 18.</b> Medias ajustadas y errores estándares para OSMORREGULADORES*CONCENTRACIONES.....	81

## ÍNDICE DE FIGURAS

Pág.

<b>Figura 1.</b> Porcentaje de callos formados a los 20 días de inducción, en un medio libre de Osmorregulador. ....	37
<b>Figura 2.</b> Frecuencia de callos embriogénicos en 63 días de inducción en medio ED4 con cuatro concentraciones de PEG. ....	38
<b>Figura 3.</b> Frecuencia y comportamiento de embriones globulares durante las seis evaluaciones en un medio con PEG. ....	39
<b>Figura 4.</b> Frecuencia y comportamiento de embriones en etapa corazón por un periodo de 63 días en un medio con PEG. ....	40
<b>Figura 5.</b> Frecuencia de embriones en estado torpedo en un periodo de 63 días de desarrollo en un medio con PEG. ....	41
<b>Figura 6.</b> Frecuencia de embriones en estado cotiledonal por un periodo de 63 días de desarrollo en un medio con PEG. ....	42
<b>Figura 7. A:</b> Embriones en los que predomina el estado cotiledonar (Co) con PEG a 1% en el medio. <b>B:</b> Embriones en estado cotiledonar (Co), alguno de ellos, maduros. <b>C:</b> Embriones en desarrollo, con diferentes estadios. <b>D:</b> Producción de embriones con PEG al 5% en el medio, en el que se observa tres estadios: Globulares (G), Corazón (C) y Torpedo (T). <b>E:</b> Embriones desarrollados en un medio con 5% de PEG, en el que se observa baja frecuencia embrionaria. ....	43
<b>Figura 8.</b> Porcentaje de formación de callos durante 20 días en un medio libre de osmorreguladores. ....	44
<b>Figura 9.</b> Frecuencia de callos embrionarios en 6 evaluaciones en un periodo de 63 días en un medio con MAN. ....	45
<b>Figura 10.</b> Frecuencia de embriones en estado globular en 6 evaluaciones durante un periodo de 63 días en un medio con MAN. ....	46
<b>Figura 11.</b> Frecuencia y comportamiento de embriones en estado corazón en 6 evaluaciones durante un periodo de 63 días. ....	47
<b>Figura 12.</b> Frecuencia y comportamiento de embriones en estado torpedo en 6 evaluaciones por un periodo de 63 días. ....	48
<b>Figura 13.</b> Frecuencia de embriones en estado cotiledonar en 6 evaluaciones por un periodo de 63 días. ....	49

<b>Figura 14. A:</b> Embriones en estado cotiledonar en un medio libre de D-Manitol. <b>B:</b> Embriones en estado corazón y torpedo desarrollados en un medio con 3% de MAN.....	49
<b>Figura 15.</b> Porcentaje de formación de callos durante 20 días en medio libre de SOR.	50
<b>Figura 16.</b> Frecuencia y comportamiento de callos embrionarios en 6 evaluaciones en un periodo de 63 días en un medio con SOR. ....	51
<b>Figura 17.</b> Frecuencia y comportamiento de embriones en estado globular en 6 evaluaciones por un periodo de 63 días.....	52
<b>Figura 18.</b> Frecuencia de embriones en estado corazón en 6 evaluaciones por un periodo de 63 días.....	52
<b>Figura 19.</b> Frecuencia y comportamiento de embriones en estado torpedo en 6 evaluaciones durante un periodo de 63 días. ....	53
<b>Figura 20.</b> Frecuencia de embriones en estado cotiledonar en 6 evaluaciones durante un periodo de 63 días.....	54
<b>Figura 21. A:</b> Formación de embriones torpedo y cotiledonares en presencia de D-Sorbitol al 1%. <b>B:</b> Embriones en estado cotiledonar, en presencia de SOR al 1%. <b>C:</b> Desarrollo de embriones en estado torpedo. <b>D:</b> Embriones desarrollados en un medio libre de SOR.....	55
<b>Figura 22.</b> Grafico de cajas y bigotes de frecuencias de embriones globulares, en la que muestra las áreas de influencia que genera cada boxplots.....	57
<b>Figura 23.</b> Grafico de cajas y bigotes de frecuencias de embriones corazón, en la que muestra las áreas de influencia que genera cada boxplots.....	58
<b>Figura 24.</b> Grafico de cajas y bigotes de frecuencias de embriones torpedo, en la que muestra las áreas de influencia que genera cada boxplots.....	59
<b>Figura 25.</b> Grafico de cajas y bigotes de frecuencias de embriones cotiledonar, en la que muestra las áreas de influencia que genera cada boxplots.....	60
<b>Figura 26.</b> Grafico de cajas y bigotes de formación de callos embrionarios, en la que muestra las áreas de influencia que genera cada boxplots.....	62
<b>Figura 27. A:</b> Plantaciones de cacao de la Universidad Nacional de San Martín; <b>B:</b> Planta de cacao seleccionado para planta madre; <b>C:</b> Planta madre seleccionada (MRC-05) para experimentos con tratamientos de osmorreguladores. ....	82
<b>Figura 28. A:</b> Selección de botones florales en buen estado; <b>B:</b> Colecta de botones florales, cortadas a 5mm de la base de la flor.....	82

- Figura 29. A:** Corte de botones florales de cacao a 5 mm de la base.; **B:** Forma correcta de colocar el botón floral en el tubo d centrífuga. .... 83
- Figura 30. A:** Desinfección de las flores con hipoclorito de calcio; **B:** Botones florales en placa petri después de ser lavados; **C:** Placa petri tapadas con botones florales. .... 83
- Figura 31. A:** Botones florales con sépalos; **B:** Estructura interna de la flor, gineceo y androceo; **C:** Estaminodios; **D:** Pétalos E: Pétalos y estaminodios separados. 84

## ÍNDICE DE IMÁGENES

	Pág.
<b>Imagen 1.</b> Mapa de ubicación geográfica del laboratorio de Fisiología y Biotecnología Vegetal (FISIOBVEG) en la UNTRM. ....	24
<b>Imagen 2.</b> Disección de botón floral de cacao, a 1/3 de la longitud de la base de la flor. ....	83
<b>Imagen 3.</b> Base de pétalos en medio PCG. ....	84

## ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS EN LOS ANEXOS

	Pág.
<b>Fotografía 1.</b> Preparación de medio en las placas petri, para los diferentes experimentos. .....	85
<b>Fotografía 2.</b> Colecta de botones florales del árbol MRC-05. ....	85
<b>Fotografía 3.</b> Se observa en la parte superior, embrión primario en estado torpedo y cotiledonar generados de estaminodios, y en la parte inferior, embriones secundarios generados de un segmento de embrión primario. ....	86
<b>Fotografía 4.</b> <b>A.</b> Embriones primarios listos para inducir a formación de callos. <b>B.</b> Embriones secundarios en desarrollo (etapa coriledonal) del PEG al 1%, R2. <b>C.</b> Baja formación de embriones secundarios con MAN al 1%.. <b>D.</b> Algunos embriones en formación con SOR al 3%. ....	87

## RESUMEN

La contribución de la embriogénesis somática es de gran importancia para el productor ya que permite programas de mejoramiento o propagación a gran escala de genotipos superiores. Por esta razón, en la presente investigación se evaluó el impacto de tres osmorreguladores (Poly (ethylene glicol) 6000, D-Manitol y D-Sorbitol) en la sincronía embrionaria de células friables de cacao (*Theobroma cacao* L) a nivel de laboratorio bajo un diseño experimental completos al azar (DCA) con arreglo factorial de 3x4, con tres tratamientos más el testigo y cuatro repeticiones, donde se estimaron los parámetros: frecuencia de embriones globulares, frecuencia de embriones torpedo, frecuencia de embriones corazón, frecuencia de embriones cotiledonares, frecuencia de calogénesis. Se realizaron 48 evaluaciones con un intervalo de 14 días, asimismo, para los datos obtenidos se realizó el análisis de varianza usando Modelos Lineales Generales y Mixtos (MLGM) mediante el Software InfoStat versión 2018p. Posterior a ello se aplicó pruebas de comparaciones múltiples según LSD Fisher. Con PEG al 1% se evidenció diferencias estadísticas significativas para dos estadíos, globular y cotiledonar ( $p > 0.05$ ), en cambio para los demás tratamientos fue no significativo. En conclusión, el que mejor respuesta mostró tanto en la formación de embriones como en la sincronía, fue el tratamiento con PEG al 1%.

**Palabras claves:** Poly (ethylene glicol) 6000, D-Manitol, D-Sorbitol, embrión somático, osmorregulador.

## ABSTRACT

The contribution of somatic embryogenesis is of great importance for the producer since it allows breeding programs or large-scale propagation of superior genotypes. For this reason, in the present investigation the impact of three osmoregulators (Poly (ethylene glycol) 6000, D-Mannitol and D-Sorbitol) on the embryonic synchrony of friable cocoa cells (*Theobroma cacao* L) was evaluated at a low laboratory level. a complete randomized experimental design (DCA) with a factorial arrangement of 3x4, with three treatments plus the control and four repetitions, where the parameters were estimated: frequency of globular embryos, frequency of torpedo embryos, frequency of heart embryos, frequency of cotyledonous embryos , frequency of callogenesis. 48 evaluations were carried out with an interval of 14 days, likewise, for the data obtained, the analysis of variance was carried out using General and Mixed Linear Models (MLGM) using the InfoStat Software version 2018p. After this, multiple comparison tests were applied according to LSD Fisher. With PEG at 1%, significant statistical differences were evidenced for two stages, globular and cotyledonous ( $p > 0.05$ ), while for the other treatments it was not significant. In conclusion, the one that showed the best response both in the formation of embryos and in synchrony, was the treatment with 1% PEG.

**Key words:** Polyethylene glycol 6000, D-Mannitol, D-Sorbitol, somatic embryo, osmoregulator.

## I. INTRODUCCION

La explotación de cacao, está siendo difundida por varios países del mundo, de los cuales el principal país cacaotero es Costa de Marfil, ya que registró un crecimiento productivo de 44.8% en el año 2018/2019, los países que le siguen en producción son Ghana, Indonesia, Brasil, Nigeria, Ecuador, Camerún, Perú, República Dominicana y Colombia, en la que Perú se encuentra en el puesto 8 en producción hasta el año 2018/2019 (Dirección General de Políticas Agrarias , 2019).

Gracias a la gran demanda del cacao, vienen ampliándose en nuevas parcelas agrícolas en diferentes regiones del Perú, por lo que a nivel de todo el territorio nacional, hasta el 2018 más del 85% de la producción de cacao se concentra en las regiones de San Martín (40.9%), Junín (18.3%), Ucayali (12.3%), Huánuco (7.7%) y Cusco (6.1%), siendo esos los principales departamentos en producción de cacao (Saldaña, 2019). La región San Martín es participe de un 34% del total (28 984 hectáreas), de esta, el 90% son plantaciones de cacao de la variedad CCN-51 (26,086 hectáreas) y un 8% de la variedad Criollo (2,139 hectáreas), le sigue en importancia la región Cusco con 21,740 hectáreas (25,6% del total), con 60% de plantaciones de cacao Criollo (13,044 hectáreas) y 8,261 hectáreas de cacao CCN-51 (38%). Estas cifras demuestran el posicionamiento y la importancia del cacao en el Perú (INIA, 2019).

De acuerdo con la biología reproductiva, el cacao se propaga por semilla sexual y botánica, la polinización cruzada promovida por *Forcipomyia* spp es altamente eficiente, dando como resultado la fertilización y formación de semillas recombinadas genéticamente con otros genotipos, este acaba siendo un aspecto negativo, cuando se pretende homogenizar la siembra de plantas de cacao élite sobre parcelas productivas (Paredes et al, 2003). Del mismo modo, en el caso de que se haya identificado plantas élites de cacao criollo y se pretenda propagar de forma asexual mediante estaquillas o injertos, esta técnica no atendería en términos de cantidad y disponibilidad a una posible demanda de nuevos productores (Li et al, 1998).

La micropropagación in vitro es empleada en cultivo de tejidos vegetales, como una técnica, que consiste esencialmente en aislar una porción de la planta y brindarle las condiciones físicas y químicas de forma artificial a fin de que las células expresen su potencial intrínseco o inducido (Thorpe, 1980). Para efectos específicos, numerosos trabajos sobre la micropropagación in vitro en cacao fueron realizados sobre diferentes porciones vegetativas, vía organogénesis y embriogénesis somática (Florez et al, 2015; Li et al, 1998; Maximova S. , 2002; S. Maximova et al, 2005).

La obtención de embriones somáticos es cada vez mayor en los últimos 40 años, ya que con la disponibilidad de estos permite programas de mejoramiento o propagación a gran escala de genotipos superiores (Parrott, 2002); esta metodología constituye un método de propagación eficaz que evita varios de los problemas presentes en otros métodos, como la alta heterocigosis obtenida durante la reproducción sexual, el bajo porcentaje de viabilidad y elevados costos asociados con la labor intensiva y la alta demanda de mano de obra (Li et al, 1998; Figueira y Janick, 1993).

Hasta ahora se ha establecido de forma experimental, que la mejor vía para la micropropagación de cacao es mediante embriogénesis somática a través de estaminodios (Florez et al, 2015; Maximova S. , 2002), siendo esta, una de las mejores alternativas para la generación de embriones somáticos directos, que por su naturaleza genera plantas en bajas cantidades; junto a esta embriogénesis somática existe la presencia de callo que podría originar plantas somáticas aditivas y que muy probablemente puedan incrementar en número el total de plantas regeneradas. En este contexto, la presente buscó explorar el impacto de tres osmorreguladores que faciliten una mayor sincronía embrionaria en embriones somáticos secundarios, además de determinar la eficiencia y la concentración óptima de los osmorreguladores.

## **1.1. OBJETIVOS**

### **1.1.1. Objetivo general**

Evaluar el impacto de osmorreguladores en la sincronización embrionaria de células friables de cacao (*Theobroma cacao* L.)

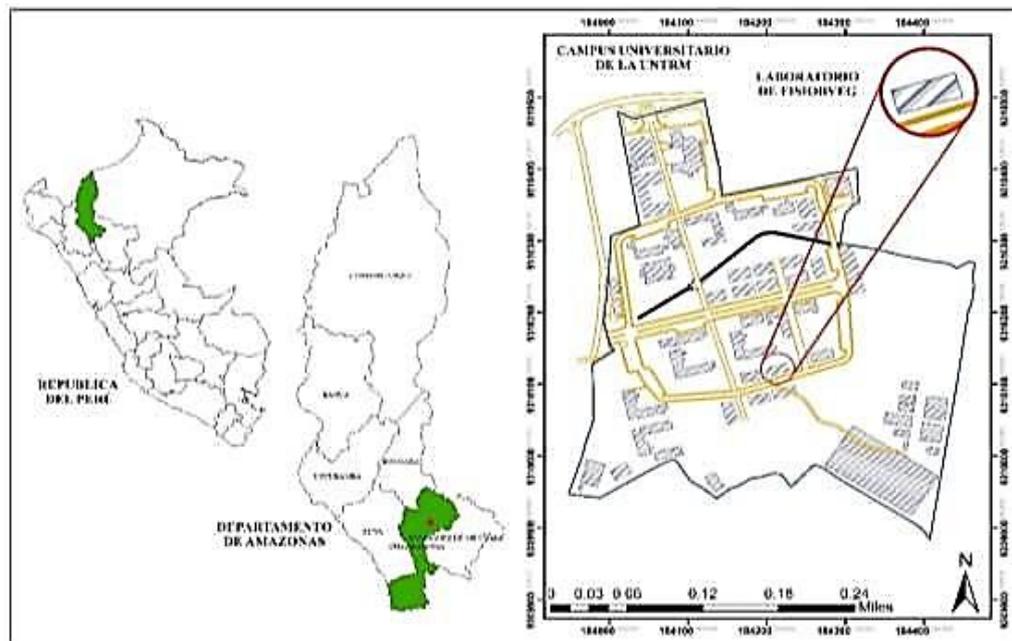
### **1.1.2. Objetivos específicos**

- ✓ Determinar la eficiencia de tres osmorreguladores como Poly (ethylene glicol) 6000, D-Manitol y D-Sorbitol en la sincronía embrionaria de células friable de cacao.
- ✓ Establecer la concentración óptima de como el Poly (ethylene glicol) 6000, D-Manitol y D-Sorbitol favorece una mayor sincronía embrionaria en células friables de cacao.

## II. MATERIAL Y METODOS

### 2.1. Lugar de ejecución

Esta investigación se realizó durante los meses de marzo del 2019 a diciembre del 2020, en el laboratorio de Fisiología y Biotecnología Vegetal (FISIOBVEG) del Instituto de Investigación para el Desarrollo Sustentable de Ceja de Selva (INDES-CES) de la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas (UNTRM-A) (Imagen 1).



**Imagen 1.** Mapa de ubicación geográfica del laboratorio de Fisiología y Biotecnología Vegetal (FISIOBVEG) en la UNTRM.

### 2.2. Material biológico

En esta investigación, para la obtención de embriones primarios se utilizó estaminodios y base de pétalos de botones florales de cacao (MRC-05) de la colección de APROCAM y para la obtención de embriones secundarios, se incorporó embriones obtenidos de estaminodios de botones florales de cacao (I52) de la colección del INDES-CES, que anteriormente fueron tratados con 10 nM de TDZ/L (No se muestra en esta investigación). La Ubicación y algunas características de estos árboles se presentan en la Tabla 1.

**Tabla 1:** Características de los ecotipos estudiados.

<b>Código del Ecotipo</b>	<b>UTM</b>	<b>Sector</b>	<b>Altitud (m.s.n.m.)</b>	<b>Color del fruto Inmaduro</b>
MRC-05	9371517 17M 0787562	Lluhuana	851	Verde
I52	9366649 17M 794441	Diamante Bajo	725	Verde

### **2.3. Metodología**

Se realizaron dos fases, la primera fase, fue la de campo, en la que se realizó la identificación de la planta madre, para la recolección del material biológico, y la segunda fase, fue la de laboratorio, en la que se realizó los experimentos con los osmorreguladores. En las dos fases nos basamos en el protocolo descrito por García et al, (2018).

#### **2.3.1. Población, muestra y muestreo**

##### **Población:**

La población estudiada estuvo conformada por el total de callos obtenidos del medio SCG.

##### **Muestra:**

Se evaluaron 36 placas Petri, (25 segmentos de embrión con embriogénesis secundaria inducida) para cada experimento.

##### **Muestreo:**

La evaluación de las muestras fueron tomadas aleatoriamente, ya que los métodos de muestreo probabilístico aseguran la representatividad de la muestra extraída por lo que son los más recomendables (Otzen & Manterola , 2017)

### 2.3.2. Variables de estudio

#### Variables independientes:

- Polietilenglicol (PEG) (6000)
- Manitol
- Sorbitol

#### Variables dependientes

- Frecuencia de embriones globulares / Tratamiento
- Frecuencia de embriones torpedo / Tratamiento
- Frecuencia de embriones corazón / Tratamiento
- Frecuencia de embriones cotiledonares / Tratamiento
- Frecuencia de callogénesis

### 2.4. Análisis de datos

El estudio se ejecutó en un diseño experimental completos al azar (DCA) con arreglo factorial de 3x4, teniendo los factores en estudio: **Factor A**, Osmorreguladores con tres niveles: **A1** (Poly (ethylene glycol) 6000), **A2** (D-Manitol) y el **A3** (D-Sorbitol). **Factor B**, Concentraciones de osmorreguladores con tres niveles: **B1** (0%), **B2** (1%), **B3** (3%) y **B4** (5%), donde se distribuyeron 12 unidades experimentales, se realizó cuatro repeticiones, por ende, 48 unidades experimentales en estudio (cada unidad experimental representó una placa Petri con 25 segmentos de embrión con embriogénesis secundaria inducida). El análisis de los resultados fue procesado usando Modelos Lineales Generales y Mixtos (MLGM) mediante el Software Infostat versión 2018p. Posterior a ello se aplicó pruebas de comparaciones múltiples según LSD Fisher, para crear intervalos de confianza para todas las diferencias en parejas entre las medias de los niveles de los factores, controlando al mismo tiempo la tasa de error individual.

