



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES  
I Z T A C A L A

EMBRIOGENESIS SOMATICA EN Theobroma cacao L.  
Y ANALISIS COMPARATIVO DE ACIDOS GRASOS EN  
SEMILLAS MADURAS Y EMBRIONES SOMATICOS''

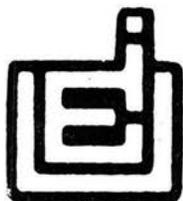
**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

**B I O L O G O**

P R E S E N T A :

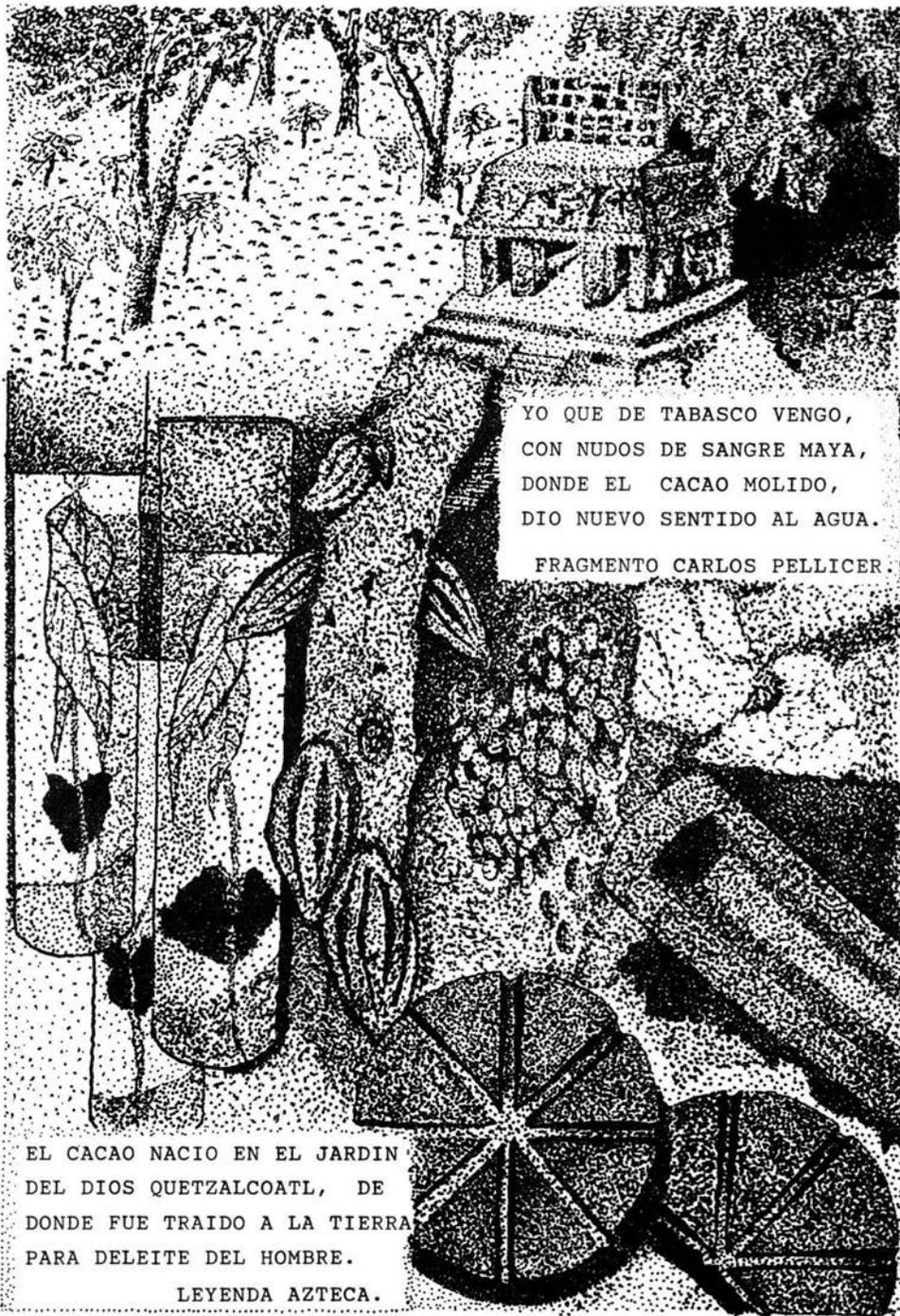
**CLAUDIA JUDITH HERNANDEZ GUERRERO**



MEXICO, D. F.

1992

LA PRESENTE TESIS FUE REALIZADA EN EL DEPARTAMENTO DE BIOFISICA, LABORATORIO DE CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES, DE LA ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLOGICAS DEL INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL, BAJO LA DIRECCION DE LA DRA. THELMA LILIA VILLEGAS GARRIDO.



YO QUE DE TABASCO VENGO,  
CON NUDOS DE SANGRE MAYA,  
DONDE EL CACAO MOLIDO,  
DIO NUEVO SENTIDO AL AGUA.

FRAGMENTO CARLOS PELLICER

EL CACAO NACIO EN EL JARDIN  
DEL DIOS QUETZALCOATL, DE  
DONDE FUE TRAIIDO A LA TIERRA  
PARA DELEITE DEL HOMBRE.

LEYENDA AZTECA.

A mis Padres.

Por su cariño, confianza y comprensión; mismos que hicieron realidad una de mis grandes metas, mi carrera profesional. "Gracias por ser tan maravillosos".

A mi hermana Lilliana

Con todo cariño, por su ayuda y apoyo en todo momento.

Con todo mi amor para Arturo por el cariño y confianza que siempre me ha brindado.

"A la Dra. Thelma L. Villegas G.,  
por su atinada dirección y consejo  
en la elaboración de este trabajo".

"Al Biol. P. Alejandro L. Andrade,  
por su valiosa y desinteresada  
ayuda".

"Al Profesor Marco A. Chávez,  
por su generosa asesoría en  
el análisis de cromatografía  
de gases".

"Al Dr. Paniagua, Jefe del Lab.  
de Investigación del Instituto  
Nacional de Higiene, por permi  
tir mi acceso al cromatógrafo"

"Al Profesor Andres García,  
por su asesoría en la parte  
estadística del presente tra  
bajo".

"A Irma Liliana Hernández G.,  
por la elaboración de la por  
tada de este trabajo".

"A Gabriel Obregón y Sandra Ojeda,  
por su ayuda y cariño".

"A mis amigos y compañeros de  
Laboratorio, quienes me pro-  
porcionaron su ayuda y buen  
humor en momentos difíciles".

"A ustedes que han estado conmigo en  
cada una de las etapas de mi vida,  
y que me han apoyado y ayudado  
cuando moralmente más lo he necesitado,  
con un agradecimiento eterno... "

## C O N T E N I D O

INDICE DE CUADROS	
INDICE DE DIAGRAMAS	
INDICE DE FIGURAS Y GRAFICAS	
INDICE DE TABLAS	
LISTA DE ABREVIATURAS	
RESUMEN	
	Pag.
I. INTRODUCCION	1
II. ANTECEDENTES	4
II.1 HISTORIA Y TRADICION DEL CACAO	4
II.2 CARACTERISTICAS BOTANICAS	6
II.3 CLASIFICACION DEL CACAO Y SU DISTRIBUCION EN MEXICO	9
II.4 EMBRIOGENESIS SOMATICA	13
II.5 ANTECEDENTES DEL CULTIVO IN VITRO DE CACAO.	15
II.6 ACIDOS GRASOS Y SU ANALISIS.	17
III. HIPOTESIS Y OBJETIVOS	
III.1 HIPOTESIS DE TRABAJO	23
III.2 OBJETIVO GENERAL	23
III.3 OBJETIVOS PARTICULARES	23
IV. MATERIALES Y METODOS	
IV.1 ESTABLECIMIENTO DEL CULTIVO DE TEJIDOS DE CACAO.	
IV.1.1 MATERIAL BIOLOGICO	25
IV.1.2 MEDIO DE CULTIVO	25
IV.1.3 METODO DE DESINFESTACION	26
IV.1.4 INCUBACION DE LOS CULTIVOS	26
IV.1.5 ESTUDIO PRELIMINAR DE EMBRIO GENESIS.	26
IV.1.6 DETERMINACION DE LA EDAD DEL INOCULO.	27

	Pag.
IV.1.7 ESTUDIO DE DIFERENTES TIPOS DE TEJIDO COMO INOCULO.	28
IV.1.8 DISEÑO FACTORIAL PARA SELECCIONAR EL MEDIO DE CULTIVO ADECUADO.	28
IV.1.9 ANALISIS ESTADISTICO DE RESULTADOS	29
IV.1.10 OPTIMIZACION DE LAS CONCENTRACIONES DE LOS REGULADORES DE CRECIMIENTO Y EDAD DEL INOCULO.	29
IV.1.11 ANALISIS POR SUPERFICIE DE RESPUESTA	30
IV.1.12 OPTIMIZACION PRELIMINAR DE LA COMPOSI CION DEL MEDIO DE CULTIVO.	30
IV.1.13 SEPARACION DE LA FASE DE INDUCCION Y DESARROLLO DE EMBRIONES SOMATICOS.	30
IV.1.14 EFECTO DE LA CONCENTRACION DE CARBONO EN EL DESARROLLO DE EMBRIONES SOMATICOS.	31
IV.1.15 EFECTO DE LA CONCENTRACION Y RELACION DE NITROGENO EN EL DESARROLLO DE EMBRIO NES SOMATICOS DE CACAO.	32
IV.1.16 ESTUDIO DE EMBRIOGENESIS SOMATICA EN CACAO CRIOLLO.	33
IV.2 ANALISIS DE ACIDOS GRASOS POR CROMATOGRAFIA DE GASES.	
IV.2.1 EXTRACCION DE LIPIDOS	33
IV.2.2 OBTENCION DE ESTERES METILICOS	33
IV.2.3 ESTABLECIMIENTO DE CONDICIONES PARA EL ANALISIS EN EL CROMATOGRAFO DE GASES.	36
IV.2.4 IDENTIFICACION DE ACIDOS GRASOS	36
V. RESULTADOS Y DISCUSION	
V.1 CULTIVO IN VITRO DE TEJIDOS DE CACAO	37
V.2 ANALISIS DE ACIDOS GRASOS POR CROMATOGRAFIA DE GASES.	64
VI. CONCLUSIONES	83
VII. BIBLIOGRAFIA	85
VIII. APENDICE	90

## INDICE DE CUADROS

CUADRO	II.1	ACIDOS GRASOS SATURADOS	19
CUADRO	II.2	ACIDOS GRASOS NO SATURADOS	20

## INDICE DE DIAGRAMAS

DIAGRAMA	IV.1	METODO I PARA EXTRACCION DE LIPIDOS	34
DIAGRAMA	IV.2	METODO DE FOLCH	35

## INDICE DE FIGURAS Y GRAFICAS

FIGURA	II.1	FORMAS DEL FRUTO DE CACAO	10
FIGURA	II.2	LOCALIZACION DE LAS ZONAS CACAOTERAS EN EL ESTADO DE TABASCO.	12
FIGURA	V.1	FORMACION DE CALLO A PARTIR DE EMBRIONES SEXUALES DE 2-4 mm DE LONGITUD.	39
FIGURA	V.2	EMBRIONES SOMATICOS EN DIFERENTES ETAPAS DE DESARROLLO.	48
FIGURA	V.3	EMBRIONES SOMATICOS DE CACAO OBTENIDOS AL SEPARAR LA FASE DE INDUCCION Y LA FASE DE DESARROLLO.	57
FIGURA	V.4	EMBRIONES SOMATICOS DE CACAO OBTENIDOS CON ALTAS CONCENTRACIONES DE CARBONO EN EL MEDIO DE CULTIVO.	60
FIGURA	V.5	PERFIL DE ACIDOS GRASOS EN SEMILLA MADURA DE CACAO. EXTRACTO CON ETANOL	65
FIGURA	V.6	PERFIL DE ACIDOS GRASOS EN SEMILLA MADURA DE CACAO. EXTRACTO CON CLOROFORMO-METANOL.	67
FIGURA	V.7	PERFIL DE ACIDOS GRASOS EN SEMILLA MADURA. EXTRACTO REALIZADO CON ACETATO DE ETILO.	68