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

<b>Factores</b>		<b>Combinaciones</b>	<b>Tratamientos</b>
<b>Osmorreguladores</b>	<b>Concentraciones</b>		
Poly (ethylene glicol) 6000 (A1)	0% (B1)	A1B1	T1
	1% (B2)	A1B2	T2
	3% (B3)	A1B3	T3
	5% (B4)	A1B4	T4
D-Manitol (A2)	0% (B1)	A2B1	T5
	1% (B2)	A2B2	T6
	3% (B3)	A2B3	T7
	5% (B4)	A2B4	T8
D-Sorbitol (A3)	0% (B1)	A3B1	T9
	1% (B2)	A3B2	T10
	3% (B3)	A3B3	T11
	5% (B4)	A3B4	T12

## 2.5. Características del experimento.

**Tabla 3 :** Características generales del experimento

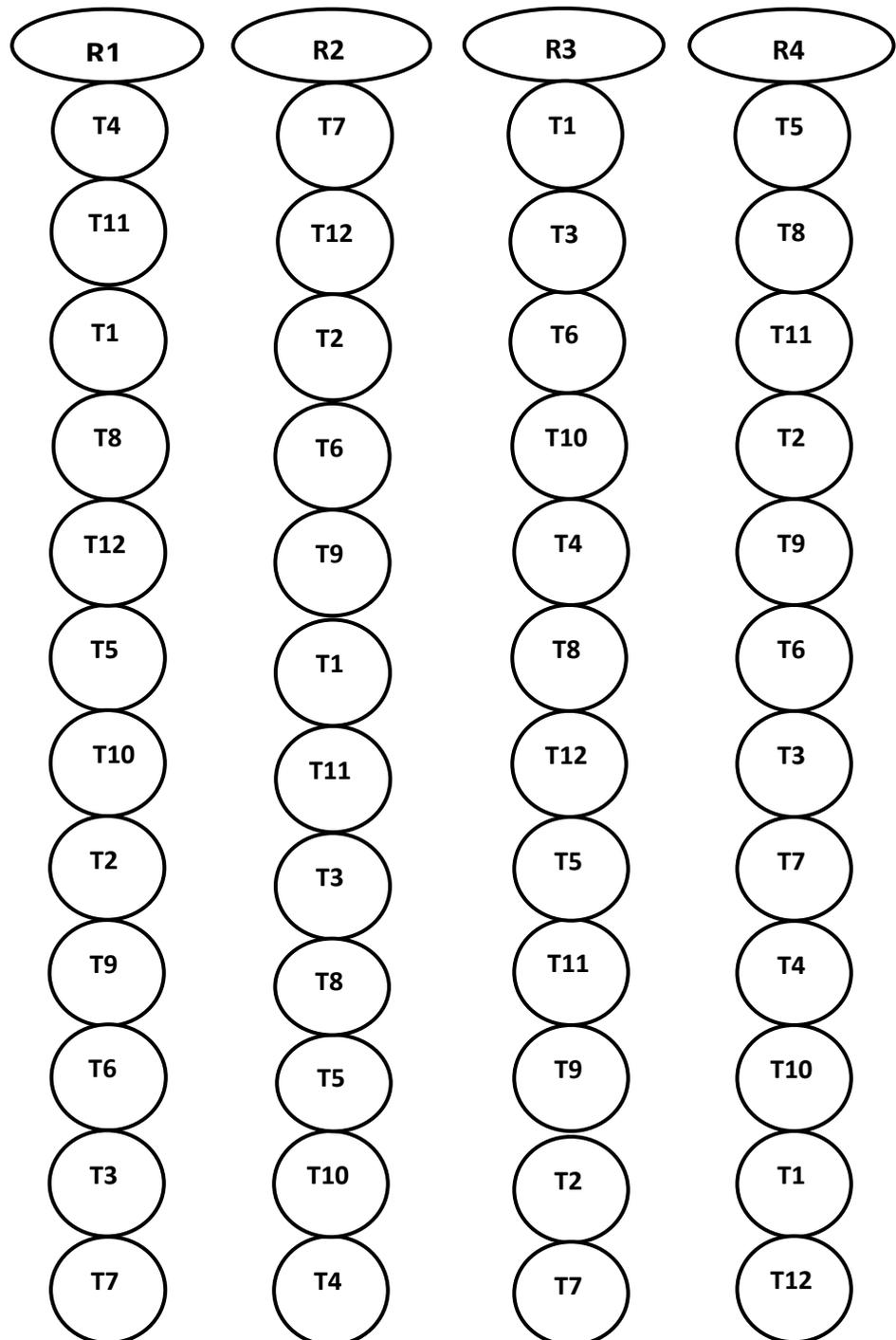
<b>DISEÑO DE BLOQUES COMPLETOS AL AZAR</b>	
<b>Factores</b>	2
<b>Tratamientos</b>	12
<b>N° de unidades experimentales</b>	3
<b>Total de unidades experimentales por tratamiento</b>	48
<b>Placas por tratamiento</b>	4 de 9 cm de diámetro
<b>N° de placas Petri evaluadas</b>	48

**Fuente:** Elaboración propia.

**Tratamiento control (testigo)**

En cuanto al testigo absoluto no se le aplicará ningún tipo de osmorregulador y estará distribuido en cada uno de las repeticiones.

### Distribución del diseño



## 2.6. Variable respuesta

Las evaluaciones se realizaron según las investigaciones de Urrea et al (2017), y el protocolo descrito por García et al (2018).

Se realizaron 6 evaluaciones

Evaluación 1(Ev1): 7 días

Evaluación 2 (Ev2): 14 días

Evaluación 3 (Ev3): 21 días

Evaluación 4 (Ev4): 35 días

Evaluación 5 (Ev5): 49 días

Evaluación 6 (Ev6):63 días

Para evaluar a cada uno de los callos y embriones en los diferentes tratamientos establecidos en el estudio, se utilizaron variables respuestas referidas a la capacidad de formar embriones, con la frecuencia de embriones y frecuencia de callos, de esta manera se determinó la sincronía en la formación de embriones.

Para determinar la frecuencia de callos embriogénicos se utilizó la siguiente formula:

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

Para determinar la frecuencia de embriogénesis se utilizó la siguiente fórmula:

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

## 2.7. Métodos y técnicas e instrumentos para la recolección de datos y procedimiento.

La metodología para los test con osmorreguladores, para inducir embriogénesis somática en cacao fue acorde a lo descrito por García et al (2018).

**Preparación mediana para la embriogénesis somática indirecta.** Se preparó la solución en stock de sales de DKW, vitaminas DKW y aminoácidos. Las soluciones fueron las siguientes:

- **DKW 10X por litro (Soluciones macro A)**
  - NH<sub>4</sub> NO<sub>3</sub>..... 14.16 g
  - Ca (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 4H<sub>2</sub>O.....19.68 g
- **DKW 10X por litro (Soluciones macro B)**
  - K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.....15.59 g
  - MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O.....7.40 g
  - CaCl<sub>2</sub> 2H<sub>2</sub>O.....1.49 g
  - KH<sub>2</sub> PO<sub>4</sub>.....2.65 g
- **DKW 100X por litro (Micro soluciones C)**
  - Zn (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 6H<sub>2</sub>O..... 1.70 g
  - Mn SO<sub>4</sub> H<sub>2</sub>O.....3.34 g
  - FeSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O.....3.38 g
  - Na-EDTA.....4.54 g
  - H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>.....0.48 g
  - CuSO<sub>4</sub> 5H<sub>2</sub>O.....25 mg
  - Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> 2H<sub>2</sub>O.....39 mg
- **DKW 1000X por 100ml (Solución vitamínica)**
  - Myoinositol.....10.0 g
  - Tiamina – HCL.....0.2 g
  - Acido nicotínico.....0.1 g
  - Glicina.....0.2 g
  - Tryptophan.....0.1 g
- **Aminoácidos 1000X por 100 ml (Solución stock)**
  - L-lysine.....45.65 mg
  - L- Leucine.....32.80 mg
  - L- Tryptophan.....51.05 mg
  - Arginina.....43.55 mg
  - Glicina.....18.76 mg

Todos los reactivos se aplicaron en el orden correcto, descritos anteriormente, para evitar precipitación. Antes de esterilizar por autoclave, el pH se calibró a 5,8 con 1 N KOH.

Las soluciones y los medios de cultivo de crecimiento vegetal fueron preparados siguiendo las indicaciones descritas a continuación.

- **Solución TDZ (0,5 mg mL<sup>-1</sup>).**

Thidiazuron..... 5 mg  
1 N KOH..... 100 µl  
Agua Milli-Q.....a V<sub>F</sub> de 10 ml.  
Se conservó a 4°C.

- **Solución 2, 4-D (10 mg ml<sup>-1</sup>).**

2, 4-D.....100 mg  
Etanol al 96%..... 8 mL  
Agua Milli-Q.....a V<sub>F</sub> 10 mL.  
Se conservó a 4°C.

- **Soluciones de Kinetina y BA (1 mg /ml).**

Kinetina o BA.....10 mg  
1 N NaOH.....1 ml  
Agua Milli-Q..... 9 ml  
Se conservó a - 20°C.

- **Medio de crecimiento del callo primario (PCG) para un volumen final de 1 L.**

Soluciones de DKW A.....100 mL  
Soluciones de DKW B.....100 mL  
Solución de DKW micro.....10 mL  
Solución vitamínica.....1 mL  
Glucosa.....20 g  
Glutamina.....250 mg

Myoinositol.....100 mg (= 200 mg/l)  
 Solución 2, 4-D.....200 µL (= 2,0 mg/l)  
 Solución de TDZ.....10 µL (= 5 µg/l)  
 Phytigel.....2.0 g

**- Medio sólido o líquido de crecimiento de callo secundario (SCG) para un volumen final de 1 L.**

McCown..... 2,3 g  
 Solución vitamínica de Gamborg.....1 ml  
 Glucosa.....20 g  
 Solución de 2, 4-D.....200 µl (= 2 mg/l)  
 Solución de BA.....5 µl (= 0,05 mg/l)  
 Ó Solución de Kinetin.....30 µl (= 0,3 mg/L)  
 Phytigel.....2,2 g

**- Medio de desarrollo del embrión (ED4) para un volumen final de 1L**

Soluciones macro de DKW A.....100 mL  
 Soluciones macro de DKW B.....100 mL  
 Solución micro DKW.....10 mL  
 Solución vitamínica DKW.....1 ml  
 Sacarosa.....40 g  
 Phytigel.....2 g

**- Medio de desarrollo del embrión (ED3) para un volumen final de 1L**

Soluciones macro de DKW A.....100 mL  
 Soluciones macro de DKW B.....100 mL  
 Solución micro DKW.....10 mL  
 Solución vitamínica DKW.....1 ml  
 Sacarosa.....30 g  
 Phytigel.....2 g

**- Medio de desarrollo del embrión (ED6) para un volumen final de 1 L**

Soluciones macro de DKW A.....	100 mL
Soluciones macro de DKW B.....	100 mL
Solución micro DKW.....	10 mL
Solución vitamínica DKW.....	1 ml
Sacarosa.....	60 g
Phytigel.....	2 g

**- Medio de germinación y conversión de embriones (EDL) para un volumen final de 1L.**

Soluciones macro de DKW A.....	100 mL
Soluciones macro de DKW B.....	100 mL
Solución micro DKW.....	10 mL
Solución vitamínica DKW.....	1 ml
Solución de aminoácidos.....	1ml
Glucosa.....	20 g
KNO <sub>3</sub> .....	0.3 g
Phytigel.....	1.8 g

**- Medio de regeneración vegetal (PR) (utilizado cuando falta la raíz) para a un volumen final de 1 L**

Soluciones macro de DKW A.....	50 mL
Soluciones macro de DKW B.....	50 mL
Solución micro DKW.....	5 mL
Solución vitamínica DKW.....	0.5 ml
Solución de aminoácidos.....	1ml
Acido índole-3-butirico (IBA).....	4.5 mg/l
Glucosa.....	10 g
Sacarosa.....	5 g
KNO <sub>3</sub> .....	0.3 g
Phytigel.....	2 g

## **Metodología para embriogénesis somática indirecta**

### **Colecta de Botones Florales de cacao**

- Se seleccionó una planta de cacao en estado de floración de toda la plantación, que estaba visualmente libre de patógenos, que haya tenido producciones anteriores, con las mejores características en calidad, como planta madre para las experimentaciones en laboratorio.
- Se seleccionó botones florales en buen estado, evitando flores dañadas o con agujeros, de un aproximado de 6 a 8 mm para facilitar la disección y la manipulación en ausencia de un microscopio de disección.
- Se cortó los botones florales a 5 mm de la base de la flor, con una tijera estéril. (Anexo 9.2)
- Se colectó los botones florales inmaduros, por la mañana antes de las 9:00h y fueron colocados en un tubo de centrífuga de 50 ml que contenía agua fría, para evitar que las flores inmaduras se abran, ya que puede ocurrir contaminación cuando éstas están abiertas.

### **Esterilización superficial de botones florales**

- Se preparó una solución de hipoclorito de calcio al 1% disolviendo 0,5 g de  $\text{Ca}(\text{OCl})_2$  en 50 ml de agua estéril en un tubo estéril de centrífuga de 50 ml.
- Dentro de una cámara de flujo laminar, se decantó el agua fría del tubo de centrífuga que contenía los botones florales inmaduros, y se transfirió todos los botones florales al tubo de centrífuga estéril que contenía la solución de hipoclorito de calcio.
- Se sumergió los botones florales en la solución de hipoclorito de calcio por 25 min. Luego se retiró toda la solución, y agregó 40 ml de agua estéril para enjuagar los botones florales. Se enjuagó tres veces.
- Se transfirió los botones florales a una placa de Petri y cubrió la placa para evitar la desecación. (Anexo 9.1).

### **Aislamiento de estaminodios y base de flores**

- Se colocó dos capas de toallas de papel estériles en la cámara de flujo laminar. Se secó cinco botones florales en la superficie superior de las toallas y luego transfirió a una tapa de placa Petri.
- Se cortó en una posición aproximadamente de 1/3 de la longitud de la base de la flor utilizando una hoja bisturí estéril.
- Se extrajo los estaminodios y la base de pétalo con cuidado utilizando un par de fórceps estériles. Se retiró cualquier tejido adjunto de la base del pétalo (Figura 31).
- Una vez extraídos los estaminodios y base de pétalos se colocaron en un medio de cultivo PCG (Imagen 3, Anexo 9.1).

### **Embriogénesis Somática primaria indirecta**

- Se selló las placas de Petri con doble capa de Parafilm, y se mantuvo los cultivos en la oscuridad a  $25 \pm 2$  °C durante 14 días.
- Se transfirió los estaminodios a una placa de Petri que contenía 30 ml de medio SCG y los explantes de la base pétalo a otras placas de Petri idéntico. Se selló las placas y mantuvo los cultivos en completa oscuridad por otros 14 días. Hubo un promedio de 25 explantes por placa.

### **Expresión y mantenimiento de embriones somáticos.**

- Se transfirió los estaminodios y los explantes de la base pétalo por separado a las placas Petri que contenía 30 ml de medio ED4 e incubó los cultivos en la oscuridad durante 14 días.
- Se subcultivó los explantes a un medio nuevo de ED3 por 6 veces. Se mantuvo los cultivos de embriones en la oscuridad a  $25 \pm 2$  °C, con una subcultura intervalo de 14 días hasta que los embriones somáticos alcanzaron la madurez. Desde el tercer medio de ED3, los embriones se separaron más fácilmente del callo madre. Se colocaron los embriones por separado por placa de Petri para dar a los embriones buena disponibilidad de medio.

### **Embriogénesis Somática secundaria proceso utilizando la técnica indirecta**

- Se colectó epicotilos de embriones primarios en estado torpedo y cotiledonal de 10 – 40 mg en peso, se cortó en trozos pequeños, y colocó en una placa de Petri con 30 mL de SCG. La incubación se realizó a una temperatura de 25 ° C en la oscuridad por 14 días.
- Se transfirió las piezas pequeñas a una placa de Petri que contenía 30 ml de medio sólido ED4 en la oscuridad, en donde recibieron el tratamiento del osmorregulador. La incubación se realizó a una temperatura de 25° C por 14 días.

### Conversión de embriones y establecimiento de plantas

- Todos los embriones formados pasaron al medio de cultivo Semisólido EDL en la oscuridad. La incubación se realizó a una temperatura de 27° C por 20 días.

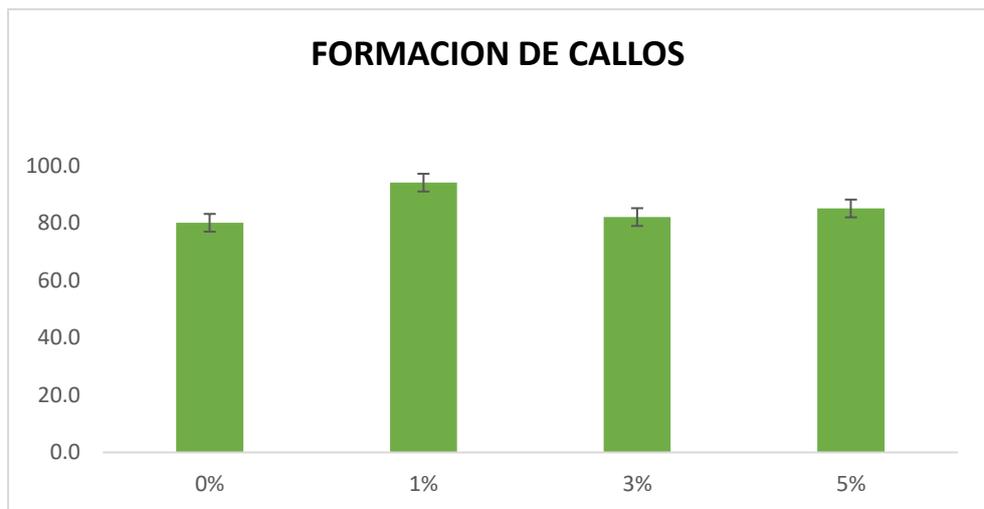
### III. RESULTADO

#### 3.1. Determinar la eficiencia de tres osmorreguladores como Poly (ethylene glicol) 6000, D-Manitol y D-Sorbitol en la sincronía embrionaria de células friable de cacao.

##### 3.1.1. Poly (ethylene glicol) 6000 (PEG)

##### Porcentaje de formación de callos y frecuencia callos embriogénicos

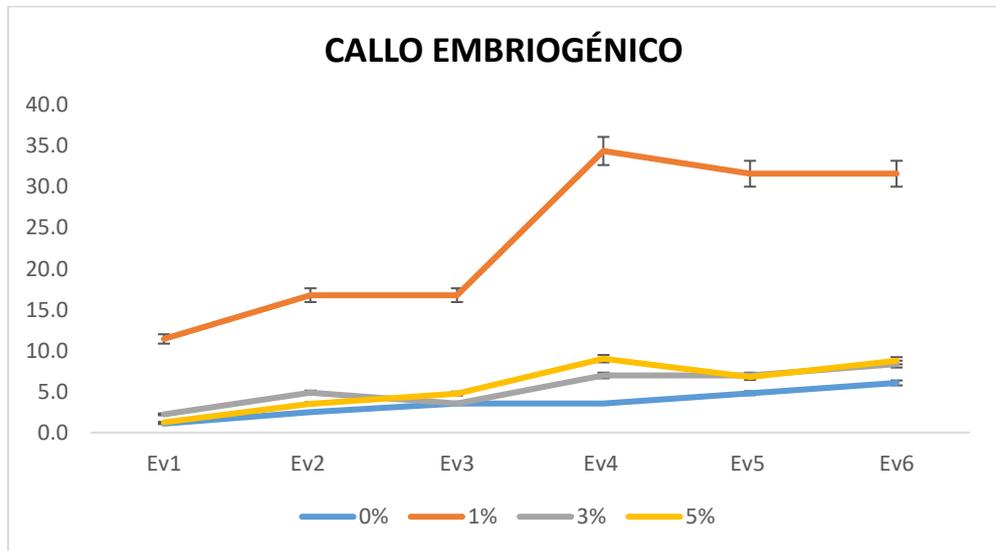
En la figura 1 muestra el porcentaje de formación de callos, en lo que se observa que todos los explantes formaron callos por encima del 80% en promedio, siendo este el más bajo y el más alto el de 94% de callos formados. Cabe resaltar que esta evaluación fue realizada a los callos formados por los segmentos del embrión, libre de osmorreguladores en una etapa inicial de formación de embrión secundario.



**Figura 1:** Porcentaje de callos formados a los 20 días de inducción, en un medio libre de Osmorregulador.

Los callos formados, dieron lugar a la formación de embriones, por lo que en la figura 2 se observa la frecuencia de los callos embriogénicos, en las 6 evaluaciones realizadas. La respuesta a los osmorreguladores tuvieron un rango amplio, que comprenden una frecuencia desde 1.1% hasta un 34.6 % de callos embriogénicos. Como se observa en el gráfico2,

en la evaluación 1, el 1% de PEG en el medio inició con una frecuencia de 11.4% de callos embrionarios, alcanzando su valor más alto con un 34.4% en la evaluación 4, sin embargo, finalizó con un promedio de 31.6% de frecuencia de callos embriogénico. En cuanto a los tratamientos con 3% y 5% de PEG en el medio, la evolución de frecuencia de callos embriogénicos fue similar en el tiempo, manteniéndose en una frecuencia baja de callos embriogénicos, 3% de PEG en el medio inició con una frecuencia promedio de 2.2% de callos embriogénico, y al 5% de PEG en el medio inició con una frecuencia promedio de 1.3% de callos embriogénicos, finalizando con una frecuencia promedio de 8.4% y 8.8% de callos embriogénicos respectivamente.

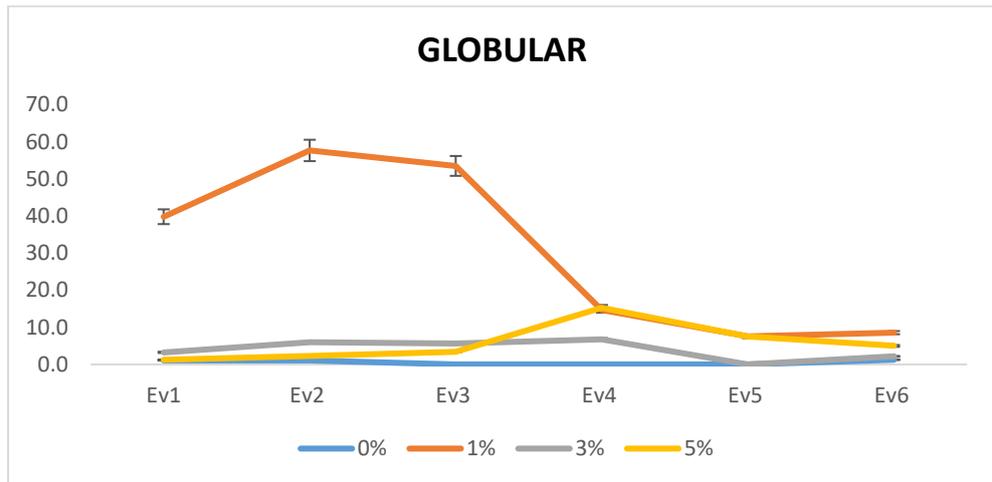


**Figura 2:** Frecuencia de callos embriogénicos en 63 días de inducción en medio ED4 con cuatro concentraciones de PEG.

### **Frecuencia de embriones globulares por tratamiento**

En cuanto a la frecuencia de embriones globulares, el rango de frecuencia de embriones va desde 0% hasta 57.7%, como se observa en la figura 3. Con el tratamiento con 1% de PEG en el medio, en la evaluación 2, se encontró una mayor frecuencia de embriones en etapa globular con un promedio de 57.7% de embriones/tratamiento, a diferencia del testigo, además en la evaluación 1 y evaluación 2, también se obtuvo una mayor frecuencia de embriones, con promedios de 39.8%

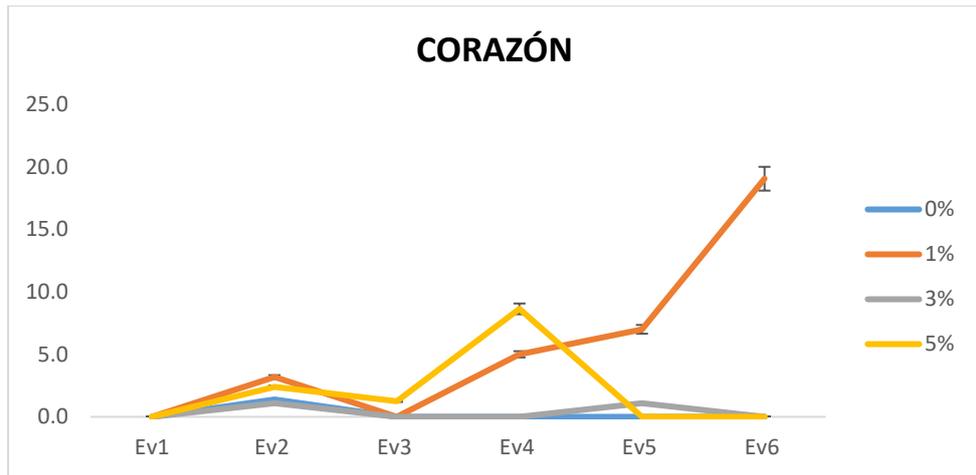
embriones/tratamiento y 53.5% embriones/ tratamiento respectivamente. En cuanto al tratamiento con 3% de PEG la obtención de embriones es baja, alcanzando una frecuencia del 3.3%, en la evaluación 2 y se mantiene casi con el mismo promedio hasta los 35 días, pasados estos 35 días, se observa baja frecuencia de embriones globulares. En cambio, en la evaluación 4, PEG al 5%, alcanzó una frecuencia del 15.3%, a lo largo de los 63 días, según se observa en la figura 3.



**Figura 3:** Frecuencia y comportamiento de embriones globulares durante las seis evaluaciones en un medio con PEG.

### Frecuencia de embriones corazón por tratamiento

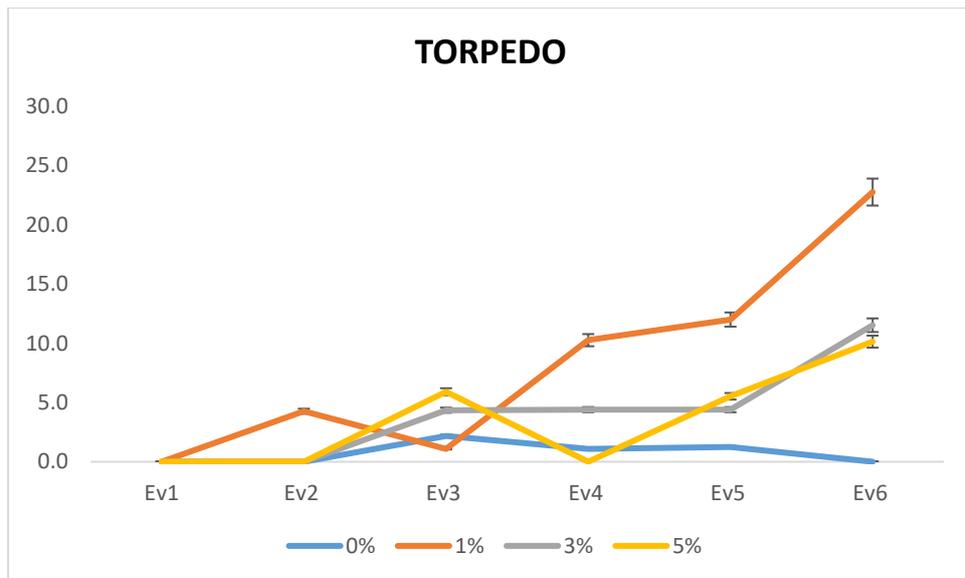
El desarrollo de los embriones globulares a embriones corazón, estuvieron en un rango de frecuencia de 0% a 19% en promedio. Se observa en la figura 4 que el tratamiento con 1% de PEG, inició la formación de embriones en la segunda evaluación, después de aplicado el tratamiento, llegando a la última evaluación a una frecuencia del 19%, en cambio con 3% de PEG en el medio, la frecuencia embrionaria, fue relativamente baja, ya que inició a los 14 días con la formación de embriones corazón, con un promedio de 1.1% y finalizó en la evaluación 5, con el mismo promedio. El tratamiento con 5% de PEG la frecuencia más alta, con respecto a este tratamiento, se obtuvo en la evaluación 4 con un promedio de 8.6%, a los 63 ya no se observó embriones corazón.



**Figura 4:** Frecuencia y comportamiento de embriones en etapa corazón por un periodo de 63 días en un medio con PEG.

#### **Frecuencia de embriones torpedo por tratamiento**

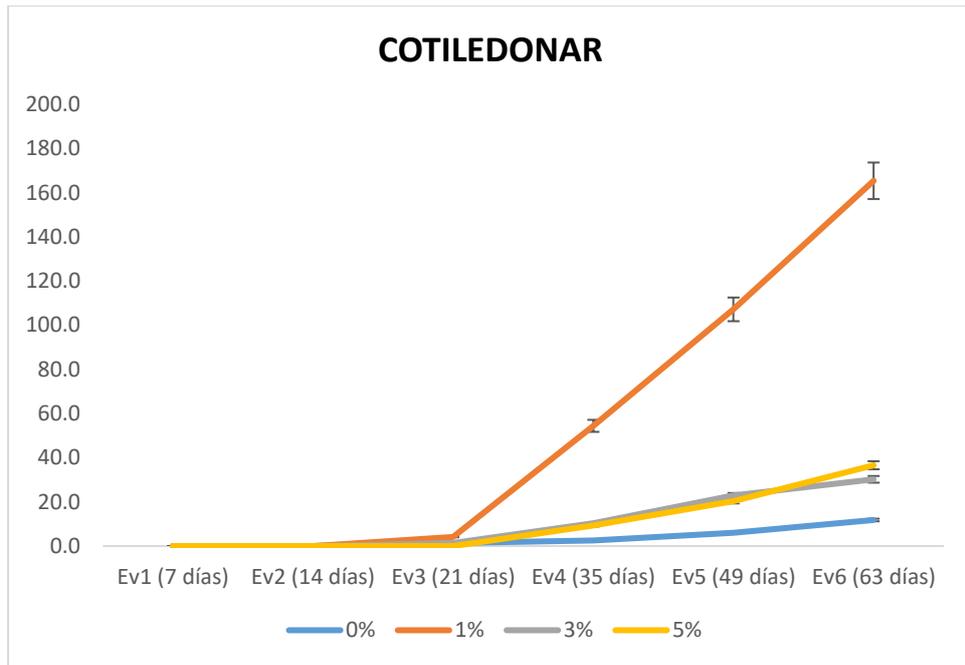
La evolución de los embriones en estado corazón al estado torpedo, estuvieron en un rango variado de respuesta a los tratamientos, considerandos entre 0% al 22.8% de frecuencia. Observando en la figura 5, el tratamiento con 1% de PEG en el medio, generó más número de embriones en estado torpedo con una frecuencia más alta del 22.8% en promedio en la evaluación 6, se observó también que la formación de embriones Torpedo empezó a los 14 días de inducción con un promedio de 4.3% de frecuencia embrionaria. En cuanto a la frecuencia del tratamiento con 3% de PEG, se mantuvo en un promedio de 4.4% desde la evaluación 2 hasta la evaluación 5, en la evaluación 6, la frecuencia de embriones aumentó hasta un 11.5%. Para la frecuencia del 5% de PEG en el medio, en la evaluación 3, cambiaron los embriones globulares al estado torpedo, consiguiendo producir el doble de embriones, con una frecuencia mayor en la evaluación 6, con un promedio de 10.1% de embriones/tratamiento, como se puede apreciar en la figura 5.



**Figura 5:** Frecuencia de embriones en estado torpedo en un periodo de 63 días de desarrollo en un medio con PEG.

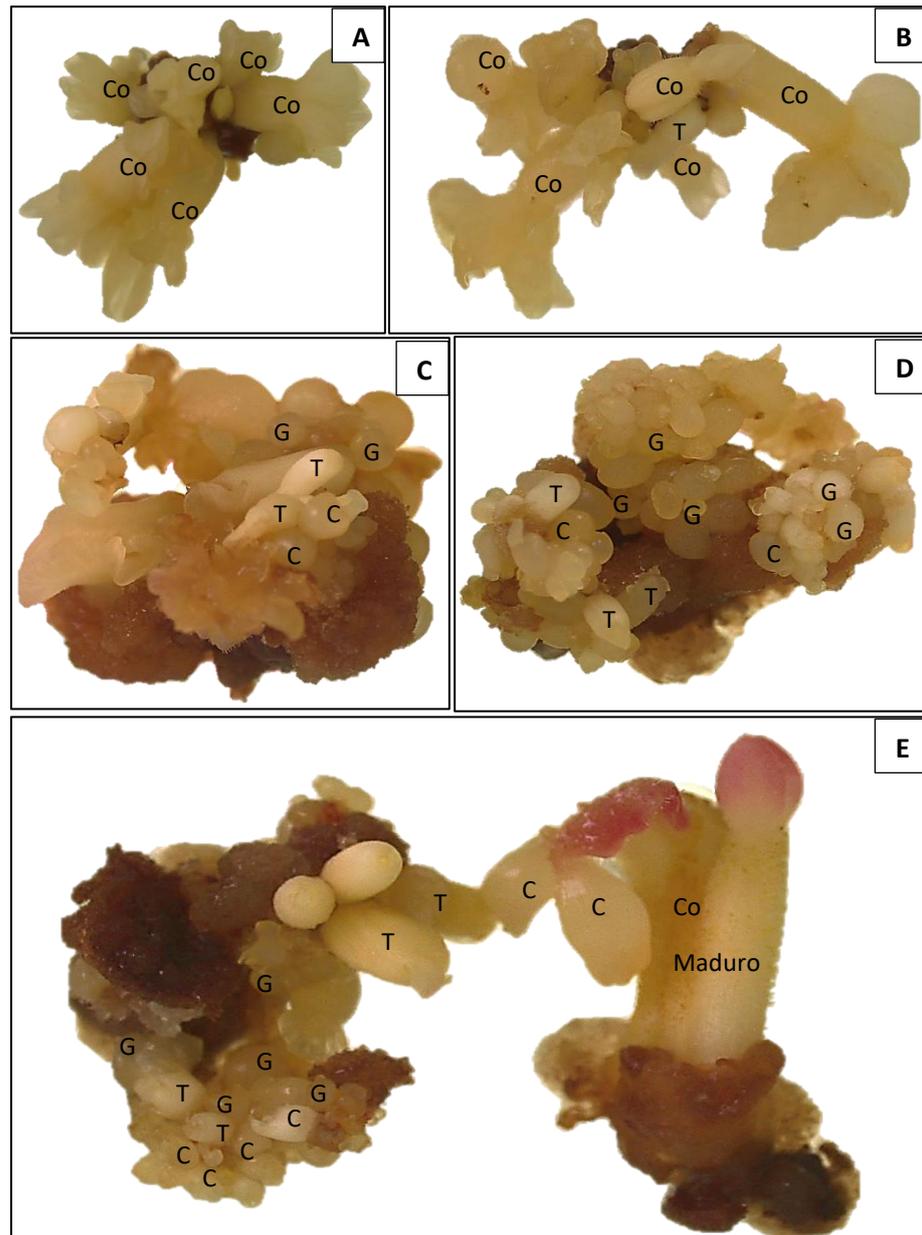
#### **Frecuencia de embriones cotiledonar por tratamiento**

Con respecto al estado cotiledonar, la figura 6 nos muestra que el tratamiento con el 1% de PEG en el medio, la formación de embriones cotiledonares inició en la evaluación 3, al igual que los demás tratamientos incluyendo al testigo, con una frecuencia de 4.2% en promedio de embriones en estado cotiledonar, finalizando con una frecuencia promedio de 165.4% de embriones cotiledonares en la evaluación 6, considerándose con la frecuencia y número de embriones más altos en este estadio. En cuanto al tratamiento con 3% de PEG, inició con una frecuencia de 1.4%, al igual que el testigo, finalizando con 30.2% en promedio, en la evaluación 6. El tratamiento con 5% de PEG, inició el desarrollo de embriones cotiledonares en la evaluación 4, finalizando con una frecuencia del 36.6% como se puede observar en la figura 6.



**Figura 6:** Frecuencia de embriones en estado cotiledonar por un periodo de 63 días de desarrollo en un medio con PEG.

A continuación se muestran algunos de los resultados en fotografías de los embriones generados con PEG, en la que se puede observar embriones en diferentes estadios con las diferentes concentraciones:



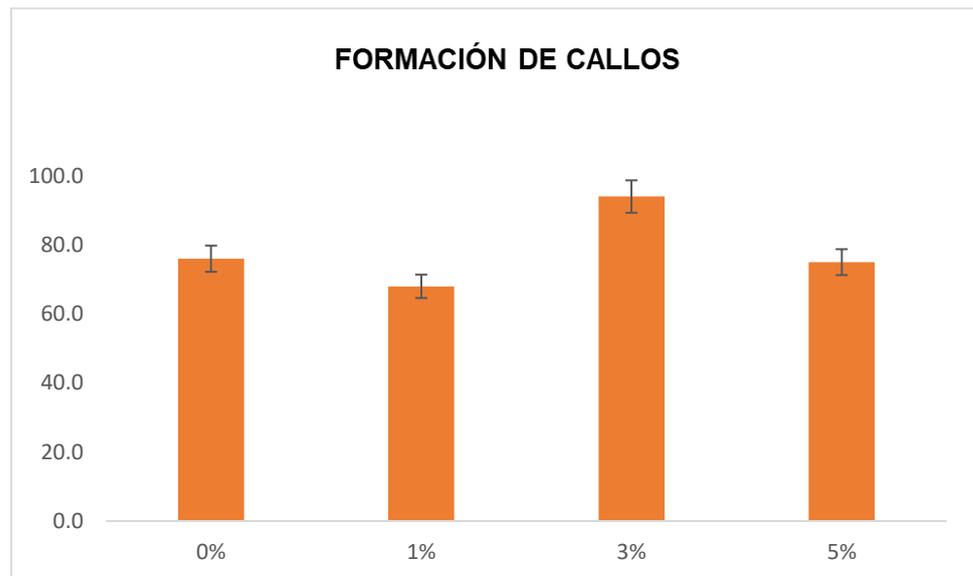
**Figura 7. A:** Embriones en los que predomina el estado cotiledonar (Co) con PEG a 1% en el medio. **B:** Embriones en estado cotiledonar (Co), alguno de ellos, maduros. **C:** Embriones en desarrollo, con diferentes estadios. **D:** Producción de embriones con PEG al 5% en el medio, en el que se observa tres estadios: Globulares (G), Corazón (C) y Torpedo (T). **E:** Embriones desarrollados en un medio con 5% de PEG, en el que se observa baja frecuencia embrionaria.