FIGURA V.8	PERFIL DE ACIDOS GRASOS EN SEMILLA <u>MA</u> DURA. EXTRACTO CON HEXANO.	69
FIGURA V.9	PERFIL DE ACIDOS GRASOS EN SEMILLA <u>MA</u> DURA. EXTRACTO CON EL METODO DE FOLCH.	70
FIGURA V.10	EXTRACTO DE SEMILLA MADURA CON EL METO <u>DO</u> DE FOLCH Y COINYECTADO CON UN ESTAN <u>DAR</u> DEL ACIDO PALMITICO.	71
FIGURA V.11	EXTRACTO DE SEMILLA MADURA DE CACAO CON EL METODO DE FOLCH Y COINYECTADO CON UN ESTANDAR DEL ACIDO ESTEARICO.	72
FIGURA V.12	EXTRACTO DE SEMILLA MADURA CON EL METO <u>DO</u> DE FOLCH Y COINYECTADO CON UN ESTAN <u>DAR</u> DEL ACIDO OLEICO.	73
FIGURA V.13	EXTRACTO DE SEMILLA MADURA CON EL METO <u>DO</u> DE FOLCH Y COINYECTADO CON UN ESTAN <u>DAR</u> DEL ACIDO LINOLEICO.	74
FIGURA V.14	PERFIL DE ACIDOS GRASOS EN EMBRION <u>SO</u> Matico DE CACAO. EXTRACTO CON EL METO <u>DO</u> DE FOLCH.	75
FIGURA V.15	PERFIL DE ACIDOS GRASOS DE EMBRIONES SOMATICOS CULTIVADOS EN UN MEDIO SIN AGUA DE COCO. EXTRACTO CON EL METODO DE FOLCH.	77
FIGURA V.16	PERFIL DE ACIDOS GRASOS DE EMBRIONES SOMATICOS GENERADOS A PARTIR DE <u>EM</u> BRIONES SEXUALES BLANCOS.	78
FIGURA V.17	PERFIL DE ACIDOS GRASOS DE EMBRIONES SOMATICOS GENERADOS A PARTIR DE <u>EM</u> BRIONES SEXUALES BLANCO CON ROSA.	79
FIGURA V.18	PERFIL DE ACIDOS GRASOS DE EMBRIONES SOMATICOS GENERADOS A PARTIR DE <u>EM</u> BRIONES SEXUALES ROSAS.	80
GRAFICA V.1	SUPERFICIE DE RESPUESTA GENERADA EN EMBRIONES SEXUALES BLANCOS.	52

GRAFICA	V.2	SUPERFICIE DE RESPUESTA GENERADA EN EMBRIONES SEXUALES BLANCO CON ROSA.	53
GRAFICA	V.3	RESPUESTA Y RENDIMIENTO DE EMBRIONES SEXUALES DE CACAO SOMETIDOS A UNA FASE DE INDUCCION Y POSTERIORMENTE A LA DE DESARROLLO.	56
GRAFICA	V.4	RESPUESTA Y RENDIMIENTO DE EMBRIONES SEXUALES SOMETIDOS A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE CARBONO EN EL MEDIO DE CULTIVO.	59
GRAFICA	V.5	RESPUESTA Y RENDIMIENTO DE EMBRIONES SEXUALES DE CACAO SOMETIDOS A DIFERENTES CONCENTRACIONES Y RELACIONES DE NITROGENO EN EL MEDIO DE CULTIVO.	61

#### INDICE DE TABLAS

TABLA	IV.1	DISEÑO FACTORIAL DE 5 AUXINAS Y 2 CITO CINI <sup>Ñ</sup> AS.	27
TABLA	IV.2	DISEÑO FACTORIAL DE CONCENTRACIONES DE REGULADORES DE CRECIMIENTO AIB Y BAP.	29
TABLA	V.1	RESULTADOS OBTENIDOS A PARTIR DE EXPLAN <sup>Ñ</sup> TES VEGETATIVOS DE CACAO.	39
TABLA	V.2	TAMAÑO DEL FRUTO Y CARACTERISTICAS DE LOS EMBRIONES SEXUALES A LOS 70, 80, 90 100, 110 Y 120 DIAS DESPUES DE LA POLI <sup>Ñ</sup> NIZACION.	41
TABLA	V.3	RESULTADOS DE EMBRIONES SEXUALES DE FRUTOS DE 70 Y 80 DDP.	42
TABLA	V.4	RESULTADOS DE EMBRIONES SEXUALES DE FRUTOS DE 90 DDP.	42
TABLA	V.5	RESULTADOS DE EMBRIONES SEXUALES DE FRUTOS DE 100 Y 110 DDP.	44

TABLA V.6	RESULTADOS DE EMBRIONES SEXUALES DE FRUTOS DE 120 DDP.	44
TABLA V.7	RESULTADOS OBTENIDOS EN EL FACTORIAL DE EMBRIONES SEXUALES BLANCO, BLANCO CON ROSA Y ROSA TENUE.	45
TABLA V.8	RESPUESTA Y RENDIMIENTO OBTENIDOS A PARTIR DE EMBRIONES SEXUALES BLANCOS, BLANCO CON ROSA Y ROSA TENUE A LAS 8, 9 Y 10 SEMANAS DE INCUBACION.	47
TABLA V.9	RESPUESTA Y RENDIMIENTO OBTENIDOS A PARTIR DE EMBRIONES SEXUALES BLANCOS.	50
TABLA V.10	RESPUESTA Y RENDIMIENTO OBTENIDOS A PARTIR DE EMBRIONES SEXUALES BLANCO CON ROSA.	50
TABLA V.11	RESPUESTA Y RENDIMIENTO OBTENIDOS A PARTIR DE EMBRIONES SEXUALES ROSAS.	51
TABLA V.12	RESULTADOS DE EMBRIONES SEXUALES DE LA VARIEDAD CRIOLLO.	63
TABLA V.13	COMPARACION DE LOS PORCENTAJES OBTENIDOS EN LA MEZCLA PARA CADA ACIDO GRASO DE EXTRACTOS DE EMBRIONES SOMATICOS...	81

Principales abreviaturas utilizadas.

AIA	Acido indol-3-acético
AIB	Acido indolbutírico
ANA	Acido naftalen-acético
BAP	6-Bencil-aminopurina
CIN	Cinetina
DEGS	Diethyl glicol succinato
EDTA	Etilen dimetil tetracetato de sodio
MS	Murashige y Skoog
2,4-D	Acido 2,4-diclorofenoxiacético
Tr	Tiempo de retención

## R E S U M E N

EL cacao (Theobroma cacao) es un producto agrícola de gran importancia comercial, ya que a partir de sus semillas se extrae el material crudo para la manufactura de la cocoa, chocolate y manteca de cacao, la cual tiene una alta demanda de mercado.

Actualmente en México existe una problemática en la producción de cacao y los rendimientos son bajos, por lo que es posible utilizar la embriogénesis somática en cacao como una vía alterna para la propagación de genotipos; por otra parte también puede proporcionar un sistema experimental que permita investigar la síntesis de los compuestos responsables del sabor y aroma en la cocoa.

En el presente trabajo se siguieron dos líneas de investigación:

- a) Se estableció un sistema in vitro de embriogénesis somática directa en Theobroma cacao por medio del cultivo de embriones sexuales inmaduros, evaluando el efecto de los factores que influyen en la respuesta embriogénica, tales como: optimizar la composición del medio de cultivo, separar las fases de inducción y desarrollo de los embriones somáticos; variaciones en la concentración de la fuente de carbono, así como en la concentración y relación del nitrógeno.
- b) Se analizó el patrón de ácidos grasos de los embriones somáticos y se comparó con el de las semillas maduras, utilizando la técnica de cromatografía de gases.

Para la inducción de la embriogénesis se utilizaron diferentes explantes y tratamientos, observando que la respuesta embriogénica va a depender del grado de madurez del embrión sexual que se usa como explante y embriones sexuales derivados de frutos de 90 a 100 ddp fueron los que generaron la mejor respuesta. Utilizando el medio de cultivo (K)

suplementado con AIB (1.5 mg/1) y BAP (0.2 mg/1).

Se eliminó el agua de coco del medio de cultivo con el propósito de tener una composición más estable en el medio, observando que no existió un cambio en la respuesta y generación de los embriones somáticos.

Al separar las fases de inducción y desarrollo se obtuvieron embriones somáticos más normales, Siendo la fase de inducción de 3 semanas con reguladores en el medio de cultivo y la fase de desarrollo de 6 semanas sin reguladores en el medio de cultivo.

Se probó el efecto de diferentes concentraciones de carbono sobre la respuesta embriogénica. Se observó que altas concentraciones de carbono (45 y 60 g/1) en el medio de cultivo indujeron cambios en el desarrollo de los embriones somáticos; ya que estos van cambiando de coloración como ocurre in vivo.

La relación de nitrógeno  $\text{NO}_3/\text{NH}_4$  2:1 fue con la que se obtuvo una mejor eficiencia embriogénica en una concentración de 60 mM.

Con respecto al análisis lípidico, se presentó un patrón de 4 ácidos grasos, los cuales fueron palmítico, esteárico, oleíco y linoleíco tanto para semilla madura como para embrión somático, siendo para éstos en concentraciones más bajas. Por otra parte, el estado fisiológico del explante a partir del cual se generan los embriones somáticos tuvo influencia sobre el patrón de ácidos grasos en los embriones somáticos.

Considerando que los embriones somáticos presentaron síntesis de ácidos grasos, aunque a un nivel menor con respecto a la semilla, este trabajo plantea perspectivas para investigaciones posteriores enfocadas a incrementar la concentración de ácidos grasos, ofreciendo la posibilidad de producir la manteca de cacao in vitro.

## I. I N T R O D U C C I O N

Durante siglos el reino vegetal ha sido utilizado como una fuente de producción de compuestos químicos, los cuales han sido ampliamente aprovechados por el hombre, particularmente los productos alimenticios y farmacéuticos. En la actualidad existe una gran demanda de dichos productos y en muchos casos la disponibilidad de las especies vegetales para la extracción de un producto secundario particular puede estar limitada; dicha restricción puede estar condicionada por una amplia gama de factores y problemas agronómicos.

Actualmente en el campo de la Biotecnología se ha incrementado significativamente la producción de compuestos útiles a través del cultivo de tejidos vegetales, el cual se basa en el concepto de totipotencia, significando que cada célula de una planta tiene la capacidad genética de regular su división y diferenciación celular para crecer y así regenerar una planta completa (Street, 1979; Aitchison et al., 1979; Seabrook, 1980; Yee, 1983 EN: Evans, D.A. et al., 1984).

Existen diferentes tipos de cultivos asépticos de origen vegetal:

- a) Cultivo de plantas: se manejan plántulas o plantas completas.
- b) Cultivo de embriones: se utilizan embriones maduros o inmaduros.
- c) Cultivo de órganos: se usan órganos aislados, se pueden incluir los derivados de ápices de raíz y tallo, primordios florales y foliares, partes inmaduras de flores e incluso frutos tiernos.
- d) Cultivo de callosidades: se originan por la proliferación de fragmentos de órganos o tejidos de la planta.
- e) Cultivo en suspensión: en el cual células aisladas o en pequeños agregados se mantienen aisladas y crecen en un medio líquido.

Estos cultivos se realizan en medios nutritivos adecuados

y bajo condiciones ambientales controladas (Street, 1977).

La técnica de cultivo de tejidos vegetales ofrece muchas ventajas, dentro de las cuales podemos mencionar las siguientes:

- 1) Multiplicación vegetativa.
- 2) Los cultivos vegetales están disponibles todo el año independientemente de la distribución geográfica de la planta y de las condiciones climáticas.
- 3) Algunos productos naturales de interés económico que resultan difíciles de aislar de las plantas completas, o que tienen rendimientos muy bajos, pueden obtenerse a partir de esta técnica.
- 4) Estos cultivos se pueden programar para producir los productos deseados, controlando condiciones ambientales durante el crecimiento y de esta manera desviar actividades metabólicas.
- 5) Se pueden hacer estudios de fitopatología, así como investigación de resistencia ante ciertos agentes químicos.
- 6) Preservación del germoplasma.

En la industria alimenticia un producto de alta explotación es el cacao (Theobroma cacao L.) y su gran valor comercial se debe a que sus semillas proveen el material crudo para la manufactura de la cocoa, chocolate y para la extracción de la manteca de cacao, la cual tiene una alta demanda de mercado.

Desafortunadamente en la actualidad existen muchos problemas para su producción, se cree que una plantación joven (alrededor de unos veinte años) debe producir más de 1000 Kg por hectárea; sin embargo los rendimientos son bajos debido a diversos factores, de los cuales los más limitantes son las enfermedades, las plagas y el material genético no seleccionado (SARH, 1989). Además de que los granos de cacao no cumplen con las normas de calidad establecidas en los mercados extranjeros, lo cual ocasiona una gran pérdida de divisas al país.

La producción de nuevo material para las plantaciones en el cacao, al igual que en todas las especies perenes, es un proceso muy largo y lento. Se requiere mucho tiempo y esfuerzo para tener suficiente material para plantar en forma extensiva ó para producir la suficiente semilla, disponible al agricultor.

Una de las razones de que este proceso sea tan largo es el tiempo requerido para propagar los genotipos seleccionados. La practica más común de propagar el cacao es por enraizamiento de estacas, lo cual en este caso toma largo tiempo. Otro problema representa la cantidad de estacas a enraizar, puesto que, el número de cortes que se pueden hacer al material donador es limitado.

La embriogénesis somática en cacao puede utilizarse como una alternativa para la propagación de genotipos en periodos de tiempo más corto, reduciendo el uso de grandes cantidades de material vegetativo. Por otra parte, la embriogénesis somática puede proporcionar un sistema experimental que permita investigar la síntesis de los compuestos responsables del sabor y aroma en la cocoa.

## II. ANTECEDENTES

### II.1 HISTORIA Y TRADICION DEL CACAO.

El cacao es una planta de origen americano, aunque debido al sistema de vida nómada que siempre llevaron los primeros habitantes de este continente, es prácticamente imposible decir a ciencia cierta cuál fue el lugar exacto de su origen. Pero la calidad del material, encontrado originalmente por los españoles en México y luego en Mesoamérica fue indudablemente una de las razones por las que posteriormente se popularizó tanto. En esta zona se encuentran los materiales criollos que más influencia tuvieron en el desarrollo del cultivo, pues en el pasado fue la principal fuente de material de mejoramiento para la mayoría de las áreas donde hoy en día se produce cacao de calidad (Patiño, V.M., 1958; Hardy, F., 1961).

La historia del cacao se remonta a los albores del descubrimiento de América en 1492, ya que el viejo mundo no conocía nada acerca del delicioso y estimulante sabor del cacao que ha venido a ser el favorito de millones de personas en todos los continentes.

Cuando los europeos vieron por primera vez el cacao, este formaba parte de un cargamento a bordo de una canoa indígena que Colón encontró por casualidad en la Isla de Guanja, cerca de la costa de Honduras. Posteriormente, cuando los españoles llegaron a México se asombraron de las grandes cantidades de cacao que encontraron en los almacenes de Moctezuma y de la popularidad que tenía en su corte la bebida que se hacía de él. En sus cartas a España establecieron tan firmemente la conexión entre el cacao y los aztecas en las mentes de los europeos, que aún hoy se cree frecuentemente que los aztecas eran cultivadores de cacao, sin embargo esto no es cierto; los aztecas eran una raza de la región montañosa, cuya civilización floreció en un clima completamente inapropiado para el cultivo de cacao. Los mayas, por otra parte, eran una raza de tierra

baja que ocupaba los bosques húmedos al margen del imperio de los aztecas; los mayas fueron los verdaderos cultivadores de cacao, sabían curar y conservar las semillas y a partir de estas preparaban una bebida de chocolate; traficaban el producto con los aztecas, quienes aprendieron de ellos a apreciar sus singulares cualidades (Hardy, 1961).

Las palabras europeas para cacao y chocolate se derivan de la lengua nahuatl, así: cacao de "cacahuatl" y chocolate de "xocoatl". Las palabras aztecas a su vez tienen una historia compleja de derivación del maya ("Kaj"- amargo y "Kab"- jugo). La leyenda azteca sitúa el origen del cacao en el jardín del dios Quetzalcóatl, de donde fue traído a la tierra para deleite de los hombres. Linneo debe haber conocido esta leyenda cuando nombró el árbol "Theobroma" (alimento de los dioses). Como en su época el chocolate era popular en Europa, puede ser que hasta lo haya probado y haya considerado que el nombre era apropiado (Hardy, 1961).

Durante la conquista de México, Cortés observó el uso de las semillas de cacao por parte de los aztecas para la elaboración de la bebida llamada "chocolatl", sin embargo la bebida no tenía buen sabor, ya que era más bien de gusto amargo; resultó más agradable cuando a los españoles se les ocurrió hacerla de sabor dulce, agregándole azúcar. Al llegar a Europa la bebida tuvo más cambios antes de popularizarse su consumo; unos le agregaron canela, otros vainilla y finalmente determinaron que la bebida sabía mucho mejor si se servía caliente. Posteriormente se inventó la fase de agregado de leche al chocolate y se empezó a utilizar en repostería (Minifie, 1980).

El chocolate con leche es no solamente delicioso como golosina, sino que también posee un muy alto valor nutritivo, debido a su contenido de vitamina A, riboflavina (vitamina B2), vitamina D, proteínas, fósforo y hierro.

El chocolate hoy día es un aporte de la industria moderna que moviliza millones de dolares, en donde trabajan miles de

personas en las tostadoras y procesadoras del cacao.

En cuanto a la producción de cacao, durante los siglos XIV y XV México fue el principal productor, pero a finales del siglo XVI el cacao fue cultivado más intensamente en América Central y del Sur al igual que en las Islas Caribeñas. Hasta las primeras décadas de este siglo América producía más del 50% del cacao del mundo, luego Africa comenzó a incrementar su producción rápidamente hasta convertirse en el mayor productor, abasteciendo el 80% del cacao que se consume actualmente en el mundo.

En la actualidad México ocupa el noveno lugar como país productor, después de Costa de Marfil, Brasil, Malasia, Ghana, Nigeria, Camerún, Ecuador y Colombia (UNPC, 1988). Esto se debe a la problemática que existe en la producción y sólo manteniendo programas de investigación y fomento en forma constante, se puede aumentar la producción y la calidad del cacao.

## II.2 CARACTERISTICAS BOTANICAS.

El cacao, Theobroma cacao, cuya ubicación taxonómica es la siguiente:

Subreino	Embriophyta
División:	Anthophyta
Clase:	Dicotiledónea
Orden:	Malvales
Familia:	Sterculiaceae
Genero:	Theobroma
Especie:	cacao

Es un árbol que alcanza una altura de 6 a 8 metros, con excepción del cacao nacional del Ecuador y del Amelonado de Africa Occidental que algunas veces alcanzan alturas hasta de 12 metros. Su tronco crece ortotrópicamente (en forma vertical) hasta formar el primer verticilo entre unos 80 y 100 cm. de altura. Está cubierto por hojas pecioladas dispuestas en espiral. Pasado el primer año de vida de la planta, el tallo

desarrolla una serie de yemas axilares (hasta 8) que en forma conjunta forman lo que se llama el verticilo u horqueta. Posteriormente la yema terminal desaparece y se desarrollan de 4 a 6 ramas de crecimiento plagiotrópico (lateral). El crecimiento del tronco en altura se suspende un tiempo hasta que otra yema se desarrolla y forma lo que se llama "chupón", este se comporta en forma ortotrópica nuevamente, de la misma manera que el tronco original, hasta formar un segundo verticilo, lo que permite que el árbol pueda seguir creciendo casi indefinidamente. Las ramas laterales que crecen en forma plagiotrópica y en espiral, muy rara vez dan origen a un "chupón" y siempre crecen en forma de abanico; tienen en su punto de unión con las hojas, yemas que dan origen a otra rama lateral y también tienen una yema terminal cubierta por brácteas que caen al originarse un nuevo brote (Enríquez, 1985).

La mayoría de las hojas al formarse tienen pigmentación y el color varía desde muy pigmentadas hasta casi sin pigmento. Su tamaño puede variar mucho, pero en general está influenciado por el ambiente donde se desarrolla la planta: a menos luz más grande la hoja y viceversa.

Las inflorescencias se localizan en la base de las hojas, alrededor de la cicatriz y de la yema axilar que deja una hoja. El cacao es cauliflor, es decir que florece en las partes viejas o troncos maduros y en general es difícil encontrar genotipos que florezcan en ramas nuevas. Las primeras flores de un árbol, generalmente asoman pasados los tres años de vida; el cacao florece todo el año, pero hay algunas variedades que florecen solo durante una parte del año. En general el ambiente influye mucho para la floración, aunque el aspecto genético en ocasiones puede ser de mayor influencia, como sucede con algunos cacaos criollos.

La flor del cacao en general es pequeña, mide de 1 a 2 cm, es hermafrodita, pentámera y aparecen en grupos que forman ligeras prominencias en los troncos y ramas, que toman el

nombre de cojines florales.

El cacao difícilmente se puede autofecundar en la misma flor, pues los estambres se encuentran en posición opuesta al pistilo, además de que por su viscosidad se hace difícil la autopolinización. En general el cacao se poliniza por medio de insectos, es decir, presenta polinización entomófila. Esta función la realizan mosquitas del género Forcipomyia y algunos otros insectos de menor cuantía. Parece que la polinización no es factor limitante de la producción, sino que más bien hay un exceso de producción de frutos fecundados, lo cual es controlado por un fenómeno fisiológico que hace que algunos frutos se marchiten, formando lo que se denomina "cherelle wilt" o frutos marchitos, con lo que se regula el número de frutos en el árbol. Cuando existe un buen número de frutos desarrollándose en el árbol, la floración disminuye considerablemente y en algunos casos se suspende por completo.

Botánicamente el fruto del cacao es una drupa, pero comúnmente se le llama "mazorca". Es el resultado de la maduración del ovario una vez fecundado, está formado por la fusión de los cinco lóculos, cuyas paredes prácticamente desaparecen al madurar los granos, los cuales están cubiertos por una pulpa mucilaginoso azucarada cuando el fruto está maduro. Cada fruto puede tener un número muy variable de semillas. El fruto está sostenido por un pedúnculo leñoso, que es el resultado de la maduración del pedicelo de la flor; y su cáscara o pericarpio está formado por tres partes: el exocarpio o sección exterior, el mesocarpio y el endocarpio.

La semilla de cacao germina (en forma epigea) rápidamente al llegar a la madurez. La mayor parte de la semilla está constituida por dos cotiledones convueltos que contienen grasa, sustancias alcaloides, taninos y otras sustancias que al alterarse dan origen al sabor y aroma del chocolate.

La coloración típica del cotiledón es un carácter genético que está asociado al tipo de cacao. Puede variar desde el color blanco (Criollo) hasta el pigmentado (Amelonado), con

diferentes tonalidades y distribución de los colores (Enríquez, 1985).