### 3.2. D-Manitol (MAN)

#### Porcentaje de formación de callos y frecuencia callos embrionarios

La formación de callos de los explantes de embriones primarios, tiene un rango variado, que va desde 68% hasta 94% de formación de callo a los

20 días de inducción a formación de callo sin tratamiento en medio SCG, como se observa en la figura 7, de los cuales dará lugar a la formación de embriones, pasando a la siguiente etapa. Cabe resaltar que esta evaluación fue realizada a los callos formados por los segmentos del embrión, libre de osmorreguladores en una etapa inicial de formación de embrión secundario.

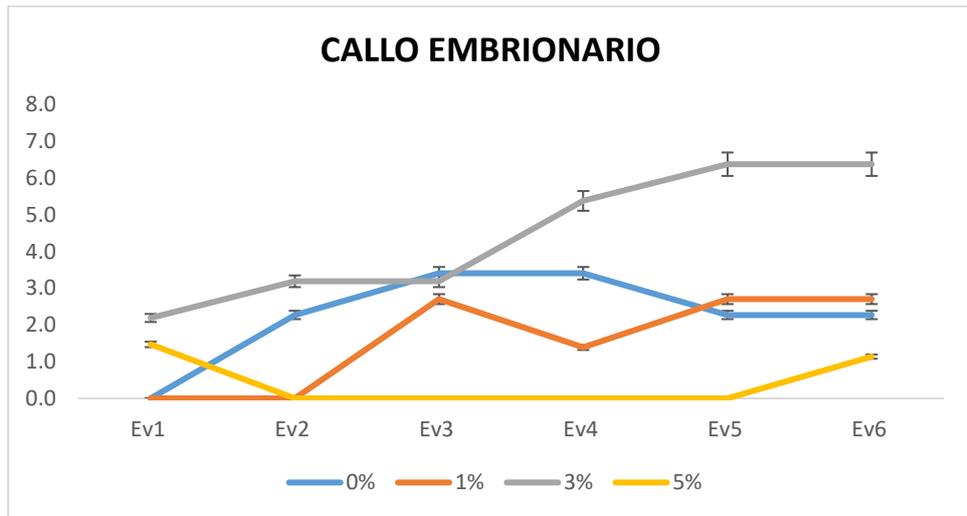


**Figura 8:** Porcentaje de formación de callos durante 20 días en un medio libre de osmorreguladores.

La producción de embriones, que dieron lugar los callos, se denominan callos embrionarios, empezaron a los 7 días para los tratamientos al 3% y 5% de MAN, el tratamiento con 1% demoró un poco más, y empezó a los 21 días de inducción, lo mismo ocurrió con el testigo.

El tratamiento con 1% de MAN, la mayor frecuencia, se dio en la evaluación 3, y la más baja en la evaluación 6 con una frecuencia del 2.7%. El tratamiento con el 3% de MAN en el medio, consiguió un total de 6.4%, la frecuencia más alta, con respecto a las demás evaluaciones, incluso al testigo. Con 5% de MAN en el medio, se logró iniciar con la frecuencia y formación de callos en la evaluación 1, sin embargo, a partir de la evaluación 2, este dejó de formar embriones, considerando con el más bajo promedio de frecuencia de callos embriogénicos con respecto a

los demás tratamientos, ya que en la evaluación 6 ya no se observa callo embriónico. En cuanto al testigo, se observó, que se mantuvo en un número promedio de frecuencia de callos embriónicos, logrando el mayor promedio desde la evaluación 3 hasta la evaluación 4, con 3.4% de callos embriónicos, finalizando con un 2.3% de callos embriónicos, como se observa en la figura 9.

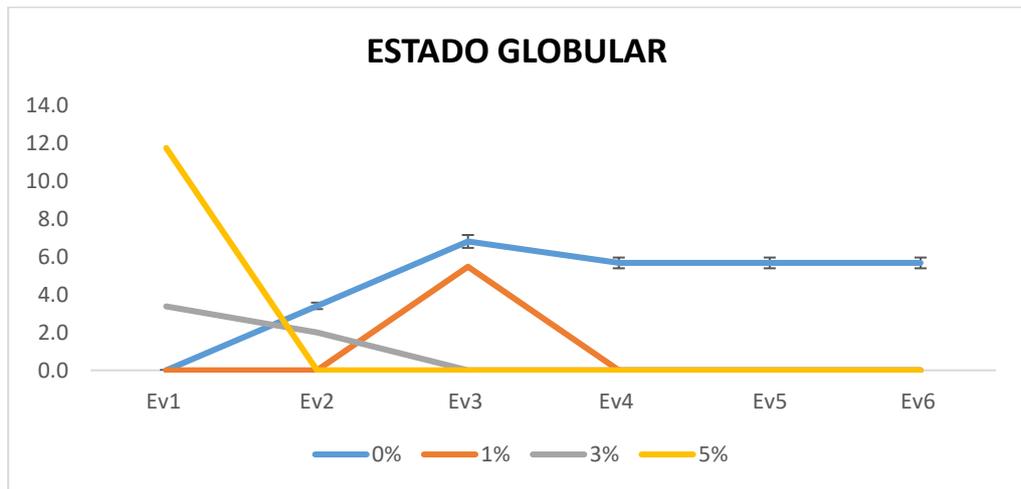


**Figura 9:** Frecuencia de callos embrionarios en 6 evaluaciones en un periodo de 63 días en un medio con MAN.

### Frecuencia de embriones globulares por tratamiento

Los primeros embriones producidos por los callos embriónicos, son los embriones globulares, en el caso del tratamiento con manitol, no se logró un gran número de embriones en estado globular como se observa en la figura 10. Se observó una frecuencia de embriones en estado globular mayor de 6.8%, en el testigo, en la evaluación 3, y una frecuencia de 5.7% en la evaluación 6, puesto que la mayoría de estos, al cabo de la evaluación 3 pasaron al siguiente estado. En cuanto al tratamiento con el 1%, la formación de embriones globulares, inició en la evaluación 3, y finalizaron esta etapa en la evaluación 4 ya que pasaron al siguiente estadio, dejando de generar, embriones en estado globular. El tratamiento con 3% de MAN en el medio, se comportó parecido, al primer tratamiento, inició con una frecuencia de 3.4%, en la evaluación 1,

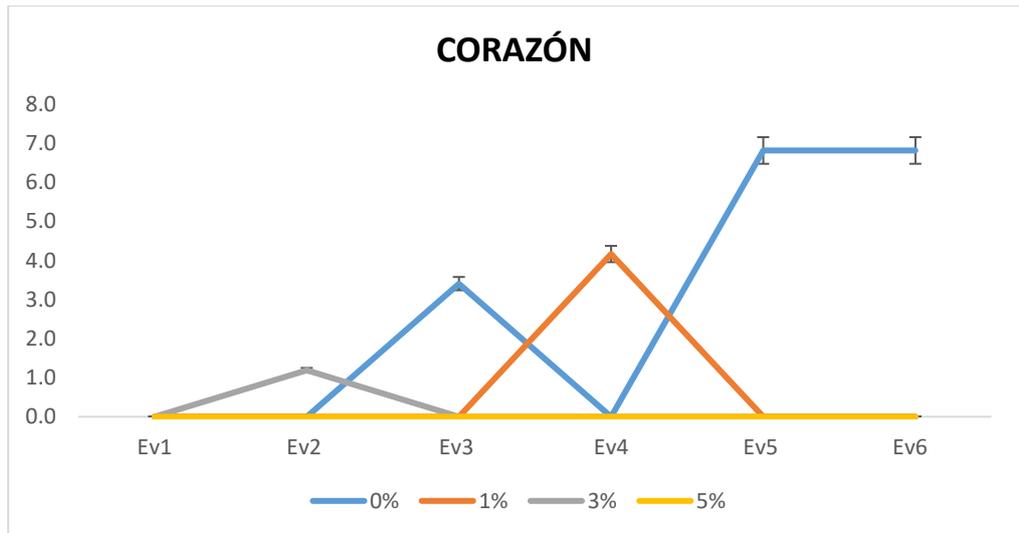
seguido de un 2% en la evaluación 2, a partir de este, ya no generó más embriones globulares, y pasaron al siguiente estadio. En la evaluación 1, el tratamiento con 5% de MAN en el medio, generó una frecuencia de 11.8%, esos pasaron a la siguiente etapa, finalizando a partir de la evaluación 2, la formación de embriones globulares.



**Figura 10:** Frecuencia de embriones en estado globular en 6 evaluaciones durante un periodo de 63 días en un medio con MAN.

### **Frecuencia de embriones corazón por tratamiento**

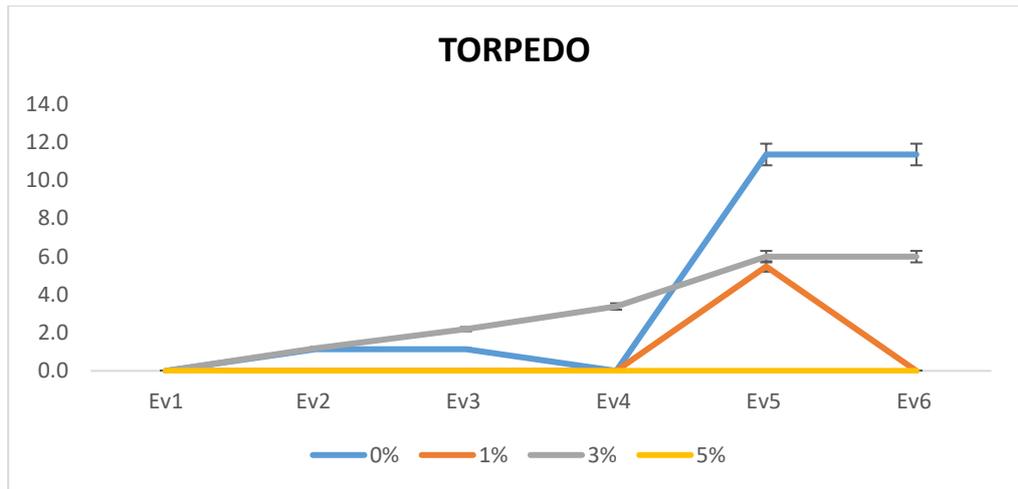
En la figura 11, se observa un rango de frecuencia de embriones en estado corazón desde 0%, hasta 6.8%, el testigo generó una frecuencia mayor que los tratamientos, ya que la formación de embriones empezó en la evaluación 3 con una frecuencia de 3.4% y finalizó en la evaluación 6, con una frecuencia de 6.8%. El tratamiento con 1% de MAN, formó embriones en la evaluación 4, con una frecuencia de 4.2%, los mismos que pasaron al siguiente estadio. Con el tratamiento con 3% de MAN en el medio, se obtuvo una frecuencia del 1.2% en la evaluación 2, dejando de formar embriones en la evaluación 3. Los embriones formados con este tratamiento pasaron a la siguiente etapa al cabo de la evaluación 3. En cuanto al tratamiento con el 5%, no se logró formar embriones a lo largo de los 63 días.



**Figura 11:** Frecuencia y comportamiento de embriones en estado corazón en 6 evaluaciones durante un periodo de 63 días.

### **Frecuencia de embriones torpedo por tratamiento**

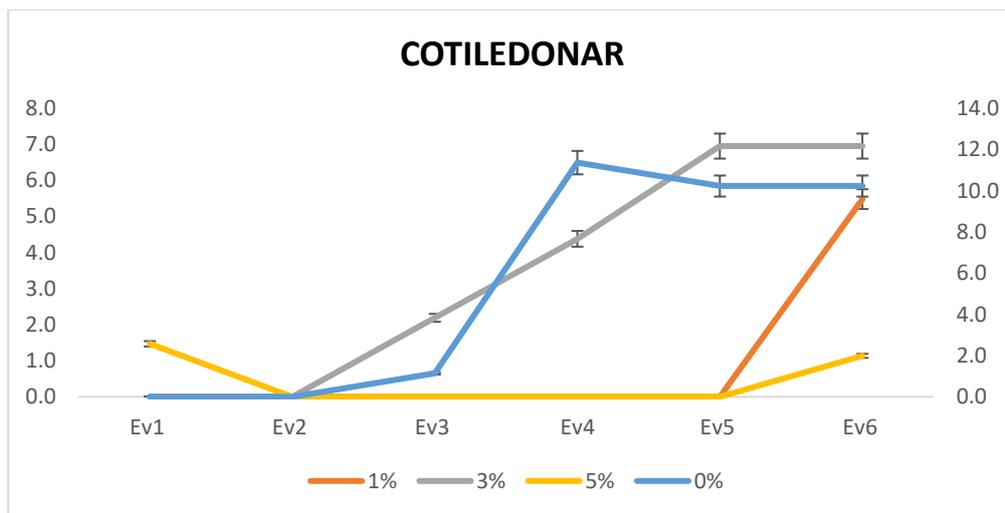
Los embriones corazón, dieron lugar a embrión torpedo en su evolución. El rango de frecuencia de este estadio comprendió desde 0% hasta 11.4% durante 63 días como se observa en la figura 12. El testigo fue el que formó un número mayor de embriones en etapa globular, empezando desde la evaluación 2 con una frecuencia de 1.1% y culminando en la evaluación 6, con una frecuencia de 11.4%. En cuanto al 1% de MAN, en la evaluación 5, se observó embriones en estado torpedo los mismos que pasaron a la siguiente etapa, en la evaluación 6 ya no se encontró embrión en estado corazón. Con el tratamiento al 3% de MAN, inició en la evaluación 2, con la formación de embriones en estado torpedo, a medida que pasaban los días, se observó una frecuencia mayor, en la evaluación 6 obtuvo un 6% de frecuencia de embriones en estado torpedo. El tratamiento con 5% de MAN, no formó ningún embrión en estado torpedo.



**Figura 12:** Frecuencia y comportamiento de embriones en estado torpedo en 6 evaluaciones por un periodo de 63 días

### **Frecuencia de embriones cotiledonar por tratamiento**

El estado torpedo, dio lugar al siguiente estadio, el cotiledonar, que es el estadio final, a partir de esta etapa ya se pueden formar plantas completas. El rango de frecuencia promedio que se obtuvo en este estadio va desde 0% hasta 11.4% al cabo de la evaluación 6, como se observa en la figura 13. Con el testigo, se logró obtener una mayor frecuencia de embriones cotiledonares, la formación de los embriones cotiledonares inició en la evaluación 3 con una frecuencia de 1.1%, en la evaluación 4 alcanzó el número más alto de frecuencia, con 11.4%, y en la evaluación 6, tuvo una frecuencia de 10.2%, considerándose con una frecuencia mayor que los demás tratamientos. El tratamiento con 1% de MAN en el medio, los embriones torpedo, aun pasaron a esta etapa en la evaluación 6 con una frecuencia de 5.5%. En cambio con 3% de MAN, los embriones en estado cotiledonar se formaron en la evaluación 3, con una frecuencia de 2.2%, y en la evaluación 6, este obtuvo una frecuencia del 7%. En cambio, en este último estadio, con 5% de MAN, se observó una frecuencia del 1.1% en la evaluación 6.



**Figura 13:** Frecuencia de embriones en estado cotiledonar en 6 evaluaciones por un periodo de 63 días.

Algunos de los resultados que se obtuvo se muestran en la figura 14:



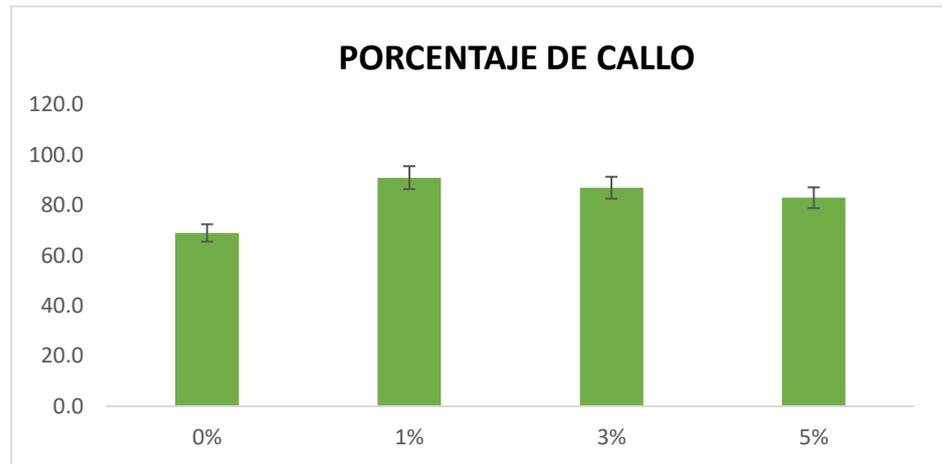
**Figura 14:** **A:** Embriones en estado cotiledonar en un medio libre de D-Manitol. **B:** Embriones en estado corazón y torpedo desarrollados en un medio con 3% de MAN.

### 3.3. D-Sorbitol (SOR)

#### Porcentaje de Formación de callos y frecuencia de callos embriogénicos

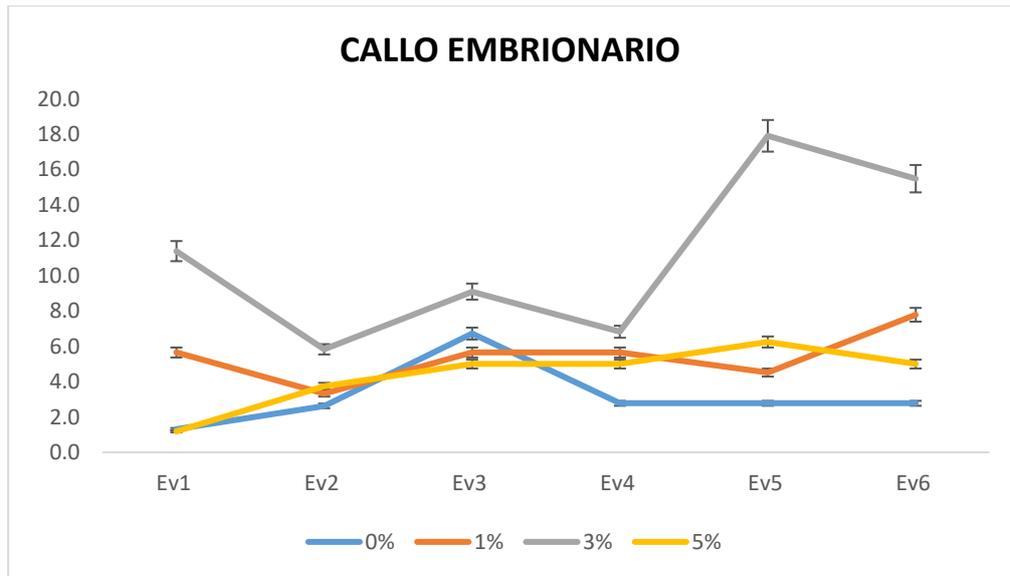
La formación de los callos en el medio SCG-2, se dieron en los primeros 14 días, obteniendo un buen porcentaje de formación de callos en los explantes inducidos (embrión en etapa torpedo y cotiledonar), los que dieron lugar a la siguiente etapa (formación de embriones). En la figura 15 muestra el porcentaje de formación de callos, a los 20 días de

inducción para embrión secundario, los mismos que se usaron para los tratamientos con los osmorreguladores. Los explantes formaron callos en un rango promedio del 69% hasta 91%. Cabe resaltar que esta evaluación fue realizada a los callos formados por los segmentos del embrión, libre de osmorreguladores en una etapa inicial de formación de embrión secundario.