### II.3 CLASIFICACION DEL CACAO Y SU DISTRIBUCION EN MEXICO.

Dentro de esta especie pueden diferenciarse tres grandes grupos genéticos: Criollo, Forastero y Trinitario. Las características principales de estos grupos según Bradeau (1970) son:

#### CRIOLLOS.

Tienen como característica típica, frutos de color verde, variando del verde claro al verde oscuro, con algunos tipos de color rojo. La forma de los frutos es generalmente de tipo angoleta, pero se encuentran también formas cundeamor (Fig. II.1). Las semillas son blancas o ligeramente pigmentadas con forma ovoide o cilíndrica.

Los árboles son bajos y poco robustos, la copa es redonda, las hojas pequeñas, ovaladas y gruesas son de color verde claro. Son muy susceptibles a la mayoría de las enfermedades.

#### FORASTEROS:

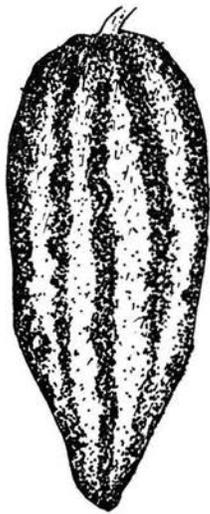
Se caracterizan por tener frutos ovoides, amelonados (Fig. II.1) con 10 surcos superficiales o profundos, son de color verde con tonos blanquecinos a rosa tenue. Las semillas son de color morado, triangulares en corte transversal, aplanadas y pequeñas.

Los árboles son más vigorosos, de follaje más grande e intenso y más tolerantes a enfermedades que los Criollos.

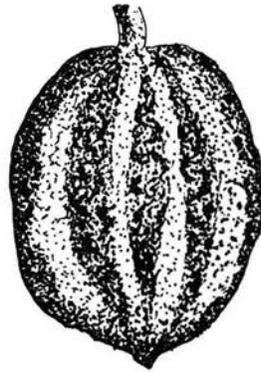
#### TRINITARIOS:

Sus características son difíciles de definir ya que se trata de una población híbrida muy poliforme donde se pueden observar todos los tipos intermedios entre los Criollos y los Forasteros.

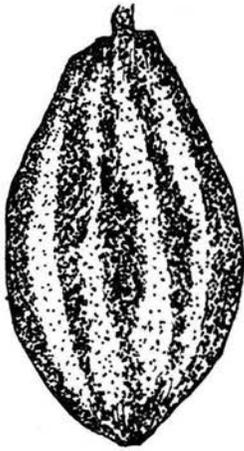
En México desde la época prehispánica y hasta la década de los treinta del presente siglo solo se cultivó el cacao Criollo; existiendo algunos cultivares de este grupo que se



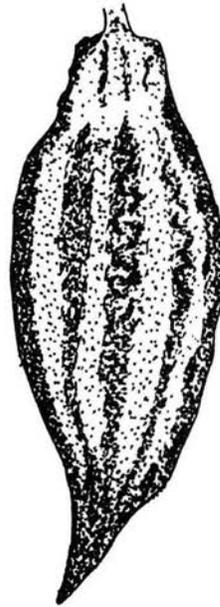
ANGOLETA



CALABACILLO



AMELONADO



CUNDEAMOR

FIG.II.1 Formas del fruto de cacao

clasifican de acuerdo a las características del fruto, reportándose el amarillo rugoso, el amarillo liso, el rojo claro rugoso, el rojo claro liso y el rojo oscuro (López, 1987).

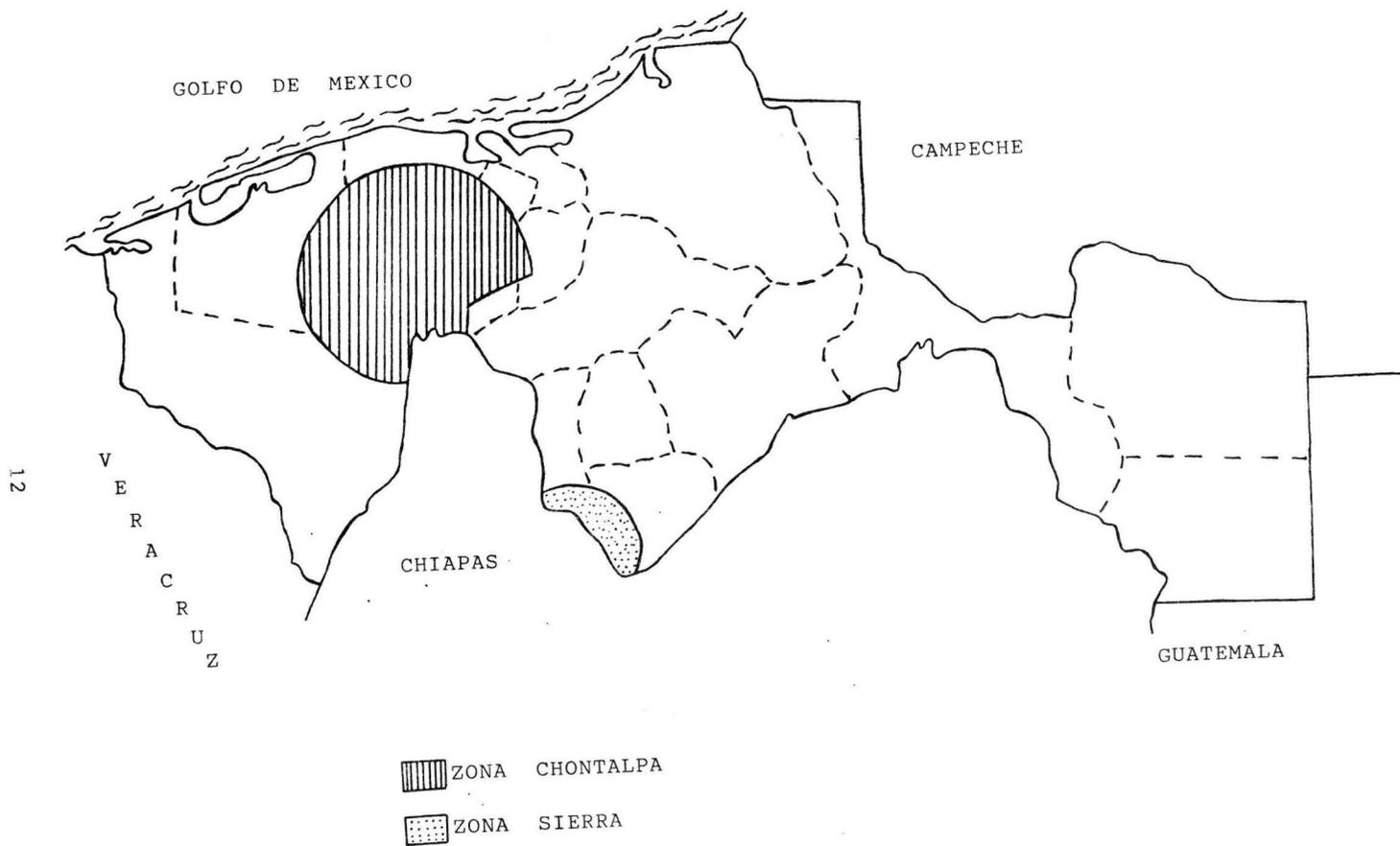
En 1930 se introdujeron los cacaos Forasteros y Trinitarios; de las variedades más importantes podemos mencionar al "Ceilán" que pertenece al grupo Trinitario, son árboles altos y de tronco grueso, con el fruto largo y ancho, terminando en punta en su extremo inferior y en ocasiones con cuello de botella en la base, las semillas son grandes y el color varía del blanco al morado, pasando por todos los matices.

Otra variedad denominada "Calabacillo", pertenece al grupo Forastero y desde el punto de vista botánico, se presenta como un árbol mediano y delgado, el fruto es el más chico de todas las variedades y tiende hacia la esfericidad, los granos son pequeños y aplanados de color morado oscuro y sabor muy astringente. Agronómicamente hablando, esta variedad con respecto a "Ceilán" es más resistente al exceso de humedad edáfica y de sol, el fruto es más tolerante a la pudrición negra. Pero su calidad es inferior debido a la astringencia y el tamaño del grano.

Una tercera variedad es la llamada "Guayaquil o Amelonado", la cual también pertenece al grupo Forastero; las características botánicas son: árbol mediano y delgado, el fruto es de longitud regular, grueso y de forma amelonada (Fig. II.1); contiene una gran cantidad de semillas, las cuales son grandes, redondeadas y de color morado. De las variedades antes mencionadas es la de mayor rendimiento (López, 1987).

En el país existen dos importantes regiones productoras de cacao, ambas localizadas en el estado de Tabasco, la primera se denomina Región Chontalpa, en ella se tiene el 95% del total de plantaciones de cacao en el estado. La segunda es la Región de la Sierra que cubre el 5% restante (Fig. II.2).

El tipo de clima de estas regiones es cálido húmedo con



**FIG.II.2** Localización de las zonas cacaoteras en el estado de Tabasco.

lluvias durante casi todo el año con distintas magnitudes. La temperatura media es de 26°C, con temperaturas altas de hasta 32°C en los meses de abril y mayo; en los meses de diciembre, enero y febrero en ocasiones se registran periodos cortos de temperaturas de 14°C.

Los suelos de estas regiones son de origen aluvial, profundos, con texturas francas y arcillo-arenosas, con buenas características físico-químicas, con pH de ligeramente ácido a neutro, con altos contenidos de materia orgánica en los primeros 20 cm de profundidad.

El árbol del cacao en su estado silvestre, se encuentra en los estratos bajos de la selva. El hombre al cultivar el cacao en forma comercial observó que existe una interacción compleja entre los factores que determinan la productividad de éste agroecosistema.

Entre los factores que más importancia tienen, esta la temperatura y la precipitación pluvial que sin lugar a duda son los que pueden limitar la zona para el cultivo, siendo considerados factores climáticos críticos para su desarrollo (Díaz, 1989).

El cacao es una planta muy importante para México, no sólo por su valor comercial sino también por su gran tradición en nuestro país, por lo que es importante realizar investigaciones para incrementar su cultivo, y la técnica de cultivo de tejidos vegetales a través de la embriogénesis somática puede acrecentar la regeneración de plantas, aumentando así la producción.

#### II.4 EMBRIOGENESIS SOMATICA.

La embriogénesis somática fue observada por primera vez en 1958 por Steward y Reinert en un cultivo de Daucus carota; a partir de esta fecha las investigaciones en el cultivo de zanahoria se incrementaron (Evans et. al., 1984) y el número de otras especies que fueron sometidas a un cultivo para obtener embriones somáticos aumentaron considerablemente.

El proceso de embriogénesis somática se puede definir como la formación de estructuras bipolares derivadas de una o varias células somáticas que no tienen conexión con el tejido que les dió origen y son capaces de regenerar una planta completa. Tal proceso ha sido observado en bastantes especies y familias, Tisserat et. al., citados por Ammirato (1984), reportan embriogénesis somática en 32 familias, 81 géneros y 132 especies.

Las etapas de la embriogénesis somática son similares a las del desarrollo de embriones cigóticos, siendo las principales: globular, corazón y formas torpedo. Estas etapas son conservadas en todas las plantas cotiledóneas.

Sharp et. al. en 1980 describen dos rutas de embriogénesis somática: la primera es la embriogénesis directa, en donde los embriones se inician directamente del tejido en ausencia de la proliferación de un callo; esto ocurre a través de "células determinadas pre-embriogénicas" (CDPE), las cuales tienen un destino embriogénico y sólo necesitan ser liberadas. La segunda ruta es la embriogénesis indirecta, en la cual se requiere la proliferación de algunas células (formación de callo); esto sucede en células no embriogénicas o "células determinadas embriogénicas inducidas" (CDEI).

La embriogénesis directa aunque ha sido reportada en varios cultivos es poco usual en comparación con el modo indirecto de la embriogénesis (Dixon, 1985 EN: Evans, 1984).