**Figura 15:** Porcentaje de formación de callos durante 20 días en medio libre de SOR.

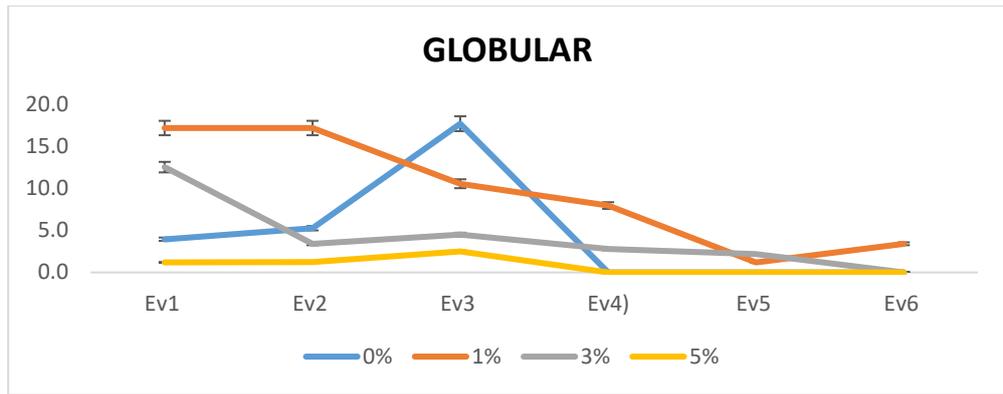
Los callos formados, dieron lugar a la formación de embriones, por lo que en la figura 16 se observa la frecuencia de los callos embrionarios, a través de las 6 evaluaciones que se realizaron. La frecuencia de respuesta a los osmorreguladores estuvo en rango amplio, que comprenden desde 1.2% hasta un 17.9 % de callos embriogénicos. En cuanto a la frecuencia de callos embriogénicos, se logró formación de embriones en todos los tratamientos incluyendo al testigo. El testigo, inició con una frecuencia de 1.3%, en cambio la frecuencia más alta se logró en la evaluación 3, y en la evaluación 6 se obtuvo 2.8% de frecuencia. Al 1% de SOR la frecuencia más alta se logró en la evaluación 6, en cuanto al 3% de MAN, en la evaluación 5, la frecuencia fue más alta con 7.9%, al igual que con el 5% de MAN, que obtuvo una frecuencia de 6.3% en la misma evaluación.



**Figura 16:** Frecuencia y comportamiento de callos embrionarios en 6 evaluaciones en un periodo de 63 días en un medio con SOR.

### **Frecuencia de embriones globulares por tratamiento**

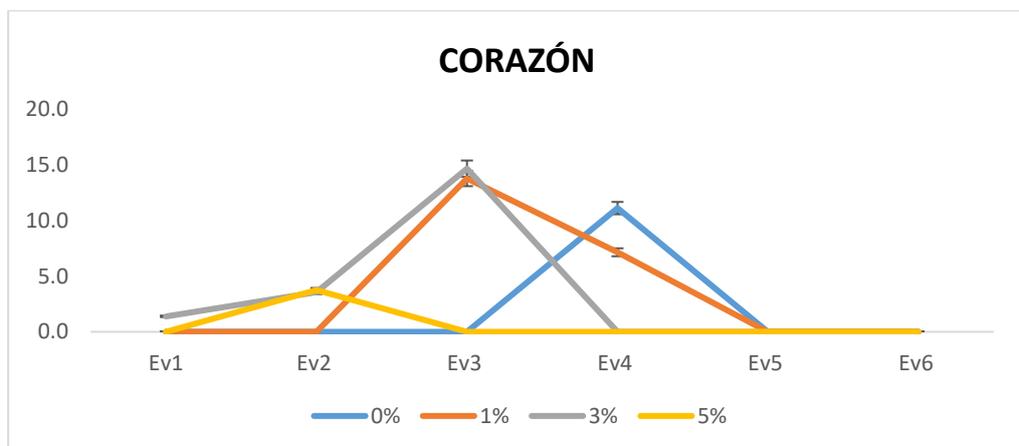
La formación de embriones en estado globular, con sorbitol en el medio inició a los 7 días en todos los tratamientos incluyendo al testigo, como se aprecia en la figura 17. El tratamiento testigo tuvo la frecuencia embrionaria más alta con 17.7% en la evaluación 3, en cambio con 1% de SOR en el medio se obtuvo una frecuencia de 17.2% en la primera evaluación, considerándose como el más alto, ya que a partir de esta evaluación, la frecuencia bajó llegando a 3.4% en la evaluación 6. Con 3% de SOR ocurrió algo similar al primer tratamiento, en la evaluación 1 se logró una frecuencia de 12.5%, a partir de la evaluación 2 este bajó hasta 0% y ya no se formó más embriones globulares, en cambio con 5% de SOR, el rango de frecuencia se mantuvo por debajo de los anteriores y del testigo.



**Figura 17:** Frecuencia y comportamiento de embriones en estado globular en 6 evaluaciones por un periodo de 63 días.

### Frecuencia de embriones corazón por tratamiento

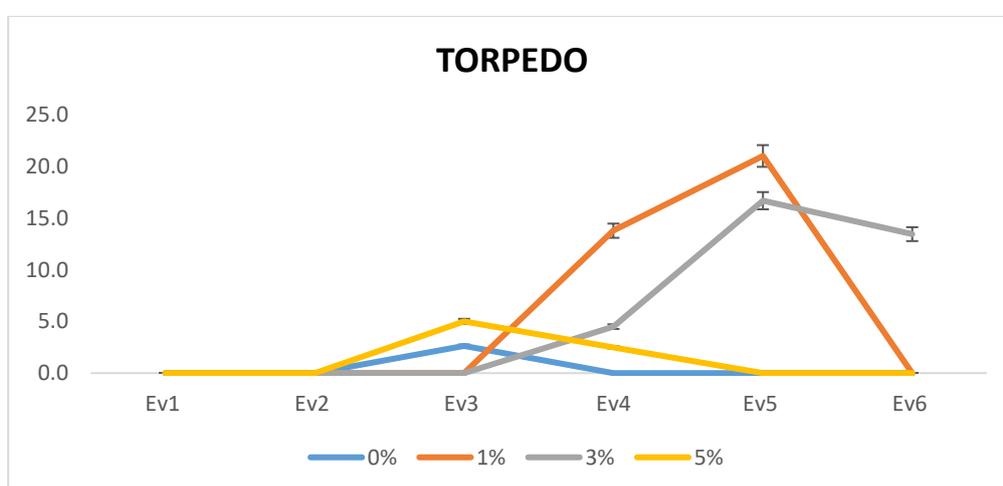
Los embriones globulares dieron lugar a los embriones en estado corazón, como se observa en la figura 18, el tratamiento con 1% de SOR, obtuvo la mayor frecuencia en la evaluación 3 con una frecuencia del 13.8%, en la evaluación 4 se obtuvo una frecuencia de 7.1%, a partir de esta evaluación dejó de producir embriones en estado globular. El tratamiento con 3% de SOR, inició con una frecuencia de 1.4%, en la evaluación 1 y finalizó con una frecuencia de 14.7% en la evaluación 4, considerando a este como su frecuencia más alta de embriones corazón. En cambio, el tratamiento con el 5% de SOR, solo obtuvo una frecuencia del 3.8% en la evaluación 2, dejando de producir más a partir de este.



**Figura 18:** Frecuencia de embriones en estado corazón en 6 evaluaciones por un periodo de 63 días.

### Frecuencia de embriones torpedo por tratamiento

Los embriones en estado corazón, evolucionaron a embriones en estado torpedo, estos obtuvieron un rango amplio de frecuencia, que va desde 0% hasta 21.7% en promedio como se observa en la figura 19. Con el tratamiento testigo, no se obtuvo muchos embriones, en la evaluación 3 tuvo una frecuencia del 2.6% de embriones torpedo, estos pasaron a la siguiente etapa, dejando de producir más embriones en este estado. En cambio con los tratamientos del 1% y 3% la producción de embriones inició en la evaluación 4, y con 5% de SOR, inició en la evaluación 3. La frecuencia más alta se logró con el tratamiento al 1%, con una frecuencia de 21% en la evaluación 5, a partir de entonces dejó de formar embriones en estado torpedo. Con 3% de SOR en el medio, la frecuencia más alta se logró también en la evaluación 5 con 16.7%, sin embargo, al cabo de la evaluación 6, este dejó de formar embriones. En cambio con 5% de SOR, la frecuencia más alta se obtuvo en la evaluación 3 con 5%, finalizando su producción en la evaluación 4, con una frecuencia del 2.5%.

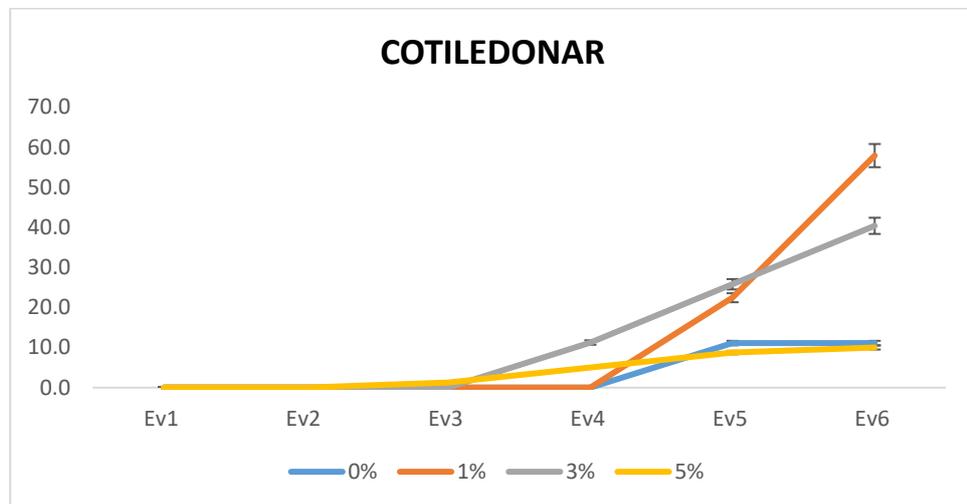


**Figura 19:** Frecuencia y comportamiento de embriones en estado torpedo en 6 evaluaciones durante un periodo de 63 días.

### Frecuencia de embriones cotiledonar por tratamiento

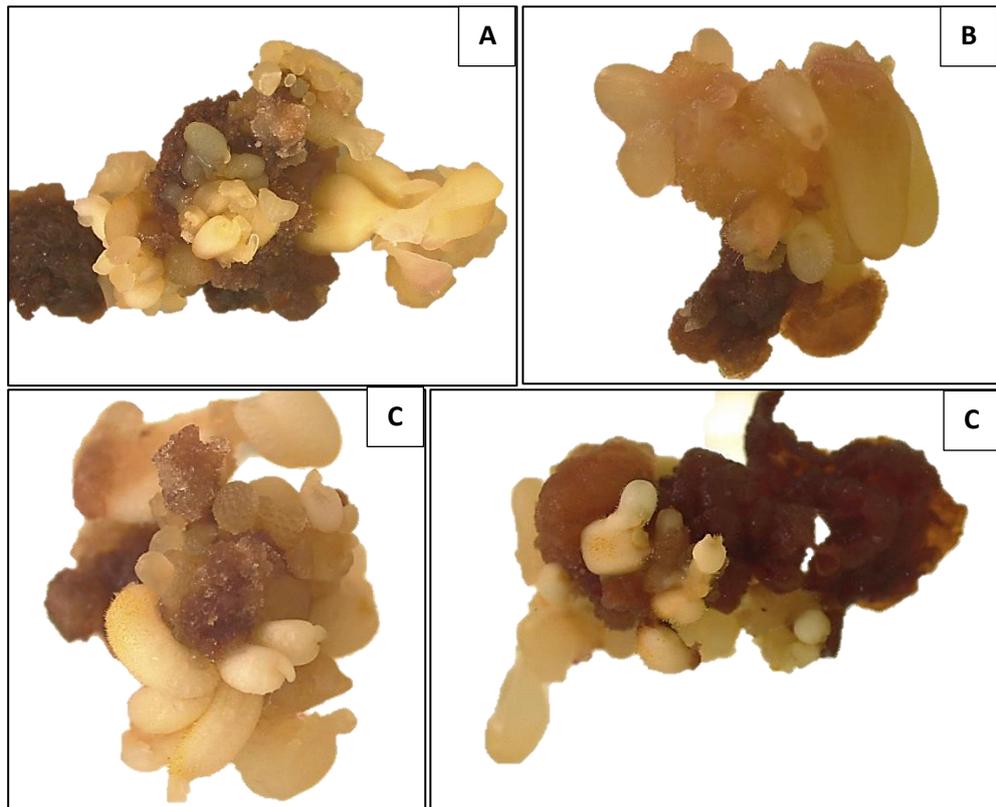
La frecuencia de los embriones cotiledonares con Sorbitol, estuvo en un rango muy variado, que va desde 0% hasta 57.9% como se observa en la

figura 20. El testigo, obtuvo una frecuencia de 11.1% en la evaluación 5, la más alta de un medio libre de SOR. Sin embargo la frecuencia más alta de los tratamientos se obtuvo con 1% de SOR en la evaluación 6, con 57.9%, este inició en la evaluación 5 con 22.4% de frecuencia. Con 3% de SOR en el medio la frecuencia de embriones cotiledonares inició en la evaluación 4 con 11.2%, alcanzando la frecuencia más alta en la evaluación 6 con 40.4%. El tratamiento con 5% de SOR en el medio obtuvo una frecuencia baja con respecto a los demás tratamientos, inició en la evaluación 3, 7 días antes que los demás, con una frecuencia del 1.3%, y finalizó en la evaluación 6, 10% de frecuencia de formación de embriones.



**Figura 20:** Frecuencia de embriones en estado cotiledonar en 6 evaluaciones durante un periodo de 63 días.

Algunos de las imágenes de los resultados que se obtuvo con D-Sorbitol, se muestran a continuación:



**Figura 21:** **A:** Formación de embriones torpedo y cotiledonares en presencia de D-Sorbitol al 1%. **B:** Embriones en estado cotiledonar, en presencia de SOR al 1%. **C:** Desarrollo de embriones en estado torpedo. **D:** Embriones desarrollados en un medio libre de SOR.

**4.2. Establecer la concentración óptima de como Poly (ethylene glicol) 6000, D-Manitol y D-Sorbitol favorece una mayor sincronía embrionaria en células friables de cacao**

El análisis de los resultados se realizaron usando los Modelos Lineales Generales y Mixtos (MLGM), se aplicó pruebas de comparaciones múltiples según LSD Fisher, para crear intervalos de confianza para todas las diferencias en parejas entre las medias de los niveles de los factores, controlando al mismo tiempo la tasa de error individual, para alcanzar el objetivo, los resultados se muestran de forma global para los tres osmorreguladores.

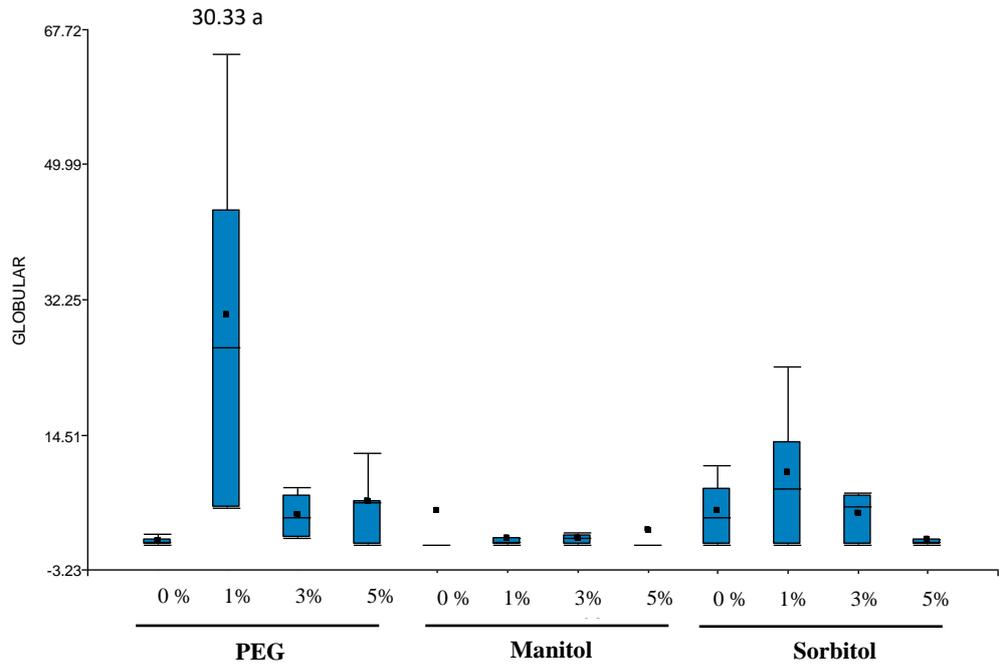
**T1:** 0% PEG, **T2:** 1% PEG, **T3:** 3% PEG, **T4:** 5% PEG, **T5:** 0% MAN, **T6:** 1% MAN, **T7:** 3% MAN, **T8:** 5% MAN, **T9:** 0% SOR, **T10:** 1% SOR, **T11:** 3% SOR, **T12:** 5% SOR.

### **Modelos Lineales Generales y Mixtos (MLGM) para la sincronía del estado globular**

Los resultados encontrados para concentraciones (Anexo 9.1, Tabla 5) muestran diferencias estadísticas significativas, lo que quiere decir que las concentraciones tienen un efecto sobre la sincronía de embriones globulares ( $p < 0.05$ ), donde la concentración al 1% de PEG obtuvo el promedio más alto con 13.61% de sincronía, y el menor con 2.85% con la concentración al 5% de Manitol.

El análisis de varianza indicó diferencias estadísticas significativas para la interacción de osmorreguladores por concentraciones ( $p < 0.05$ ). En la figura 22 se puede observar un boxplots (diagrama de cajas y bigotes), en la que se aprecia varias características importantes como la comparación de promedios de frecuencia de embriones, dispersión y simetría. También se observa que los bigotes de PEG al 1% no genera un área de influencia en común por lo que existe diferencia significativa con respecto a los demás tratamientos, por otro lado, se puede observar que los demás tratamientos comparten un área de influencia en común por lo que no existe diferencia significativa.