Halperin (1967) citado por Evans (1984), introdujo (en relación al cultivo de zanahoria) el concepto de que la realización de la competencia embriogénica (capacidad de expresar totipotencia inherente) ocurre durante la iniciación del cultivo a partir de el explante primario y que los embriones se desarrollan exclusivamente a partir de grupos celulares derivados de tales células en competencia.

El cultivo primario contiene mezclas de poblaciones de células competentes y células no competentes, lo cual explica porque los diferentes cultivos (aún de la misma planta y tipo

de explante difieren en su producción de embriones. Esto sugiere que la proliferación activa de las células competentes debe ser esencial para retener la capacidad de embriogénesis.

La capacidad embriogénica del cultivo se ve reflejada por la proporción de células competentes y esto depende de la composición del cultivo inicial y de la competición entre células competentes y no competentes del careotipo normal.

#### II.5 ANTECEDENTES DEL CULTIVO IN VITRO DE CACAO.

Hasta la fecha hay un número limitado de estudios sobre el cultivo de tejidos con Theobroma cacao. En general todos los intentos para la iniciación del callo de cacao han sido exitosos y el callo se ha obtenido rápidamente de varios explantes, en un amplio rango de medios de cultivo. Por lo contrario todos los intentos de regenerar plántulas partir del callo de cacao han fracasado.

Archibald (1954) fué el primero en realizar investigaciones en cacao, utilizando el cultivo de tejidos. El obtuvo callo a partir de explantes de corteza, teniendo como medio basal el de White sin adicionar ningún regulador del crecimiento.

El segundo intento de cultivar cacao in vitro fué realizado por Ibañez en 1964, citado por Evans et. al. (1984). Este autor determinó la acción de diferentes azúcares (sacarosa, dextrosa, maltosa, lactosa y sorbosa) en la tasa de respiración de los cotiledones de embriones maduros de cacao bajo condiciones estériles.

En 1974 Hall y Collin establecieron un nuevo método de desinfección, a partir del cual se obtiene un mayor porcentaje de explantes asépticos; también iniciaron la formación de callo a partir de explantes vegetativos (raíz, tallo, hipocótilo, cotiledón y yemas apicales), utilizando el medio de desarrollo de Murashige y Skoog (MS) modificado, controlando los efectos de luz y temperatura que limitan la formación de callo.

Posteriormente en 1975, Esan citado por Dublin (1984), promovió la embriogénesis asexual por medio del cultivo de embriones sexuales inmaduros y observó que aditivos del crecimiento, como el triptofano, provocan un mayor crecimiento en partes específicas del embrión.

En 1979 Pence, Hasegawa y Janick, determinaron que los embriones asexuales aparecen por dos procesos morfogénéticos distintos: el primero es un proceso "de brotación" en el cual el embrión asexual pasa a través de las etapas normales de la embriogénesis, iniciando con una estructura globular en un suspensor parecido a un tallo. El segundo es un proceso "de no brotación" donde estructuras semejantes a embriones o partes de embriones son diferenciados directamente de tejido cotiledonario meristemático.

En 1981 se realizaron estudios sobre el desarrollo cotiledonario de los embriones asexuales de cacao, los cuales se sometieron a un cultivo en suspensión y se observó que el desarrollo es muy similar al de los embriones cigóticos, demostrándose que los embriones asexuales pueden ser estimulados para sintetizar antocianinas y precursores de las antocianinas, similares a las de los embriones cigóticos al someterlos a altas concentraciones de sacarosa; los niveles de formación de antocianinas y ácidos fenólicos no presentan cambios significativos cuando reguladores del crecimiento son añadidos al medio basal, lo cual sugiere la posibilidad de que flavonoides (los cuales están muy relacionados con las antocianinas) y otros precursores del sabor del chocolate pueden ser sintetizados in vitro (Pence, Hasegawa y Janick, 1981).

Durante el mismo año se estimularon cambios en la composición de los ácidos grasos de los embriones asexuales, similares a los que ocurren en el embrión cigótico durante la maduración normal, esto se logró por medio del incremento de las concentraciones de sacarosa en el medio de cultivo (Pence, Hasegawa y Janick, 1981).

En 1984 se analizaron los factores que afectan el contenido y la composición de ácidos grasos de los embriones asexuales, observándose que al disminuir la concentración de las sales minerales del medio de desarrollo, disminuye el crecimiento del embrión, pero la acumulación de ácidos grasos no se ve afectada, sin embargo al aumentar la concentración de estas sales tanto el crecimiento como la acumulación de ácidos grasos se inhibe, teniendo los mismos resultados al eliminar nitrógeno orgánico e inorgánico, potasio y fósforo del medio (Wright, Kononowicz y Janick, 1984).

En el mismo año se observó que variaciones en la temperatura afectan la composición lipídica de los embriones asexuales inmaduros (Kinsella et. al., 1984).

También se determinó que altas concentraciones de sacarosa en el medio de cultivo regulan el inicio de la maduración del embrión, con lo cual se empiezan a acumular lípidos, antocianinas y alcaloides (Kononowicz y Janick, 1984).

Kononowicz y Janick en 1988 inclinaron sus estudios hacia la embriogénesis somática indirecta, utilizándola como un modelo para investigar los cambios a nivel celular que ocurren durante la transición del "callo" a la formación de los embriones, observando que el 2,4-D provoca un incremento significativo de las proteínas en células poliploides durante las primeras fases del desarrollo de embriones. También la transición de "callo" a la formación de embriones esta acompañada por un incremento de la endoreplicación del DNA y aparentemente esto permite la síntesis de proteínas en las células, lo cual parece ser necesario para que un "callo" de crecimiento desorganizado se transforme en un callo embriogénico.

## II.6 ACIDOS GRASOS Y SU ANALISIS.

Los ácidos grasos son las unidades básicas de las moléculas lipídicas; y se obtienen por la hidrólisis de las grasas. Los ácidos grasos que existen en las grasas naturales

generalmente contienen un número par de átomos de carbono y son de cadena lineal, la cual puede ser saturada o no saturada (Chapman, 1973).

Los ácidos grasos saturados teóricamente se pueden considerar como provenientes del ácido acético que sería el primer miembro de la serie (Cuadro II.1).

Por otra parte los ácidos grasos no saturados se pueden subdividir en tres categorías:

1) Ácidos monoinsaturados (monoetenoides), como son el ácido oleico y ácido palmitoleico que se encuentran en casi todas las grasas (Cuadro II.2).

2) Ácidos Poliinsaturados (polietenoides), con dos dobles ligaduras, tenemos el ácido linoleico el cual se encuentra en muchos aceites de semilla; con tres dobles ligaduras está el ácido linolénico el cual se encuentra generalmente con el ácido linoleico pero en particular en el aceite de linaza. Con cuatro dobles ligaduras el ácido araquidónico se encuentra en el aceite de cacahuete y de algunas semillas (Cuadro II.2).

3) Las Prostaglandinas (PG) existen virtualmente en todos los tejidos de los mamíferos y tienen importantes actividades fisiológicas y farmacológicas.

De los ácidos poliinsaturados, el ácido linoleico, linolénico y araquidónico son llamados ácidos grasos esenciales, debido a que es indispensable suministrarlos en la dieta para lograr una nutrición completa en muchas especies animales, sobre todo en la etapa lactante. Las funciones de los ácidos grasos esenciales parecen ser diversas, aunque no se encuentran bien definidas. Los ácidos grasos esenciales que se hallan en los lípidos estructurales de la célula están relacionados con la integridad estructural de la membrana mitocondrial y ocurren en concentraciones elevadas en los órganos reproductores (Martin et. al., 1982).

Se ha producido deficiencia de ácidos grasos esenciales en animales al igual que en el humano usando alimentaciones restringidas en ácidos grasos. Observando signos de deficiencia

Acético	$\text{CH}_3 \text{COOH}$	Principal producto final de la fermentación de carbohidratos.
Propiónico	$\text{C}_2\text{H}_5 \text{COOH}$	Un producto final de la fermentación de carbohidratos.
Butírico	$\text{C}_3\text{H}_7 \text{COOH}$	Existen en pequeñas cantidades en ciertas grasas (especialmente en la mantequilla). Un producto final de la fermentación de carbohidratos.
Caproico	$\text{C}_5\text{H}_{11} \text{COOH}$	
Caprílico	$\text{C}_7\text{H}_{15} \text{COOH}$	Existen en pequeñas cantidades en muchas grasas, especialmente de origen vegetal.
Cáprico (Decanoico)	$\text{C}_9\text{H}_{19} \text{COOH}$	
Láurico	$\text{C}_{11}\text{H}_{23} \text{COOH}$	Se encuentra en la canela almendra de palma, laurel y aceite de coco.
Mirístico	$\text{C}_{13}\text{H}_{27} \text{COOH}$	Se encuentra en nuez moscada, almendra de palma y
Palmítico	$\text{C}_{15}\text{H}_{31} \text{COOH}$	Comunes en todas las grasas de animales y plantas.
Esteárico	$\text{C}_{17}\text{H}_{35} \text{COOH}$	
Araquídico	$\text{C}_{19}\text{H}_{39} \text{COOH}$	En aceite de cacahuate y de algunas semillas
Acido Behénico	$\text{C}_{21}\text{H}_{43} \text{COOH}$	Semillas.
Lignocérico	$\text{C}_{23}\text{H}_{47} \text{COOH}$	En cerebrósidos, aceite de cacahuate.

**CUADRO II.1.** Acidos grasos saturados. (Martin, 1982).

Nombre	Fórmula	Disposición de dobles enlaces	Presencia
Palmitoleico (1 =)*	$C_{15}H_{29} COOH$	$\Delta 9 +$	Grasa de mantequilla.
Oleico (1 =)	$C_{17}H_{33} COOH$	$\Delta 9$	Aceite de oliva.
Linoleico (2 =)	$C_{17}H_{31} COOH$	$\Delta 9,12$	Aceite de semilla de lino.
Linolénico (3 =)	$C_{17}H_{29} COOH$	$\Delta 9,12,15$	Aceite de semilla de lino.
Araquidónico (4=)	$C_{19}H_{31} COOH$	$\Delta 5,8,11,14$	Lecitina

**CUADRO II.2.** Acidos grasos no saturados (Burton, 1977).

\* Número de dobles enlaces

+  $\Delta 9$  indica doble enlace entre carbonos 9 y 10  
12 entre carbonos 12 y 13, etc.

que incluyen desarrollo defectuoso, dermatitis, capacidad disminuida para reproducirse, menos resistencia al stress y alteración del transporte de los lípidos.

Por otra parte, los ácidos grasos esenciales son precursores de las moléculas llamadas prostaglandinas, que se encuentran en los tejidos animales, particularmente en las glándulas vesiculares de la oveja y en el líquido seminal de la oveja y del hombre, y estas son poseedoras de importantes propiedades fisiológicas (Martin et. al., 1982).

Para separar e identificar ácidos grasos, la cromatografía de gases es una valiosa técnica instrumental; la primera separación por cromatografía de gases fue llevada a cabo por James y Martin en 1957, citados por Chapman (1973).

La cromatografía en gas-líquido implica la separación física de una fase gaseosa en movimiento adsorbida sobre una fase estacionaria, que corresponde a un sólido inerte. Los ácidos grasos pueden ser analizados como ácidos libres o como ésteres metílicos. Debido a que los lípidos contienen un gran espectro de ácidos grasos, el uso de sus ésteres metilados es el método de análisis más importante, ya que puede obtenerse una mayor separación cuando se trabaja con ácidos grasos de cadena larga y altamente insaturados.

En la práctica se llena una columna de vidrio o metal con el sólido inerte, hay columnas polares y no polares; dentro de las polares las más comunes son las de poliésteres, como la dietilenglicol succinato (DEGS) o dietilenglicol adipato (DEGA); estas columnas dan una separación completa de los ácidos grasos incluyendo aquellos con dobles enlaces. Las columnas no polares más comunes son de polímeros de silicona, como SE-30 y grasas hidrocarbonadas como apízon L.; la primera separa ácidos saturados mientras que la segunda a los insaturados excepto aquellos con 2 o 3 dobles enlaces (linoleico y linolénico).

A través de la columna se evapora una mezcla de los

ésteres metílicos de ácidos grasos. La columna se puede mantener a una temperatura de 170°C a 225°C. A los ésteres volatilizados se les mueve mediante una corriente constante de gas inerte. La separación de los ésteres de los ácidos grasos evaporados depende, como en otras técnicas cromatográficas, de las diferentes afinidades de los componentes de la mezcla gaseosa por la fase estacionaria. Los gases con mayor afinidad hacia la fase estacionaria se mueven con mayor lentitud a través de la columna y consecuentemente, alcanzan el extremo final después que aquéllos con afinidad relativamente menor.

A medida que sale cada uno de los ésteres de ácidos grasos de la columna se identifican por medios físicos o químicos y se registran automáticamente en forma de una serie de picos que aparecen en tiempos diferentes, según la tendencia de cada éster de ácido graso a ser retenido en la fase estacionaria. La zona inducida bajo cada pico es proporcional a la concentración de un componente particular de la mezcla. La identidad de cada componente se establece por comparación con el esquema cromatográfico en gas de una mezcla estándar relacionada, cuya composición se conoce.

La cromatografía en gas-líquido tiene grandes ventajas debido a su sensibilidad extrema, que permite separar mezclas de cantidades muy pequeñas (Martín et. al., 1982).

### III. HIPOTESIS Y OBJETIVOS.

#### III.1 HIPOTESIS DE TRABAJO.

Si el sistema de embriogénesis somática en Theobroma cacao produce altos porcentajes de embriones y estos presentan un patrón cualitativo de ácidos grasos semejante al de la semilla madura, entonces este sistema podría usarse como una alternativa para la propagación de genotipos con alta productividad y resistencia, en forma masiva y en periodos menores de tiempo; pudiendo también proporcionar un sistema experimental que permita investigar la síntesis de los compuestos responsables del sabor y aroma en la cocoa.

#### III.2 OBJETIVO GENERAL.

Establecer un sistema de embriogénesis somática en Theobroma cacao L. Var. Amelonado y realizar un análisis comparativo de la composición de ácidos grasos entre semillas maduras y embriones somáticos.

#### III.3 OBJETIVOS PARTICULARES.

- Conocer la capacidad morfogenética de partes vegetativas de cacao.
- Determinar la edad óptima del inóculo del que se parte para la producción de embriones somáticos.
- Establecer por medio de un análisis estadístico los medios de cultivo más adecuados para la inducción de embriogénesis somática.

- Optimizar la concentración de los reguladores de crecimiento mediante un análisis de superficie de respuesta.
- Determinar la influencia que ejerce el agua de coco sobre la embriogénesis somática.
- Realizar variaciones en algunos de los nutrientes del medio de cultivo; así como separar las etapas de inducción y desarrollo de la embriogénesis somática para optimizar el sistema.
- Seleccionar un método de extracción de lípidos que tenga una alta eficiencia.
- Establecer las condiciones ideales para el análisis en el cromatógrafo de gases.
- Identificar los ácidos grasos mediante la comparación de estandares y realizar un análisis semicuantitativo de los ácidos grasos del embrión con respecto a la semilla madura.

## IV. MATERIALES Y METODOS

### IV.1 ESTABLECIMIENTO DEL CULTIVO DE TEJIDOS DE CACAO.

Reactivos: En el presente trabajo se utilizaron sales minerales, reactivo grado analítico, vitaminas y factores de crecimiento de Sigma Chemical Corp.; el agar bacteriológico Bioxon y casaminoácidos Difco; todos los medios de cultivo se prepararon con agua desionizada.

#### IV.1.1. MATERIAL BIOLÓGICO.

Se trabajó con frutos de Theobroma cacao de la variedad Amelonado y Criollo, los cuales fueron proporcionados por el Biol. Procopio A. López Andrade del Campo Experimental del INIFAP situado en la zona cacaotera de Comalcalco Tabasco.

A partir de los frutos de la variedad Amelonado se obtuvieron embriones sexuales inmaduros en diferentes estadios de desarrollo, evaluados por el color de los cotiledones:

- a) 2-4 mm de long. (Blanco translucido)
- b) 5-10 mm de long. (Blanco)
- c) 10-15 mm de long. (Blanco con Rosa)
- d) 12-15 mm de long. (Rosa)

y embriones sexuales inmaduros de frutos de 70, 80, 90, 100, 110 y 120 días después de la polinización. También se utilizaron semillas maduras para obtener material vegetativo (hoja, epicotilo e hipocotilo).

Para la variedad Criollo, se trabajó con embriones sexuales inmaduros blanco con rosa y rosa (debido a la dificultad para la obtención del material).

Una vez cortado el material el tiempo máximo que se tardó en sembrar el tejido en el medio de cultivo fue de diez días.

#### IV.1.2. MEDIO DE CULTIVO.

En todos los casos se utilizó el medio MS (Murashige y Skoog, 1962. apéndice 1) sólido con un pH de 5.8; según el tipo

de experimento se utilizaron algunos suplementos y diferentes reguladores del crecimiento, como se verá posteriormente.

La esterilización del medio se hizo en autoclave, durante 30 minutos a quince libras por pulgada cuadrada de presión.

#### IV.1.3. METODO DE DESINFESTACION.

Una vez que los frutos estuvieron en el laboratorio, se lavaron con agua y jabón, enjuagandolos perfectamente; posteriormente, bajo condiciones de asepsia se rociaron con alcohol etílico al 70% y se flamearon, después se abrió el fruto con bisturí y se extrajeron, según el caso, embriones sexuales inmaduros o semillas, los cuales fueron separados del tejido mucilaginoso en el que se encontraban incluidos; se colocaron en una caja de petri estéril de 10 cm de diámetro. El material se sembró inmediatamente para lo cual se utilizaron pinzas.

Tanto las pinzas como el bisturí se colocaron en un recipiente con alcohol y se flamearon antes de entrar en contacto con el tejido estéril.

El material de cristal y agua utilizados para la desinfestación se esterilizaron en autoclave durante 45 minutos a 15 libras por pulgada cuadrada de presión.

#### IV.1.4. INCUBACION DE LOS CULTIVOS.

Los cultivos se incubaron en un rango de temperatura de 25 a 30°C, con un fotoperíodo de 16 horas luz, 8 hrs. oscuridad; la iluminación fue obtenida a través de lámparas fluorescentes de 39 watts, colocadas a 150 cm de distancia de los frascos de cultivo.

#### IV.1.5. ESTUDIO PRELIMINAR DE EMBRIOGENESIS.

Tomando como referencia los trabajos realizados por Pence, Hasegawa y Janick en 1979 y 1981, el primer experimento se realizó utilizando embriones de 2-4 mm de long. (blanco

translucido), los cuales se sembraron en un medio MS suplementado con agua de coco 100 ml/l y casaminoácidos 1 g/l . Adicionándole el regulador de crecimiento ANA en una concentración de 1.5 mg/l .

Los recipientes donde se hicieron las incubaciones fueron frascos de 20 ml con el medio a una tercera parte de su capacidad.

#### IV.1.6. DETERMINACION DE LA EDAD DEL INOCULO.

Se utilizaron embriones sexuales de frutos de 70, 80, 90, 100, 110 y 120 días después de la polinización, los cuales se sembraron en un factorial (Tabla IV.1), el cula tenia como medio basal el MS suplementado con agua de coco 100 ml/l, y casaminoácidos 1 g/l y utilizando cinco auxinas en una concentración de 1.5 mg/l y dos citocininas en una concentración de 0.2 mg/l .

AUXINAS (1.5 mg/l).

		2,4-D	ANA	AIA	PICLORAM	AIB	0
CITOCININAS (0.2 mg/l).	CIN	A	B	C	D	E	F
	BAP	G	H	I	J	K	L
	0	M	N	O	P	Q	R

**Tabla IV.1.** Diseño factorial de 5 auxinas y 2 citocininas.

Debido a la problemática de marcar los frutos, se decidió trabajar con embriones de frutos de edad desconocida, por lo que se evaluó su estadio de desarrollo en base al color de los cotiledones y se probaron embriones blanco, blanco con rosa y rosa bajo las mismas condiciones antes mencionadas.

Los recipientes donde se hicieron las incubaciones fueron frascos de 100 ml, con el medio de cultivo sólido a una quinta parte de su capacidad.

Los embriones se sembraron en forma horizontal, de tal manera que existiera el mayor contacto posible con el medio, colocando tres embriones por frasco.

#### IV.1.7. ESTUDIO DE DIFERENTES TIPOS DE TEJIDO COMO INOCULO.

Se utilizaron semillas maduras para obtener el material vegetativo; estas se sembraron en tubos de ensaye de 100 ml de capacidad y con el medio de cultivo (MS 50%) a una quinta parte de su capacidad.

Una vez puestas a germinar las semillas se esperó alrededor de tres semanas para obtener una plantulita, a partir de la cual se obtuvieron los diferentes inóculos (hoja, epicotilo e hipocotilo); los cuales se sembraron en un factorial de las mismas características que el usado en los experimentos para determinar la edad óptima de los embriones sexuales.

#### IV.1.8. DISEÑO FACTORIAL PARA SELECCIONAR EL MEDIO DE CULTIVO ADECUADO.

Para la selección del medio de cultivo más adecuado para la embriogénesis somática se utilizaron embriones sexuales blanco con rosa, los cuales se sembraron en un factorial (Tabla IV.1), con cuatro repeticiones para cada tratamiento. Los resultados evaluados en este diseño fueron respuesta y rendimiento, los cuales se obtuvieron de la siguiente manera:

$$\text{Respuesta} = \frac{\text{No. de explantes con embriones somáticos}}{\text{No. de explantes totales}}$$

$$\text{Rendimiento} = \frac{\text{No. de embriones somáticos}}{\text{No. de explantes con embriones somáticos}}$$

Se realizaron evaluaciones a las ocho, nueve y diez semanas posteriores a la siembra.

#### IV.1.9. ANALISIS ESTADISTICO DE RESULTADOS.

Los resultados obtenidos en el factorial para seleccionar el medio de cultivo adecuado fueron sometidos a un análisis de varianza para determinar si existía una diferencia significativa entre los diferentes tratamientos; posteriormente se realizó una prueba de Tukey.

#### IV.1.10 OPTIMIZACION DE LAS CONCENTRACIONES DE LOS REGULADORES DE CRECIMIENTO Y DE EDAD DEL INOCULO.

Se realizó un factorial teniendo como medio basal el MS suplementado con agua de coco y casaminoácidos, en las mismas concentraciones que en experimentos anteriores, y utilizando tres diferentes concentraciones de AIB y BAP (Tabla IV.2) trabajando con tres estadios de desarrollo de embriones sexuales (blanco, blanco con rosa y rosa tenue).

		AIB (mg/lit).		
		0.5	2.5	4.5
BAP (mg/lit)	0.1	1	2	3
	0.3	4	5	6
	0.5	7	8	9

**Tabla IV.2.** Diseño factorial de concentraciones de reguladores de crecimiento. AIB y BAP.

Se realizaron seis repeticiones para cada tratamiento y a las nueve semanas se evaluó respuesta y rendimiento.

#### IV.1.11. ANALISIS POR SUPERFICIE DE RESPUESTA.

Los resultados obtenidos de los experimentos para optimizar la concentración de los reguladores de crecimiento fueron sometidos a un análisis de superficie de respuesta. Para lo cual se utilizó el programa ANAREMO; DEPI 1990. Elaborado por los Profesores Andres García y Javier Osante de ENCB

#### IV.1.12. OPTIMIZACION PRELIMINAR DE LA COMPOSICION DEL MEDIO DE CULTIVO.

Con el fin de tener una composición más estable en el medio de cultivo se eliminó el agua de coco.