Dentro del grupo del PEG la concentración que mejores resultados presentó, fue al 1% con respecto a todos los tratamientos, con una media de 30.33. Para el grupo de Manitol se obtienen los valores más bajos para la frecuencia de embriones globulares, ya que el testigo presentó un media de 4.55, y para el grupo de Sorbitol el tratamiento con 1% de Sorbitol fue el que mejores resultados presentó con 9.57 (Figura 22).



**Figura 22:** Grafico de cajas y bigotes de frecuencias de embriones globulares, en la que muestra las áreas de influencia que genera cada boxplots.

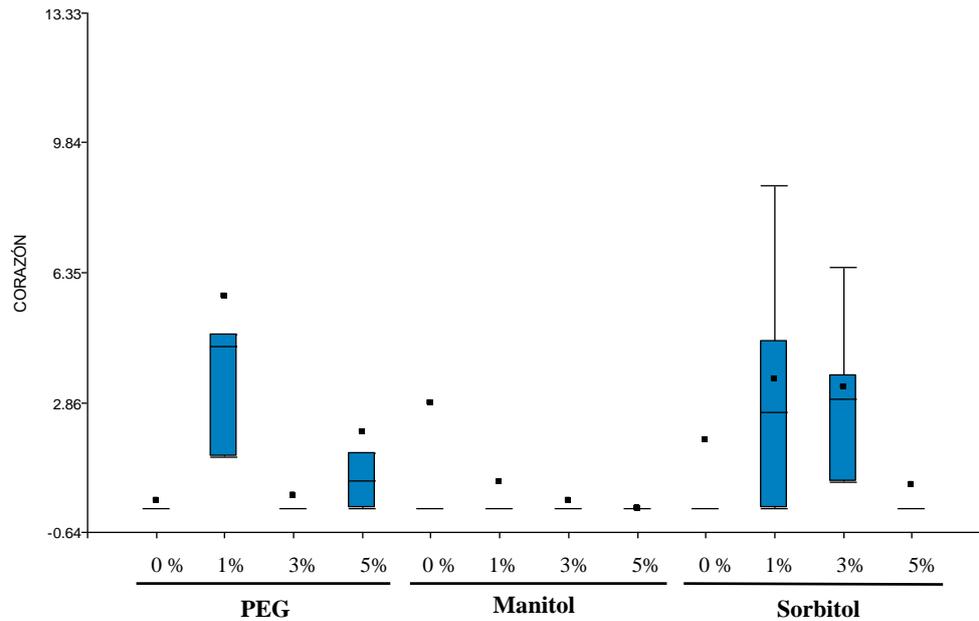
### **Modelos Lineales Generales y Mixtos (MLGM) para la sincronía del estado corazón**

Los resultados encontrados para los osmorreguladores (Anexo 9.1, Tabla 8), concentraciones e interacción de estos no muestran diferencias estadísticas significativas ( $p < 0.05$ ), lo que quiere decir que no tienen un efecto sobre la frecuencia de obtención de embriones corazón.

El análisis de varianza indicó que no existen diferencias estadísticas significativas para ninguno de los factores ni de las interacciones ( $p < 0.05$ ). En la figura 23 se puede observar un boxplots (diagrama de cajas y bigotes), en la que se aprecia varias características importantes como la comparación de sincronía de embriones, dispersión y simetría en la que se puede observar que los tratamientos comparten un área de influencia en común por lo que no existe diferencia significativa.

Dentro del grupo del PEG la concentración que mejores resultados presentó fue al 1% con respecto los demás tratamientos, con una media de 5.70. Para el grupo de Manitol se obtienen los valores más bajos para

la frecuencia de embriones Corazón, sin embargo el testigo presentó una media de 2.85, y para el grupo de Sorbitol el 1% fue el que mejores resultados presento con 3.48 (Figura 23).



**Figura 23:** Grafico de cajas y bigotes de frecuencias de embriones corazón, en la que muestra las áreas de influencia que genera cada boxplots.

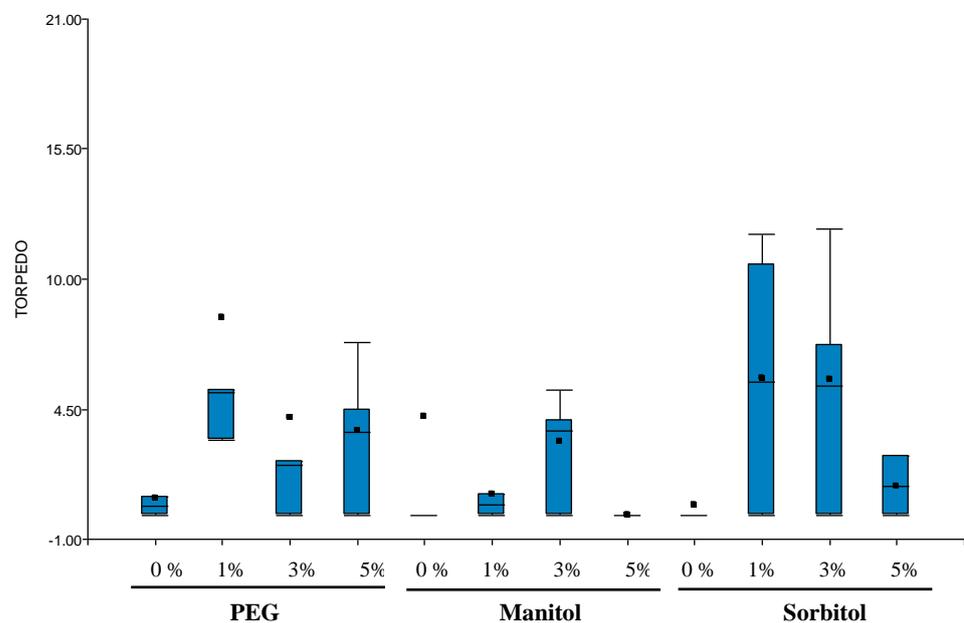
### **Modelos Lineales Generales y Mixtos (MLGM) para la sincronía del estado torpedo**

Los resultados encontrados para los osmorreguladores (Anexo 9.1, Tabla 10), concentraciones e interacción de estos no muestran diferencias estadísticas significativas ( $p < 0.05$ ), lo que quiere decir que no tienen un efecto sobre la sincronía de obtención de embriones Torpedo.

El análisis de varianza indicó que no existen diferencias estadísticas significativas para ninguno de los factores ni de las interacciones ( $p < 0.05$ ). En la figura 24 se puede observar un boxplots (diagrama de cajas y bigotes), en la que se aprecia varias características importantes como la comparación de sincronía de embriones, dispersión y simetría en

la que se puede observar que los tratamientos comparten un área de influencia en común por lo que no existe diferencia significativa.

Dentro del grupo del PEG la concentración que mejores resultados presentó fue al 1% con respecto a los demás tratamientos, con una media de 8.4. Para el grupo de Manitol se obtienen los valores más bajos para la frecuencia de embriones torpedo, sin embargo el testigo presentó una media de 4.18, y para el grupo de Sorbitol el 1% fue el que mejores resultados presento con 5.8 (Figura 24).



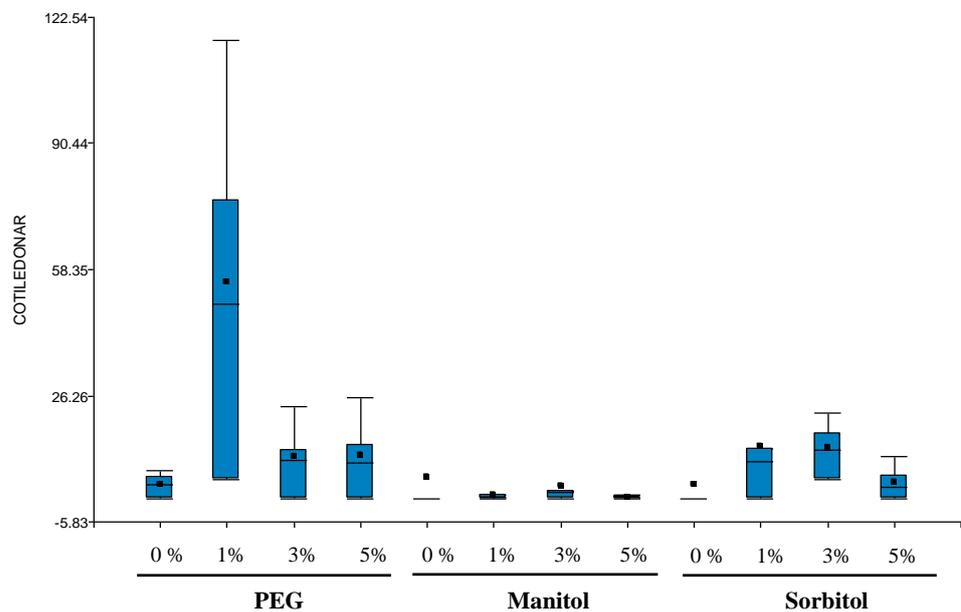
**Figura 24:** Grafico de cajas y bigotes de frecuencias de embriones torpedo, en la que muestra las áreas de influencia que genera cada boxplots.

### **Modelos Lineales Generales y Mixtos (MLGM) para la sincronía del estado Cotiledonar**

Los resultados encontrados para concentraciones (Anexo 9.1, Tabla 12) muestran diferencias estadísticas significativas, lo que quiere decir que las concentraciones tienen un efecto sobre la frecuencia de obtención de embriones cotiledonares ( $p < 0.05$ ), donde la concentración al 1% de PEG obtuvo el promedio más alto con 23.17% de sincronía, y el menor con 4,28% con la concentración al 5% de Manitol.

El análisis de varianza indicó diferencias estadísticas significativas para la interacción de osmorreguladores por concentraciones ( $p < 0.05$ ). En la figura 25 se puede observar un boxplots (diagrama de cajas y bigotes), en la que se aprecia varias características importantes como la comparación de sincronía de embriones, dispersión y simetría. También se observa que los bigotes de PEG al 1% no genera un área de influencia en común por lo que existe diferencia significativa con respecto a los demás tratamientos, por otro lado, se puede observar que los demás tratamientos comparten un área de influencia en común por lo que no existe diferencia significativa.

Dentro del grupo del PEG la concentración que mejores resultados presentó, fue al 1% con respecto a los demás tratamientos, con una media de 55.20. Para el grupo de Manitol se obtienen los valores más bajos para la frecuencia de embriones cotiledonares, ya que el testigo presentó un media de 5.50, y para el grupo de Sorbitol el tratamiento con 1% de Sorbitol fue el que mejores resultados presento con 13.38 (Figura 25).



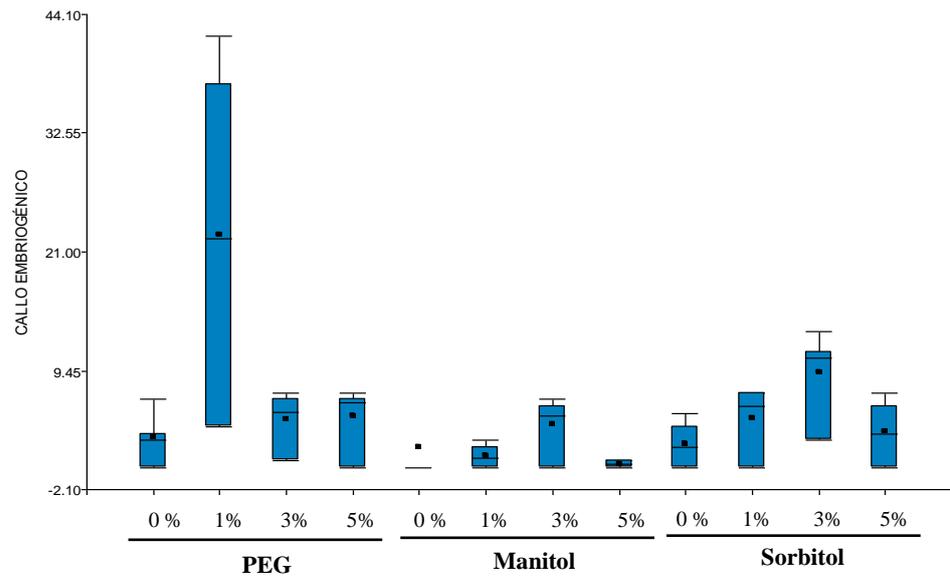
**Figura 25:** Grafico de cajas y bigotes de frecuencias de embriones cotiledonar, en la que muestra las áreas de influencia que genera cada boxplots.

### **Modelos Lineales Generales y Mixtos (MLGM) para la sincronía de callos embrionarios**

Los resultados encontrados (Anexo 9.1, tabla 16) para concentraciones muestran diferencias estadísticas significativas, lo que quiere decir que las concentraciones tienen un efecto sobre la formación de callos embrionarios ( $p < 0.05$ ), donde la concentración al 1% de PEG obtuvo el promedio más alto con 9.55% de formación, y el menor con 2.44% con el testigo del manitol.

El análisis de varianza indicó diferencias estadísticas significativas para la interacción de osmorreguladores por concentraciones ( $p < 0.05$ ). En la figura 26 se puede observar un boxplots (diagrama de cajas y bigotes), en la que se aprecia varias características importantes como la comparación de sincronía de embriones, dispersión y simetría. También se observa que los bigotes de PEG al 1% no genera un área de influencia en común por lo que existe diferencia significativa con respecto a los demás tratamientos, por otro lado, se puede observar que los demás tratamientos comparten un área de influencia en común por lo que no existe diferencia significativa.

Dentro del grupo del PEG la concentración que mejores resultados presentó, fue al 1% con respecto a los demás tratamientos, con una media de 22.65. Para el grupo de Manitol el que presentó mejores resultados fue al 3% con una media de 4.18, y para el grupo de Sorbitol el tratamiento con 3% de Sorbitol fue el que mejores resultados presento con 9.33 (Figura 25).



**Figura 26:** Grafico de cajas y bigotes de formación de callos embrionarios, en la que muestra las áreas de influencia que genera cada boxplots.

## IV. DISCUSION

Los embriones secundarios se producen por la diferenciación de células embriogénicas que se encuentran en las capas más externas de los embriones en desarrollo que continúan su división y forman nuevos centros meristemáticos (Ziv, 1999). Por otro lado la respuesta a embriogénesis secundaria es dependiente del genotipo por lo que la respuesta puede variar (Maximova et al, 2002), además, de acuerdo a Li et al (1998) y Maximova et al (2002) la embriogénesis secundaria tiene mucho potencial para incrementar la producción de embriones y mejorar la calidad, lo que genera bajos costos. Por este motivo se probó tres osmorreguladores, que mejoren la sincronía embrionaria en células friables de cacao.

Actualmente no existen reportes sobre sincronía embrionaria de células friables de cacao con el uso de osmorreguladores en Amazonas, sin embargo, hay autores que evaluaron la respuesta embriogénica de explantes de cacao, como por ejemplo Chanatásig (2004) que menciona que el tiempo de expresión de embriones secundarios es menor al de la aparición de embriones primarios, además, no hay diferencias significativas en cuanto a la respuesta de explantes globulares y cotiledonares según menciona Urrea et al (2011).

En cuanto a la sincronía embrionaria, es la principal desventaja de la embriogénesis somática cuando se pretende usar para propagación masiva de plantas de cacao, ya que se caracteriza por ser asincrónico (Martín, 2017), debido a esto, en la mayoría de los tratamientos, la sincronía que se obtuvo, fue relativamente baja, en cada estado del embrión.

### **4.1 Determinar la eficiencia de tres osmorreguladores como Poly (ethylene glicol) 6000, D-Manitol y D-Sorbitol en la sincronía embrionaria de células friable de cacao**

En investigaciones realizadas por Larqué y Trejo (1990), menciona que el potencial osmótico es uno de los componentes del potencial de agua y su determinación se basa en los cambios de propiedades físicas y químicas de este, debido a la presencia de solutos (propiedades coligativas de las soluciones); al aumentar la concentración de la solución, la presión osmótica también aumenta, el punto de congelación desciende, la presión de vapor disminuye y

el punto de ebullición aumenta, además Pierik (1990) señala que la concentración total de las sales de un medio de cultivo determina el potencial osmótico del medio. Otras investigaciones, mencionan que con la utilización de sustancias que disminuyan el potencial osmótico del medio de cultivo y que tengan poder de penetración celular se puede lograr una sincronía o estabilidad de los embriones según Yantcheva et al (1998), uno de ellos es el polietilenglicol (PEG).

Basándonos en las diversas investigaciones sobre osmorreguladores y su efecto en la formación de embriones, desarrollamos esta tesis, para experimentar con PEG, manitol y sorbitol a diferentes concentraciones en la formación de embriones secundarios.

Los mejores resultados se obtuvieron con 1% de PEG en el medio (10 g/l), ya que se logró una buena sincronía embrionaria en todos los estadíos del embrión; los cuales fueron 57.7% en promedio a los 14 días de inducción con embriones en estado globular, 19 % en promedio en el estado corazón, 22.8% en promedio del estado torpedo y en el estadío cotiledonar, se obtuvo también un promedio de 165.4%, los tres últimos estadíos generaron el mayor número de embriones a los 63 días de inducción, incluso, con esta concentración se logró obtener el mayor número de callos embriogénicos, llegando a un promedio del 31.6% a los 63 días. Los resultados obtenidos con este osmorregulador son debido a que las moléculas de PEG más grandes no son permeables a la pared celular, por lo que se someten a plasmólisis sin que éste logre ingresar a la célula, de esta forma se reduce la presión de turgencia y el potencial osmótico intracelular, como expone Von et al (2002), lo que explica el resultado obtenido con este osmorregulador, además otras investigaciones determinaron que con altas concentraciones de polietilenglicol (7.5%) dio como resultado un descenso en la frecuencia de germinación que atribuyen a la muerte de filas completas de células en el propio embrión, como describe Svobodová et al (1999).

Para el caso del manitol como osmorregulador, no existen muchas investigaciones, algunas son la de Barry *et al* (1989), en la cual observaron que la adición de manitol (3-4% p / v) evitó la lisis celular, aumentó en gran medida el número de embriones somáticos singulares de apio, ya que la disminución del potencial osmótico era un factor importante, pero no el único, ya que el

efecto del manitol podría manifestarse después de un período de exposición corto (2-3 días), sugiriendo un mecanismo de "activación" (inducción), además que con la presencia de 3% y 4% de manitol, lograron una formación de embriones del 39,5% y 47,4%, respectivamente. Hecho que no se observó en esta investigación, ya que el comportamiento del manitol fue muy variable y no se logró una sincronía de embriones secundarios, esto puede deberse al genotipo y tipo de explante.

El sorbitol tiene la capacidad de generar un estrés osmótico menos severo que otros osmorreguladores y se utiliza como fuente de energía para los explantes, según menciona Díaz et al (2015), existen muchas investigaciones en la que usan el sorbitol en la embriogénesis somática, sin embargo, en caso de embriogénesis somática en cacao, no se reportan investigaciones. Algunas de las investigaciones realizadas son las de Márquez et al (2003) en la que determinaron que en la palta, se obtuvo buenos resultados con el sorbitol más que con el polietilenglicol, con un máximo de 58.2% de regeneración en medio con 2.5% (p/v). Otras investigaciones, realizadas por Te-chato y Hilae (2007), también menciona que con el uso de sorbitol, mejoró la formación y germinación de embriones somáticos secundarios, al igual que las investigaciones en *Swietenia mahagoni* L. realizadas por Barbón et al (2012), también determinaron que la adición de sorbitol (20 y 40 g/l) combinado con 6-BAP al medio mejoró la obtención de embriones en *Swietenia mahagoni* L. por lo que se determinó que el sorbitol es uno de los agentes osmóticos que influyen en la obtención de embriones somáticos, y que la respuesta a este puede variar según las concentraciones y los genotipos, como se observa en el gráfico Grafico 15, Grafico 16, Grafico 17 y Grafico 18, que corresponden a los estadios de los embriones, en la que se determinó que para el cacao índice 52, la mayor formación de embriones secundarios se logró con sorbitol al 1%. resultados que no coinciden a los que se obtuvo con las investigaciones anteriores, ya que con el sorbitol se logró una frecuencia de embriones cotiledonares del 57.9% en promedio a los 63 días de inducido a embrión secundario (Grafico 18), sin embargo los mejores resultados se obtuvieron con el PEG.