Se sembraron embriones sexuales blanco con rosa en un medio basal MS con casaminoácidos (1 g/l) y teniendo como reguladores de crecimiento el AIB en una concentración de 1.5 mg por litro y BAP con 0.2 mg/l de concentración.

Se sembraron tres embriones sexuales por frasco y las evaluaciones se hicieron a las nueve semanas.

#### IV.1.13. SEPARACION DE LA FASE DE INDUCCION Y DESARROLLO DE EMBRIONES SOMATICOS DE CACAO.

Con el proposito de mejorar la respuesta y rendimiento de los embriones somáticos obtenidos en experimentos anteriores, se trato de separar la fase de inducción y desarrollo. Para lo cual se utilizaron embriones sexuales blanco con rosa, los que se sembraron en un medio de inducción, conteniendo, las sales de MS suplementado con casaminoácidos (1 g/l), sacarosa (30 g/l), agar bacteriológico (8 g/l) y teniendo como reguladores de crecimiento al AIB en una concentración de 1.5 mg/l y BAP en una concentración de 0.2 mg/l.

Se sembró un total de 42 repeticiones con tres inóculos por frasco, de los cuales se formaron 7 lotes con 6 repeticiones para cada uno y estos se resembraron de la

siguiente manera al medio de desarrollo:

1	++++-----	
2	+++++++-----	Medio de
3	+++++++-----	Inducción (+++)
4	+++++++-----	
5	+++++++-----	Medio de
6	+++++++-----	Desarrollo (--)
7	+++++++-----	
		Semanas
	1 2 3 4 5 6 7 8 9	

El medio de desarrollo tenia las mismas características que el de inducción pero sin reguladores de crecimiento. Las evaluaciones se hicieron en base a la respuesta y rendimiento a las nueve semanas después de la siembra.

#### IV.1.14. EFECTO DE LA CONCENTRACION DE CARBONO EN EL DESARROLLO DE EMBRIONES SOMATICOS DE CACAO.

La concentración de carbono es un factor importante para obtener una mejor eficiencia embriogénica y de esta manera producir embriones somáticos de mayor calidad (Kao y Michayluk, 1981; Lu et. al, 1982. EN: Evans et. el, 1984).

Se utilizaron embriones sexuales blanco con rosa, los cuales fueron sometidos al siguiente experimento: se sembraron en un medio de inducción MS, con AIB (1.5 mg/1) y BAP (0.2 mg/1) como reguladores de crecimiento, con variaciones en la concentración de carbono:

- A) Sacarosa (15 g/1)
- B) Sacarosa (30 g/1)
- C) Sacarosa (45 g/1)
- D) Sacarosa (60 g/1)
- E) Sacarosa (30 g/1) + casaminoácidos (1 g/1) Control.

Se sembraron 6 repeticiones con 3 inóculos por repetición para cada tratamiento y se realizaron resiembras a las 4 semanas a un medio de desarrollo, el cual tenía las mismas características que el de inducción pero sin reguladores de crecimiento.

Las evaluaciones se realizaron a las nueve semanas después de la siembra, evaluando respuesta, rendimiento y eficiencia.

#### IV.1.15 EFECTO DE LA CONCENTRACION Y RELACION DE NITROGENO EN EL DESARROLLO DE EMBRIONES SOMATICOS DE CACAO.

El nitrógeno también juega un papel importante en la embriogénesis somática; siendo importante no sólo su concentración sino también la relación en el aporte de nitrógeno.

En trabajos realizados con zanahoria, se observó que era necesario un aporte de nitrógeno amoniacal para obtener una formación abundante de embriones somáticos (Halperin y Wetherell, 1965 citado por Margara, 1982). Pero con otras especies es necesaria una concentración elevada de iones  $\text{NO}_3^-$  y ausencia de iones  $\text{NH}_4^+$  para permitir la embriogénesis somática (Margara, 1982).

En el experimento que aquí se realizó, se utilizaron embriones sexuales blanco con rosa, los cuales fueron sembrados en un medio de inducción MS modificado, ya que el MS mayor solo contenía  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  y  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , teniendo como reguladores AIB (1.5 mg/l) y BAP (0.2 mg/l). Con tres diferentes relaciones de nitrógeno:

- A)  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  en una relación 2:1 con concentraciones de 30, 45, 60 (control), 75 y 90 mM.
- B)  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  en una relación 1:1 con concentraciones de 45, 60 y 75 mM.
- C)  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  en una relación 1:2 con concentraciones de 45, 60 y 75 mM.

Se sembraron tres embriones por frasco con seis repeticiones para cada tratamiento, resemebrando el inóculo a

las 4 semanas en un medio de desarrollo con las mismas características que el de inducción, pero sin reguladores de crecimiento.

Se evaluó respuesta, rendimiento y eficiencia a las 9 semanas después de la siembra.

#### IV.1.16. ESTUDIOS DE EMBRIOGENESIS SOMATICA EN CACAO CRIOLLO.

En este caso se trabajó con embriones sexuales de diferentes estadios fisiológicos (blanco, blanco con rosa y rosa) dentro de un mismo factorial.

Se utilizó como medio basal el MS suplementado con agua de coco (100 ml/l) y casaminoácidos (1 g/l). Utilizando cinco auxinas diferentes y dos citocininas (Tabla IV.1).

Se realizaron dos repeticiones para cada tratamiento y se hicieron evaluaciones a las nueve semanas.

#### IV.2. ANALISIS DE ACIDOS GRASOS POR CROMATOGRAFIA DE GASES.

En todos los casos los reactivos empleados fueron grado analítico.

##### IV.2.1. EXTRACCION DE LIPIDOS.

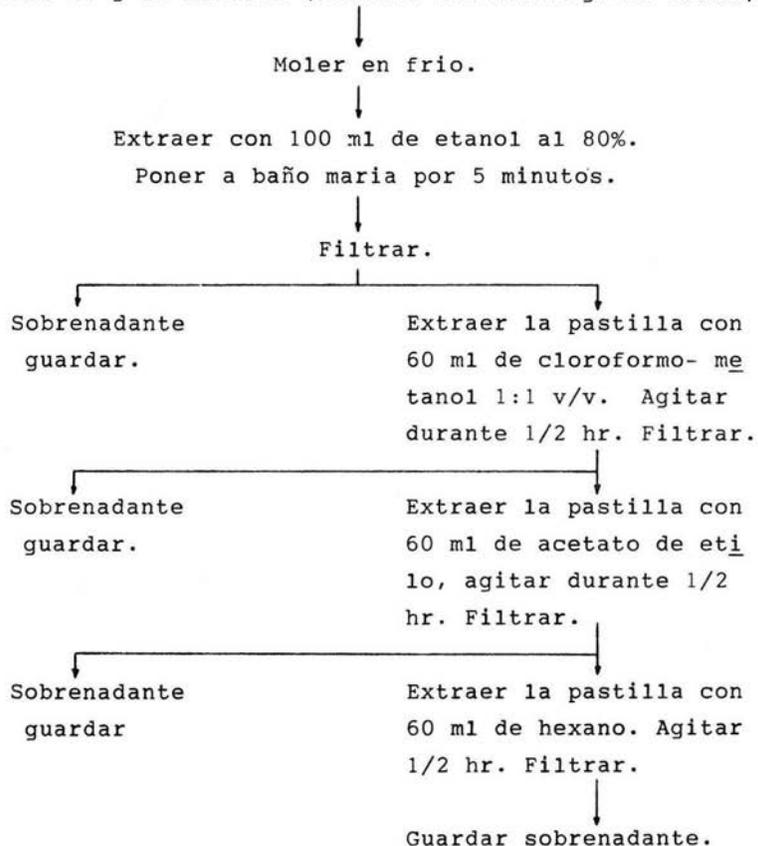
Para poder determinar un método de alta eficiencia para la extracción de lípidos se realizaron dos metodologías; en la primera, la muestra se hacía pasar por diferentes solventes con distintos grados de polaridad (Diagrama IV.1). Un segundo método fue el de Folch (Folch, 1957) (Diagrama IV.2), en el cual se utilizó como solvente una mezcla de cloroformo-metanol en una proporción de 2:1 V/V. En este método se realizó un procedimiento de lavado del extracto con una solución salina.

##### IV.2.2. OBTENCION DE ESTERES METILICOS.

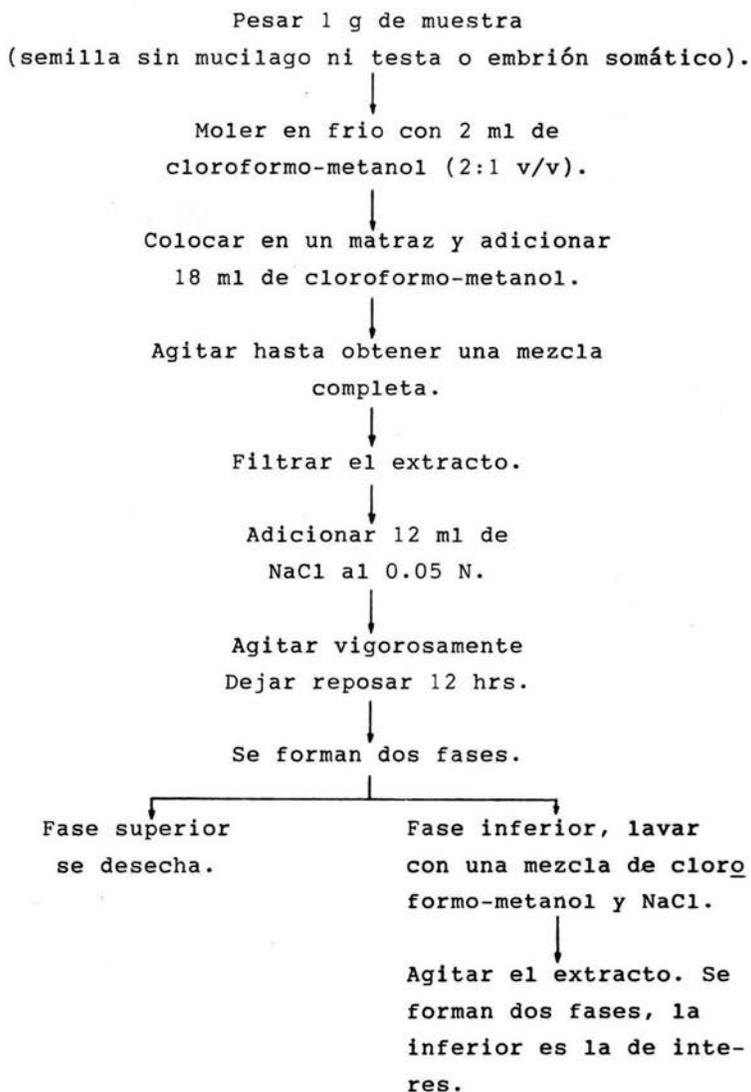
Tres mililitros de la muestra se evaporaron en un rotavapor con el agua a una temperatura de 60°C, posteriormente se adicionaron 4 ml de metanol y se evaporaron, este

**Diagrama IV.1. METODO I PARA EXTRACCION DE LIPIDOS.**

Pesar 10 g de muestra (semilla sin mucilago ni testa).



**Diagrama IV.2. METODO DE FOLCH.**



procedimiento se repitió y subsiguientemente se añadieron 2 ml de metanol y 0.1 ml de ácido sulfurico, calentando durante dos horas a 60°C, se adicionaron 5 ml de cloroformo y 5 ml de agua destilada, se agitó vigorosamente formando dos fases siendo la inferior la de interés.