#### **4.2 Establecer la concentración óptima de como Poly (ethylene glycol) 6000, D-Manitol y D-Sorbitol favorece una mayor sincronía embrionaria en células friables de cacao**

Estudios realizados por Chagas et al. (2018) sobre los efectos de un osmorregulador, carbohidratos y poliol sobre la maduración y germinación de embriones somáticos de papaya 'Golden THB', en la que usaron el polietilenglicol sobre la maduración del embrión somático de papaya 'Golden THB' en concentraciones de (0; 40; 50; 60 y 70 g L<sup>-1</sup>), obtuvieron como resultado que en diferentes concentraciones de PEG 6000, el número total de embriones somáticos, el número de embriones cotiledonares normales y el número de embriones cotiledonares germinados mostraron una diferencia significativa por la prueba F a un nivel de probabilidad del 1%, por lo que determinaron que la ausencia de PEG 6000 en la fase de maduración produjo el mayor número total estimado de embriones somáticos por callo (17,58) ya que con concentraciones crecientes de PEG, hubo reducción en el número de embriones somáticos totales en relación al control, lo que es similar a los resultados que se obtuvieron, ya que se encontró diferencias estadísticas significativas ( $p < 0.05$ ) para PEG al 1% en dos estadios del embrión, estado globular y estado cotiledonar ( figura 22 y 25), con una media de 30.33 en el estado globular y una media de 55.20 en el estado cotiledonar, incluso se obtuvo buenos resultados en la formación de callos embrionarios con una media de 22.65.

En cambio, con los tratamientos con manitol, no se observó diferencias significativas con ninguno de los tratamientos, sin embargo, las medias más altas con respecto a este osmorregulador se obtuvo con el testigo, hecho que se corrobora con la investigación realizada en *Dioscorea spp* por Díaz et al (2015) en la que buscaban establecer medios de cultivo óptimos para la conservación *in vitro* por crecimiento mínimo de diferentes accesiones pertenecientes al Banco de Germoplasma de ñame de la Universidad de Sucre, durante un periodo de 8 meses y con base en la modificación del medio de cultivo con distintos niveles de manitol y sorbitol de forma individual y combinada, afirmaron que el uso de diferentes agentes osmóticos afecta la supervivencia *in vitro* de la especie *D. alata*, en tal sentido, no es aconsejable el uso individual de manitol en el medio de cultivo de esta especie ya que ocasiona la muerte de

todos los explantes. Hecho que se corrobora en esta investigación, además Cárdenas y Villegas (2002) en su investigación sobre el potencial osmótico del medio de cultivo con diferentes componentes para la propagación *in vitro* encontraron que el uso del manitol como osmorregulador genera potenciales osmóticos más negativos. En otras investigaciones también corroboran este efecto del manitol, como es la realizada en *Eucalyptus globulus* Labill por Pinto et al (2002), con diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento, dentro de ellos el manitol, no lograron formación de callos, por lo que los resultados que se obtuvieron con este tratamiento, pueda deberse a que por la baja disponibilidad de nutrientes y de carbono, se produjo poca absorción de agua, que se generó en la reducción del potencial hídrico del medio al adicionar este osmorregulador y al genotipo, además Díaz et al (2015) también menciona que una combinación entre manitol y sorbitol, dan mejores resultados en cuanto a supervivencia, por lo que en los resultados obtenidos de los experimentos con Sorbitol, también no se evidencia diferencias estadísticas significativas con ninguno de los factores, lo que corrobora una vez más, el resultado de las investigaciones anteriores.

Cabe mencionar también que en cuanto al protocolo de García et al (2018) una adaptación del protocolo desarrollado por la Universidad de Pensilvania que usamos en esta investigación, se detalló en cuanto a la colecta de botones florales, para mejor entendimiento del mismo, además, para la preparación de la Kinetina y 6-Bencilaminopurina, que inicialmente se preparaba a una concentración de 10 mg/ml en la solución madre, se cambió a 1 mg/ml como se describe originalmente en el protocolo desarrollado por Penn State Cacao Research Lab, (2003), ya que a estas concentraciones se obtuvo mejores resultados para la obtención de embriones primarios y secundarios, ya que los reguladores de crecimiento son esenciales para la formación de embriones somáticos como menciona Márquez et al (2003).

Muchos de los resultados que se obtuvo, posiblemente fueron afectados por la pandemia global que se viene suscitando, ya que las subculturas (las subcultura recomendable es de 14 a 20 días) se atrasaban, por lo que muchos de los embriones desarrollados se usaron en etapas avanzadas de los estadíos (cotiledonar para obtener embriones secundarios), incluso muchos de ellos morían por la falta de medio, porque el ingreso a los laboratorios estaban restringidos.

## V. CONCLUSIONES

- En cuanto a la eficiencia de los osmorreguladores, el que mejores resultados mostró fue el PEG, con buenas sincronías y frecuencias altas en los diferentes estados del embrión secundario de cacao, con respecto a los demás experimentos; en cambio con el Manitol, no se logró buenos resultados, la respuesta de los callos fue baja en sincronía y frecuencia de embriones secundarios, al igual que con el sorbitol.
- La concentración de osmorreguladores que mejores resultados mostró en cuanto a sincronía embrionaria fue el PEG al 1% ya que se encontró diferencias estadísticas significativas en dos estadios del embrión, globular y cotiledonar, incluso se obtuvo buenos resultados en la formación de callos embrionarios; en cuanto al manitol y sorbitol, no se evidenciaron diferencias estadísticas significativas.

## **VI. RECOMENDACIONES**

- Se recomienda seguir con las investigaciones en embriogénesis somática en cacao, en cuanto a características físicas, recuento cromosómico, para verificar la variación somaclonal del embrión y otras técnicas de embriogénesis somática.
- Continuar con la investigación hasta obtener plantas completas y aclimatadas, para verificar el comportamiento de los explantes en campo.
- Experimentar con osmorreguladores y genotipos, diferentes a los trabajados en esta investigación.

## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

(s.f.).

Barbón, R., Borroto, I., La O, M., Quiala, E., & Pérez, M. (2012). Efecto de sorbitol y 6-BAP en la maduración y germinación de embriones somáticos *Swietenia mahagoni* (L.) Jacq. *Instituto de Biotecnología de las Plantas*, Vol. 13, Núm. 1.

BARRY L., N., ALTMAN, A., & ZIV, M. (1989). Regulation of somatic embryogenesis in celery cell. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 18:181-189.

Cárdenas , M., & Villegas , A. (2002). POTENCIAL OSMÓTICO DEL MEDIO DE CULTIVO CON DIFERENTES COMPONENTES PARA LA PROPAGACIÓN in vitro. *Revista Fitotécnica Mexicana*, 25 (2): 213-217.

CHAGAS, K., CIPRIANO, J. L., LOPES, J. C., SCHMILDT, E. R., OTONI, W. C., & ALEXANDRE, R. S. (2018). Los efectos de un osmorregulador, carbohidratos y poliol sobre la maduración y germinación de embriones somáticos de papaya 'Golden THB'. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 90 (4), 3433-3447.

Chanatásig Vaca, C. I. (2004). *Inducción de la embriogénesis somática en clones superiores de cacao (Theobroma cacao L.), con resistencia a enfermedades fungosas*. Turrialba, Costa Rica: Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza CATIE.

Díaz Narváez, L. C., Carmona Wilches , O. E., & Beltrán Herrera, J. D. (2015). Optimización de la conservación in vitro de germoplasma de *Dioscorea* spp por crecimiento mínimo. *Revista Colombiana de Biotecnología*,, 17(1), 32-39. Obtenido de <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v17n1.50842>

Dirección de Investigaciones- Gestión del conocimiento Científico del INIAP. (2019). Diagnóstico y prospectiva de la cadena de valor del cacao en América Latina y El Caribe. En V. Sánchez, J. L. Zambrano,

- & C. Iglesias, *La cadena de valor del Cacao en América Latina y el Caribe* (págs. 1-25). Quito, Ecuador: INIAP.
- Dirección General de Políticas Agrarias . (2019). *Commodities: Cacao- 2019*. Perú: MINAGRI-DGPA-DEEIA.
- Figueira, A., & Janick, J. (1993). Development of Nucellar Somatic Embrios of *Theobroma cacao*. *Acta Horticulturae* , 231-236.
- Florez, S. L., Erwin, R. L., Maximova, S. N., Gultinan, M. J., & Curtis, W. R. (2015). Enhanced somatic embryogenesis in *Theobroma cacao* using the homologous BABY BOOM transcription factor. *BMC Plant Biology*, 1-12.
- García, C., Marelli, J.-P., Motomayor, C., & Villela, J. (2018). Somatic Embryogenesis in *Theobroma cacao* L. . *Methods in Molecular Biology*, 227-245.
- Instuto Nacional de Innovación Agraria - INIA. (2019). *SISTEMATIZACIÓN DE LOS SUBPROYECTOS DE CACAO FINANCIADOS POR EL INSTITUTO NACIONAL DE INNOVACIÓN AGRARIA A TRAVÉS DEL PROGRAMA NACIONAL DE INNOVACIÓN AGRARIA*. Lima: Ministerio de Agricultura y riego.
- Larqué Saavedra, A., & C Trejo, L. (1990). El Agua en las Plantas. *Trillas*, 88.
- Li, Z., Abdoulaye, T., Maximova, S., & Gultinan, M. (1998). Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration from Floral Explants of Cacao (*Theobroma cacao* L.) Using Thidiazuron. *In Vitro Cell. Dev*, 293-299.
- Márquez Martín, B., Sánchez Romero, C., Perán Quesada, R., Barceló Muñoz, A., & Pliego Alfaro, F. (2003). FACTORES QUE AFECTAN A LA OBTENCIÓN DE EMBRIONES SOMÁTICOS BLANCO-OPACOS DE AGUACATE. *Proceedings V World Avocado Congress*, 97-102.

- Martín, D. (2017). Embriogénesis somática: una herramienta biotecnológica para la propagación in vitro de guayaba. *Biotecnología Vegetal*, Vol. 17, No. 4:209-220.
- Maximova, S. (2002). “Efficiency, genotypic variability, and cellular origin of primary and secondary somatic embryogenesis of *Theobroma cacao* L.”. *In Vitro Cell*, 252–259.
- Maximova, S., Alemanno, L., Young, A., Ferriere, N., Traore, A., & Gultinan, M. (2002). Efficiency, Genotypic Variability, and Cellular Origin of Primary and Secondary Somatic Embryogenesis of *Theobroma cacao* L. *In Vitro Cell. Dev., Biol-Plant* 38: 252-259.
- Otzen, T., & Manterola, C. (2017). Técnicas de Muestreo sobre una población a estudio. *International Journal of Morphology*, 227-232.
- Paredes, J., Canals, M., González, A., & Ventura, M. (2003). Evaluación de sustratos en el enraizamiento de estacas de cacao (*Theobroma cacao* L). *14th International Cocoa Research Conference Ghana 2003* (págs. 497-500). MY: Actas. Cocoa Producers´ Alliance. .
- PARROTT, W. (2002). La embriogénesis somática en las angiospermas. *VI Simposio Internacional de Biotecnología Vegetal* (págs. 7-15). Villa Clara, Cuba: Instituto de Biotecnología de las Plantas.
- PENN STATE CACAO RESEARCH LAB. (2003). *CACAO TISSUE CULTURE PROTOCOL BOOK*. Pennsylvania: The Pennsylvania State University.
- Pierik R, L. (1990). Cultivo in vitro de las Plantas Superiores. *Mundi-Prensa*, 326.
- Pinto, G., Santos, C., Neves, L., & Araújo, C. (2002). Somatic embryogenesis and plant regeneration. *CELL BIOLOGY AND MORPHOGENESIS*, 21:208–213. doi:10.1007/s00299-002-0505-5
- Quinn, G. P., & Keough, M. J. (2002). Experimental Design and Data Analysis for Biologists. *Experimental Design and Data Analysis for Biologists An essential textbook*, 527.

- S. Maximova, A. Young, Pishak S, Miller C, Traore A, & Gultinan M. J. (2005). INTEGRATED SYSTEM FOR PROPAGATION OF THEOBROMA CACAO L. *Forestry Sciences*, 1-14.
- Saldaña, P. (2019). *La producción de cacao peruano*. Salón del Cacao y del Chocolate.
- SVOBODOVÁ, H., ALBRECHTOVÁ, J., KUMSTYROVÁ, L., LIPAVSKÁ, H., VÁGNER, M., & VONDRÁKOVÁ, Z. (1999). Somatic embryogenesis in Norway spruce: Anatomical study of embryo development and influence of polyethylene glycol on maturation process. *Plant Physiol. Biochem*, 37(3): 209-221.
- Te-chato, S., & Hilae, A. (2007). High-frequency plant regeneration through secondary somatic embryogenesis in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq. var. *tenera*) . *Journal of Agricultural Technology*, 3(2): 345-357.
- Thorpe, T. A. (1980). Organogenesis in vitro: Structural, physiological and biochemical aspects. *International Review of Cytology, Supplement IIA*, 71-111.
- Urrea Trujillo, A. I., Atehortúa Garcés, L., & Gallego Rúa, A. M. (2011). Regeneración vía embriogénesis somática de una variedad colombiana élite de *Theobroma cacao* L. *Rev. Colomb. Biotecnol.* , Vol. XIII No.2:39-50.
- Urrea Trujillo, A. I., Atehortúa Garcés, L., & Gallego Rúa, A. M. (2017). Regeneración vía embriogénesis somática de una variedad. *Colom. Biotecnología*, 39-50.
- VON ARNOLD, S., SABALA, I., BOZHKOVA, P., DYACHOK, J., & FILONOVA, L. (2002). Vías de desarrollo de la embriogénesis somática. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 69: 233-249.
- Yantcheva, A., Vlahova, M., & Antanassov, A. (1998). Direct somatic embryogenesis and plant regeneration of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.). *Plant Cell Reports*, 18(1-2): 148-153. doi:10.1007/s002990050548

Ziv, M. (1999). Developmental and Structural Patterns of In Vitro Plants. In  
Soh, W; Bhojwani, S. eds. Morphogenesis in Plant Tissue Culture.  
*Kluwer Academic Publisher*, p 235-249.

## ANEXOS

### Resultados de Análisis de varianza usando Modelos Lineales Generales y Mixtos (MLGM)

**Tabla 4:** Resumen de medias

TRATAMIENTOS	Variable	n	Media	D.E.	CV	Mín	Máx
T1	GLOBULAR	4	0.6	0.7	123.8	0	1.4
T1	CORAZÓN	4	0.2	0.5	200.0	0	0.9
T1	TORPEDO	4	0.8	1.0	138.4	0	2.2
T1	COTILEDONAR	4	3.6	3.3	92.2	0	7.2
T1	CALLO EMBRIOGÉNICO	4	3.0	2.8	93.8	0	6.7
T1	CALLOS TOTALES	4	80.0	8.6	10.8	72	92
T10	GLOBULAR	4	9.6	11.1	115.9	0	23.5
T10	CORAZÓN	4	3.5	4.0	115.3	0	8.7
T10	TORPEDO	4	5.8	6.3	109.0	0	11.9
T10	COTILEDONAR	4	13.4	15.2	113.6	0	34.8
T10	CALLO EMBRIOGÉNICO	4	4.8	3.4	71.3	0	7.3
T10	CALLOS TOTALES	4	91.0	6.8	7.5	84	100
T11	GLOBULAR	4	4.2	3.2	74.9	0	6.8
T11	CORAZÓN	4	3.3	2.5	75.0	0.7	6.5
T11	TORPEDO	4	5.8	5.2	89.6	0	12.1
T11	COTILEDONAR	4	12.9	7.7	59.6	4.9	21.7
T11	CALLO EMBRIOGÉNICO	4	9.3	4.6	49.5	2.7	13.3
T11	CALLOS TOTALES	4	87.0	10.5	12.1	72	96
T12	GLOBULAR	4	0.8	1.2	142.9	0	2.5
T12	CORAZÓN	4	0.6	1.3	200.0	0	2.5
T12	TORPEDO	4	1.3	1.4	115.5	0	2.5
T12	COTILEDONAR	4	4.2	5.2	125.5	0	10.8
T12	CALLO EMBRIOGÉNICO	4	3.5	3.7	105.3	0	7.3
T12	CALLOS TOTALES	4	83.0	3.8	4.6	80	88
T2	GLOBULAR	4	30.3	28.9	95.3	4.8	64.5
T2	CORAZÓN	4	5.7	4.9	85.6	1.4	12.7
T2	TORPEDO	4	8.4	7.8	92.8	3.2	20
T2	COTILEDONAR	4	55.2	50.9	92.2	4.8	116.7
T2	CALLO EMBRIOGÉNICO	4	22.7	19.8	87.3	4	42
T2	CALLOS TOTALES	4	94.0	7.7	8.1	84	100
T3	GLOBULAR	4	4.0	3.6	90.0	0.9	7.6
T3	CORAZÓN	4	0.4	0.7	200.0	0	1.4
T3	TORPEDO	4	4.1	5.5	134.3	0	12.3
T3	COTILEDONAR	4	10.8	9.9	91.3	0	23.5
T3	CALLO EMBRIOGÉNICO	4	4.7	3.0	64.5	0.7	7.3

T3	CALLOS TOTALES	4	82.0	9.5	11.6	72	92
T4	GLOBULAR	4	5.8	4.9	85.0	0	12
T4	CORAZÓN	4	2.1	3.2	155.1	0	6.7
T4	TORPEDO	4	3.6	3.1	86.5	0	7.3
T4	COTILEDONAR	4	11.0	11.4	103.0	0	25.8
T4	CALLO EMBRIOGÉNICO	4	5.0	3.4	67.5	0	7.3
T4	CALLOS TOTALES	4	85.0	11.9	14.1	72	100
T5	GLOBULAR	4	4.6	9.1	200.0	0	18.2
T5	CORAZÓN	4	2.9	5.7	200.0	0	11.4
T5	TORPEDO	4	4.2	8.4	200.0	0	16.7
T5	COTILEDONAR	4	5.5	11.0	200.0	0	22
T5	CALLO EMBRIOGÉNICO	4	2.0	4.0	200.0	0	8
T5	CALLOS TOTALES	4	76.0	14.2	18.7	60	88
T6	GLOBULAR	4	0.9	1.3	142.7	0	2.8
T6	CORAZÓN	4	0.7	1.4	200.0	0	2.8
T6	TORPEDO	4	0.9	1.3	142.7	0	2.8
T6	COTILEDONAR	4	0.9	1.3	142.7	0	2.8
T6	CALLO EMBRIOGÉNICO	4	1.2	1.4	118.0	0	2.7
T6	CALLOS TOTALES	4	68.0	10.8	15.9	52	76
T7	GLOBULAR	4	0.9	0.7	78.6	0	1.6
T7	CORAZÓN	4	0.2	0.4	200.0	0	0.8
T7	TORPEDO	4	3.1	2.3	72.2	0	5.3
T7	COTILEDONAR	4	3.4	4.7	137.5	0	10.3
T7	CALLO EMBRIOGÉNICO	4	4.2	3.0	72.1	0	6.7
T7	CALLOS TOTALES	4	94.0	7.7	8.1	84	100
T8	GLOBULAR	4	2.0	3.9	200.0	0	7.8
T8	CORAZÓN	4	0.0	0.0	0.0	0	0
T8	TORPEDO	4	0.0	0.0	0.0	0	0
T8	COTILEDONAR	4	0.5	0.5	116.9	0	1
T8	CALLO EMBRIOGÉNICO	4	0.4	0.4	115.5	0	0.7
T8	CALLOS TOTALES	4	75.0	9.5	12.6	68	88
T9	GLOBULAR	4	4.5	5.3	118.9	0	10.5
T9	CORAZÓN	4	1.9	3.7	200.0	0	7.4
T9	TORPEDO	4	0.5	0.9	200.0	0	1.8
T9	COTILEDONAR	4	3.7	7.4	200.0	0	14.8
T9	CALLO EMBRIOGÉNICO	4	2.3	2.7	117.7	0	5.3
T9	CALLOS TOTALES	4	69.0	6.8	9.9	60	76

➤ **Estado globular**

**Tabla 5:** Prueba de hipótesis del estado globular

	<b>numDF</b>	<b>F-value</b>	<b>p-value</b>
(Intercept)	1	16.31	0.0003
OSMORREGULADORES	2	2.86	0.0705
CONCENTRACIONES	3	3.55	0.0237
OSMORREGULADORES:CONCENTRA..	6	2.48	0.0412

**Tabla 6:** Comparaciones multiples-fisher del estado globular

<b>CONCENTRACIONES</b>	<b>Medias</b>	<b>E.E.</b>
1%	13.61	2.81 A
0%	3.19	2.81 B
3%	3.03	2.81 B
5%	2.85	2.81 B

**Tabla 7:** Medias ajustadas y errores estándares para OSMORREGULADORES\*CONCENTRACIONES del estado globular

<b>OSMORREGULADORES</b>	<b>CONCENTRACIONES</b>	<b>Medias</b>	<b>E.E.</b>
PEG	1%	30.33	4.86 A
SOR	1%	9.57	4.86 B
PEG	5%	5.78	4.86 B
MAN	0%	4.55	4.86 B
SOR	0%	4.48	4.86 B
SOR	3%	4.23	4.86 B
PEG	3%	3.98	4.86 B
MAN	5%	1.95	4.86 B
MAN	1%	0.92	4.86 B
MAN	3%	0.9	4.86 B
SOR	5%	0.82	4.86 B
PEG	0%	0.55	4.86 B

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

➤ **Estado corazón**

**Tabla 8:** Prueba de hipótesis del estado corazón

Source	numDF	denDF	F-value	p-value
1 OSMORREGULADORES	2	36	0.97	0.3884
2 CONCENTRACIONES	3	36	1.51	0.2288
3 OSMORREGULADORES:CONCENTRA	6	36	1.5	0.2062

**Tabla 9:** Medias ajustadas y errores estándares para OSMORREGULADORES\*CONCENTRACIONES del estado corazón

OSMORREGULADORES	CONCENTRACIONES	Medias	E.E.
PEG	1%	5.7	1.49 A
SOR	1%	3.48	1.49 A
SOR	3%	3.28	1.49 A
MAN	0%	2.85	1.49 A
PEG	5%	2.05	1.49 A
SOR	0%	1.85	1.49 A
MAN	1%	0.7	1.49 A
SOR	5%	0.63	1.49 A
PEG	3%	0.35	1.49 A
PEG	0%	0.23	1.49 A
MAN	3%	0.2	1.49 A
MAN	5%	0	1.49 A

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

➤ **Estado torpedo**

**Tabla 10:** Prueba de hipótesis del estado torpedo

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	23.69	<0.0001
OSMORREGULADORES	2	0.91	0.4124
CONCENTRACIONES	3	1.78	0.1686
OSMORREGULADORES:CONCENTRA..	6	1.23	0.315

**Tabla 11:** Medias ajustadas y errores estándares para OSMORREGULADORES\*CONCENTRACIONES del estado torpedado.

OSMORREGULADORES	CONCENTRACIONES	Medias	E.E.
PEG	1%	8.4	2.27 A
SOR	1%	5.8	2.27A
SOR	3%	5.75	2.27A
MAN	0%	4.18	2.27A
PEG	3%	4.13	2.27A
PEG	5%	3.58	2.27A
MAN	3%	3.13	2.27A
SOR	5%	1.25	2.27A
MAN	1%	0.92	2.27A
PEG	0%	0.75	2.27A
SOR	0%	0.45	2.27A
MAN	5%	0	2.27A

➤ **Estado cotiledonar**

**Tabla 12:** Pruebas de hipótesis del estado cotiledonar

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	18.7	0.0001
OSMORREGULADORES	2	4.6	0.0167
CONCENTRACIONES	3	3.29	0.0315
OSMORREGULADORES:CONCENTRA..	6	2.6	0.034

**Tabla 13:** Medias ajustadas y errores estándares para OSMORREGULADORES

OSMORREGULADORES	Medias	E.E.
PEG	20.16	4.17 A
SOR	8.53	4.17 A B
MAN	2.57	4.17 B

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

LSD Fisher (Alfa=0.05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

**Tabla 14:** Medias ajustadas y errores estándares para CONCENTRACIONES

CONCENTRACIONES	Medias	E.E.
1%	23.17	4.82 A
3%	9.03	4.82 B
5%	5.21	4.82 B
0%	4.28	4.82 B

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

LSD Fisher (Alfa=0.05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

**Tabla 15:** Medias ajustadas y errores estándares para OSMORREGULADORES\*CONCENTRACIONES

OSMORREGULADORES	CONCENTRACIONES	Medias	E.E.
PEG	1%	55.2	8.35 A
SOR	1%	13.38	8.35 B
SOR	3%	12.9	8.35 B
PEG	5%	11.03	8.35 B
PEG	3%	10.8	8.35 B
MAN	0%	5.5	8.35 B
SOR	5%	4.15	8.35 B
SOR	0%	3.7	8.35 B
PEG	0%	3.63	8.35 B
MAN	3%	3.4	8.35 B
MAN	1%	0.92	8.35 B
MAN	5%	0.45	8.35 B

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

LSD Fisher (Alfa=0.05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

➤ **Formación de callos embrionarios**

**Tabla 16:** Prueba de hipótesis de formación de callos embrionarios

Source	numDF	denDF	F-value	p-value
1 OSMORREGULADORES	2	36	4.59	0.0167
2 CONCENTRACIONES	3	36	3.1	0.0388
3 OSMORREGULADORES:CONCENTRA..	6	36	3.14	0.0141

**Tabla 17:** Medias ajustadas y errores estándares para CONCENTRACIONES

CONCENTRACIONES	Medias	E.E.
1%	9.55	1.86 A
3%	6.06	1.86 A B
5%	2.95	1.86 B
0%	2.44	1.86 B

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

LSD Fisher (Alfa=0.05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

**Tabla 18:** Medias ajustadas y errores estándares para OSMORREGULADORES\*CONCENTRACIONES

OSMORREGULADORES	CONCENTRACIONES	Medias	E.E.
PEG	1%	22.65	3.23 A
SOR	3%	9.33	3.23 B
PEG	5%	5	3.23 B
SOR	1%	4.83	3.23 B
PEG	3%	4.68	3.23 B
MAN	3%	4.18	3.23 B
SOR	5%	3.5	3.23 B
PEG	0%	3	3.23 B
SOR	0%	2.33	3.23 B
MAN	0%	2	3.23 B
MAN	1%	1.18	3.23 B
MAN	5%	0.35	3.23 B

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

LSD Fisher (Alfa=0.05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

## Fotografías de colecta de botones florales



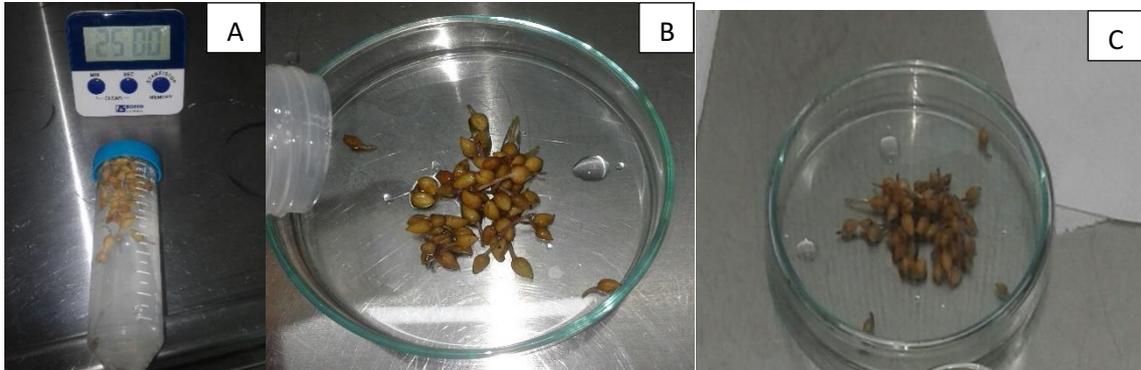
**Figura 27.** **A:** Plantaciones de cacao de la Universidad Nacional de San Martín; **B:** Planta de cacao seleccionado para planta madre; **C:** Planta madre seleccionada (MRC-05) para experimentos con tratamientos de osmorreguladores.



**Figura 28.** **A:** Selección de botones florales en buen estado; **B:** Colecta de botones florales, cortadas a 5mm de la base de la flor.



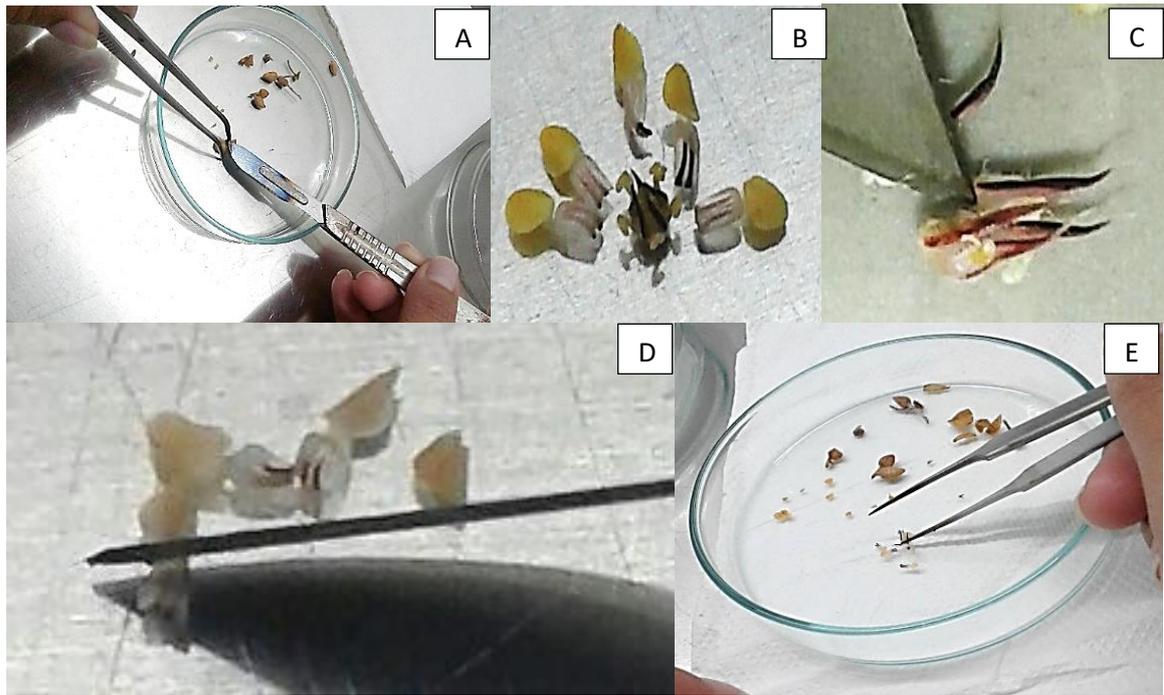
**Figura 29.** **A:** Corte de botones florales de cacao a 5 mm de la base.; **B:** Forma correcta de colocar el botón floral en el tubo d centrífuga.



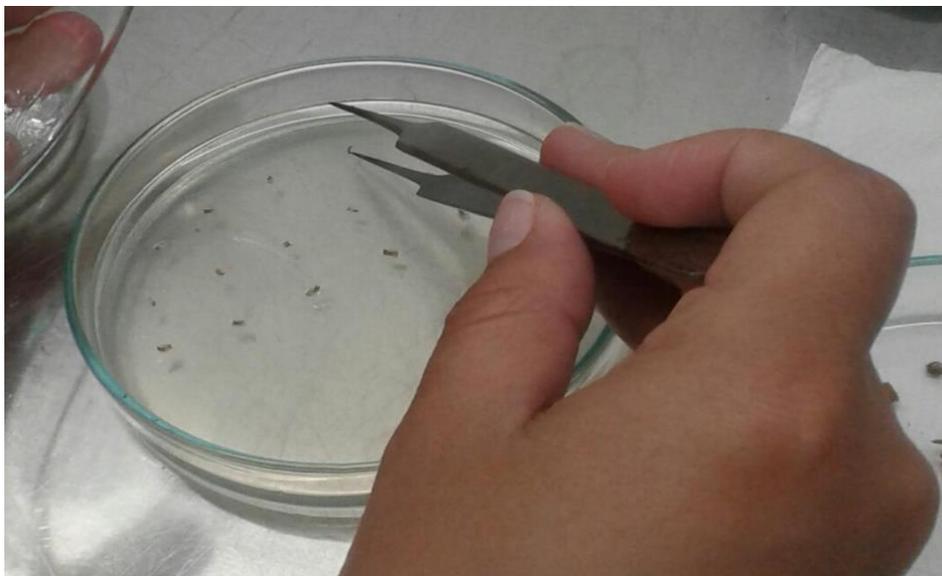
**Figura 30.** **A:** Desinfección de las flores con hipoclorito de calcio; **B:** Botones florales en placa petri después de ser lavados; **C:** Placa petri tapadas con botones florales.



**Imagen 2:** Disección de botón floral de cacao, a 1/3 de la longitud de la base de la flor.



**Figura 31.** **A:** Botones florales con sépalos; **B:** Estructura interna de la flor, gineceo y androceo; **C:** Estaminodios; **D:** Pétalos **E:** Pétalos y estaminodios separados.



**Imagen 3:** Base de pétalos en medio PCG.

## Fotografías de los experimentos realizados en el laboratorio



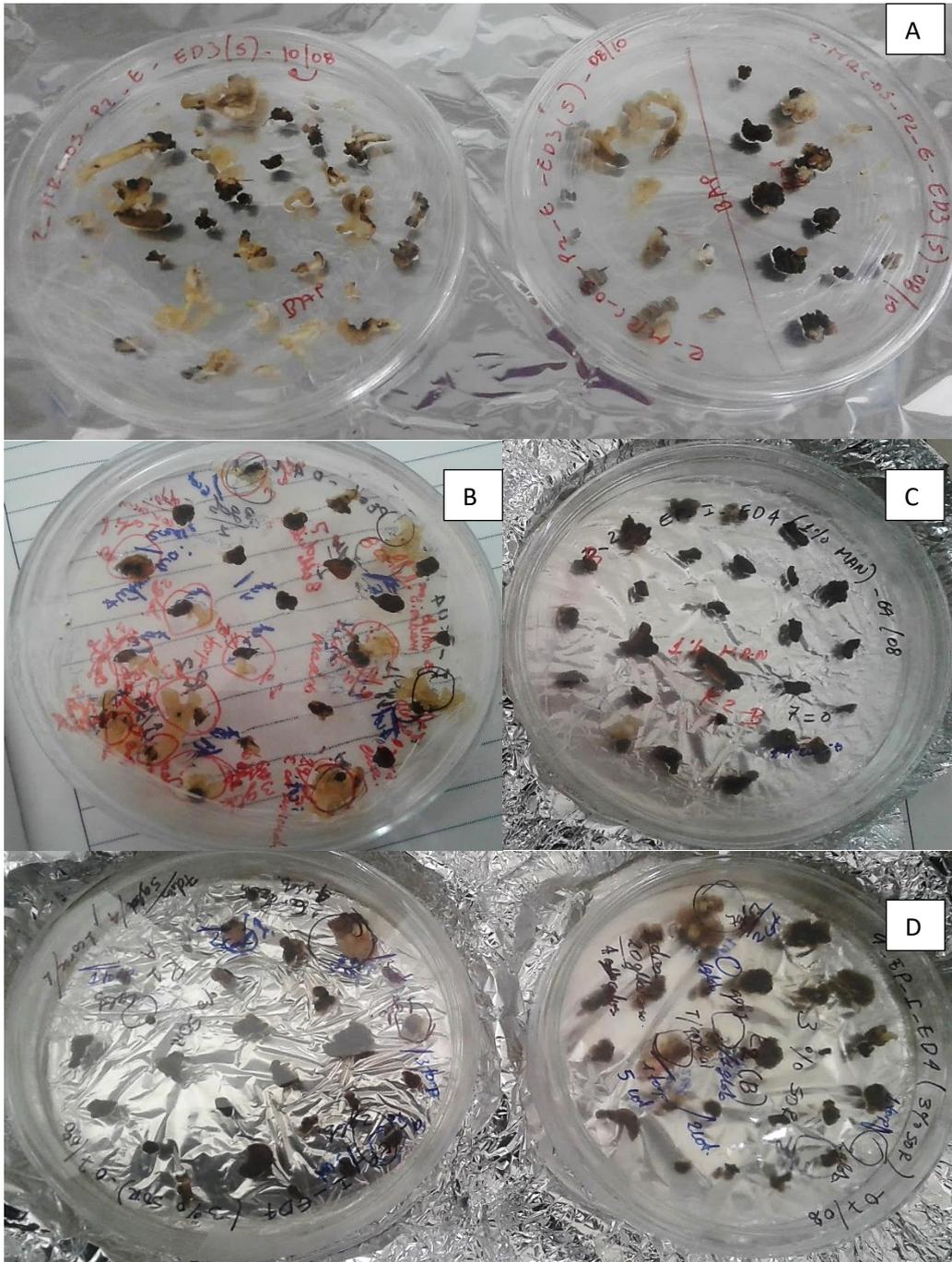
**Fotografía 1:** Preparación de medio en las placas petri, para los diferentes experimentos.



**Fotografía 2:** Colecta de botones florales del árbol MRC-05.



**Fotografía 3:** Se observa en la parte superior, embrión primario en estado torpedo y cotiledonar generados de estaminodios, y en la parte inferior, embriones secundarios generados de un segmento de embrión primario.



**Fotografía 4:** **A.** Embriones primarios listos para inducir a formación de callos. **B.** Embriones secundarios en desarrollo (etapa coriledonal) del PEG al 1%, R2. **C.** Baja formación de embriones secundarios con MAN al 1%.. **D.** Algunos embriones en formación con SOR al 3%.