#### IV.2.3. ESTABLECIMIENTO DE CONDICIONES PARA EL ANALISIS EN EL CROMATOGRAFO DE GASES.

El análisis de ácidos grasos se realizó en un cromatógrafo de gases Perkin-Elmer Sigma 115, utilizando una columna polar de dietilenglicol succinato (DEGS) de dos metros de longitud. El gas acarreador empleado fue el nitrógeno con un flujo de 50 ml por minuto. La temperatura de inyección fue de 200°C, la del detector de 225°C y la de la columna de 190°C. Con una velocidad de carta de 4 mm por minuto.

En todos los casos se inyectó 1  $\mu$ l de muestra.

#### IV.2.4. IDENTIFICACION DE ACIDOS GRASOS.

Para la identificación de los ácidos grasos contenidos en la muestra se utilizaron como referencia los tiempos de retención de los ácidos grasos y se compararon con estándares.

## V. RESULTADOS Y DISCUSION.

### V.1. CULTIVO IN VITRO DE TEJIDOS DE CACAO.

Se estudió el comportamiento en cultivo de tejidos vegetales de los materiales de cacao seleccionados por tener mayor adaptabilidad y producción en las condiciones de México y por lo tanto, una mayor demanda en las regiones cacaoteras del país.

El único grupo que se cultivó en México desde la época prehispánica hasta la decada de los treintas del presente siglo fue el correspondiente a los criollos. Actualmente estos cultivares todavía existen como relictos en las regiones alejadas de los polos cacaoteros de México, conservándose puros, ya que no han recibido la influencia genética de cacaos Trinitarios y Forasteros Amazónicos, por lo que resulta un excelente material de estudio; desafortunadamente se cuenta con pocos cultivares. Por otra parte la variedad Amelonado se ha cultivado extensamente teniendo una calidad comercial aceptable. El trabajar por medio de cultivo de tejidos vegetales con estas variedades resulta de gran importancia ya que se puede colaborar con el incremento de la producción y en el caso específico del material Criollo, recatar un germoplasma del peligro de extinción. Por lo antes dicho, el desarrollo de un método de desinfestación adecuado resulta de gran importancia. En los primeros ensayos se utilizó un método de desinfestación que implicaba el remojo del explante en etanol al 70% durante 30 segundos y 10 minutos en hipoclorito de calcio al 4%, con este método se observó que los resultados no fueron satisfactorios, ya que el material excretaba compuestos fenólicos, lo cual producía la muerte del explante; por tal motivo se realizó la desinfestación, pero del fruto completo con etanol al 70%, y posteriormente las semillas se sacaron del fruto en condiciones de asepsia; con este método los resultados

obtenidos fueron óptimos. En un estudio muy completo realizado por Hall y Collin en 1975, se encontró que las semillas de cacao requieren de un tratamiento de esterilización mínimo para poder ser una buena fuente de explante; debido a que dentro del fruto se encuentran en un empaque estéril, mientras el fruto se encuentre en buenas condiciones; esto concuerda con los resultados obtenidos en el presente trabajo, ya que con este método se obtuvieron porcentajes de asepsia del 100% y el explante no excretó compuestos fenólicos al medio de cultivo.

Para determinar el tipo de explante que produjera una respuesta embriogénica, en primer lugar se tomó como punto de partida las investigaciones realizadas por Pence, Hasegawa y Janick en 1979; en nuestro caso se cultivaron embriones sexuales de 2 a 4 mm de longitud en un medio de cultivo MS (apéndice 1), suplementado con agua de coco y ANA. Bajo estas condiciones no se obtuvieron embriones somáticos y sólo se logró la generación de callos pequeños (Fig. V.1). En los estudios realizados por Pence y colaboradores sí se obtuvo embriogénesis somática, pero tomando en cuenta que ellos trabajaron con variedades Amelonadas de Puerto Rico, se puede suponer que el comportamiento de estos cacaos es diferente al de las variedades mexicanas.

También se investigó el tipo de respuesta que se producía en un diseño factorial de cultivo de tejidos cuando se utilizó otro tipo de explante. En este caso se probó hoja, epicótilo e hipocótilo, derivados de plántulas germinadas de semillas y que crecieron en condiciones asépticas. La evaluación del experimento se realizó a las 8 semanas y en la tabla V.1 se encuentran los resultados. Se observó que en ningún tratamiento se obtuvo respuesta embriogénica. En algunos medios se logró la inducción y proliferación de tejido calloso. Estos callos presentaron un color cremoso, aunque en algunas ocasiones blanco, pero en general fueron tejidos callosos secos. El hipocótilo fue la parte vegetativa que tuvo mayor formación de callo y se observó que el mejor callo formado fue en el



**FIG. V.1** Formación de callo a partir de embriones sexuales de 2 a 4 mm. de longitud.

	2,4-D	ANA	AIA	PICLORAM	AIB	O	
CIN	Formación de callo	Formación de callo					HOJA
	Formación de callo	Formación de callo			Formación de callo	Formación de callo	EPICOTILO
	Formación de callo	Formación de callo	Formación de callo		Formación de callo	Formación de callo	HIPOCOTILO
BAP							HOJA
							EPICOTILO
		Formación de callo	Formación de callo			Formación de callo	HIPOCOTILO
O	Formación de callo	Formación de callo			Formación de callo		HOJA
			Formación de callo		Formación de callo	Formación de callo	EPICOTILO
		Formación de callo	HIPOCOTILO				

**TABLA V.1** Resultados obtenidos a partir de explantes vegetativos de cacao

 Formación de callo.

tratamiento que soló tenía ANA como regulador de crecimiento. La hoja formó callos muy pobres y en general tuvo una respuesta baja, al igual que la obtenida para epicótilo. Hall y Collin (1975), obtuvieron sus mejores callos con IBA como regulador de crecimiento y al igual que en este trabajo no se reporta embriogénesis somática a partir de explantes vegetativos.

Como el objetivo central de este trabajo era buscar la embriogénesis somática, se realizó entonces un seguimiento de la respuesta que presentaron en el cultivo embriones sexuales en diferentes fases de madurez. Para este efecto se marcaron frutos a partir de la polinización y se recolectaron a los 70, 80, 90, 100, 110 y 120 días después de la polinización. El tamaño del fruto y las características distintivas de los embriones sexuales en cada uno de los tiempos de colecta se encuentran en la tabla V.2. Con estas características se observó que los embriones sexuales van cambiando de coloración según su estado fisiológico debido a la síntesis de pigmentos, antocianinas y otros polifenoles. También se observó que existe una correlación entre el tamaño del fruto y el estado fisiológico del embrión sexual y debido a que se tuvieron problemas con el marcaje de los frutos, esta correlación fue muy ventajosa ya que por medio del tamaño del fruto y el color del embrión sexual se pudo saber aproximadamente el número de días después de la polinización. La respuesta de los explantes al cultivo en el diseño factorial de 5 auxinas y 2 citocininas mostró que embriones sexuales de 70 y 80 días después de la polinización (blancos) no fueron capaces de formar embriones somáticos, produciéndose únicamente callo en algunos tratamientos (Tabla V.3). Por lo contrario, en la literatura se reporta que embriones sexuales blancos tienen alta incidencia embriogénica, pero este estadio de desarrollo para variedades amelonadas de México no fue embriogénico.

La respuesta embriogénica se obtuvo a partir de embriones sexuales de 90 ddp (blanco con rosa), la cual se observó en los tratamientos que contenían ANA con Cin y BAP en su combinación

DIAS DESPUES DE LA POLINIZACION	LARGO DEL FRUTO (cm)	CIRCUNFERENCIA DEL FRUTO.(cm)	APARIENCIA DEL FRUTO.	COLOR Y TAMAÑO (mm) DEL EMBRION.	FORMA DEL EMBRION.
70	8.7 - 9.5	12 - 13.5		Blanco 2 - 4	
80	10 - 12	17.5-18.5		Blanco 5 - 8	
90	13 - 14.5	20 - 22		Blanco Blanco con rosa 10 - 12	
100	14 - 15.5	22 - 22.7		Blanco con rosa 12 - 15	
110	14 - 15.5	22 - 23.6		Rosa 12 - 15	
120	15 - 17	24 - 25.5		Purpura	

**TABLA V.2** Tamaño del fruto y características de los embriones sexuales a los 70, 80, 90, 100, 110 y 120 días después de la polinización.

	2,4-D	ANA	AIA	PICLORAM	AIB	O
CIN	A	B	C	D	E	F
BAP	G	H	I	J	K	L
O	M	N	O	P	Q	R

**TABLA V.3** Resultados de embriones sexuales de frutos de 70 y 80 días después de la polinización.

 Formación de callo.

	2,4-D	ANA	AIA	PICLORAM	AIB	O
CIN	A	B	C	D	E	F
BAP	G	H	I	J	K	L
O	M	N	O	P	Q	R

**TABLA V.4** Resultados de embriones sexuales de frutos de 90 días después de la polinización.

 Formación de callo  Germinación.

 Embriogénesis somática.

con las tres citocininas probadas (Tabla V.4).

Los embriones sexuales de 100 y 110 ddp (blanco con rosa y rosa) también generaron embriones somáticos y esto fue obtenido en un mayor número de tratamientos; el AIB vuelve a jugar un papel importante en la formación de embriones somáticos (Tabla V.5). En nuestro caso los embriones sexuales blanco con rosa y rosa, tienen una alta incidencia embriogénica, al comparar con la literatura se vuelven a observar discrepancias, ya que para autores como Pence, Hasegawa y Janick, los embriones blanco con rosa tienen poca incidencia embriogénica y en los embriones sexuales de color rosa la embriogénesis somática no fue observada.

Al utilizar embriones sexuales de 120 ddp (Tabla V.6), no se obtuvieron embriones somáticos, por lo contrario la mayoría de la respuesta obtenida fue germinación, lo cual indica que el embrión sexual en este estado de desarrollo ya no presenta una capacidad embriogénica y su destino es generar una planta.

Analizando los resultados obtenidos se puede decir que la respuesta embriogénica va a depender del grado de madurez del embrión cigótico que se usa como explante. Embriones en estado intermedio de maduración de 10 a 13 mm de tamaño, derivados de frutos de 90 a 110 ddp, fueron los que generaron una mejor respuesta embriogénica, siendo en este caso embriogénesis directa.

Debido a que la embriogénesis somática se presentó en varios tratamientos, se realizó un diseño factorial para determinar el medio de cultivo más adecuado. Este diseño probó 18 medios de cultivo diferentes, usando como explantes embriones sexuales derivados de frutos de 90, 100 y 110 ddp. de 10 a 13 mm de longitud. El diseño estadístico de el experimento contempló 4 repeticiones para cada tratamiento con 3 explantes por repetición. Se obtuvo embriogénesis somática en varios medios de cultivo (Tabla V.7), observando que la respuesta embriogénica se repite en los tratamientos B, E, F, I, K, y Q, lo que indica que existe reproducibilidad en la respuesta, y

	2,4-D	ANA	AIA	PICLORAM	AIB	O
CIN	A	B	C	D	E	F
BAP	G	H	I	J	K	L
O	M	N	O	P	Q	R

**TABLA V.5** Resultados de embriones sexuales de frutos de 100 y 110 días después de la polinización.



Formación de callo.



Embriogénesis somática.

	2,4-D	ANA	AIA	PICLORAM	AIB	O
CIN	A	B	C	D	E	F
BAP	G	H	I	J	K	L
O	M	N	O	P	Q	R

**TABLA V.6** Resultados de embriones sexuales de frutos de 120 días después de la polinización



Formación de callo



Germinación.

	2,4-D	ANA	AIA	PICLORAM	AIB	O
CIN	A	B	C	D	E	F
BAP	G	H	I	J	K	L
O	M	N	O	P	Q	R

**TABLA V.7** Resultados obtenidos en el factorial de embriones sexuales blanco, blanco con rosa y rosa tenue.

 Formación de callo

 Embriogénesis somática.

esto es primordial para establecer un sistema. Los resultados fueron evaluados en base a Respuesta y Rendimiento, a las 8, 9 y 10 semanas en cultivo (Tabla V.8). Los datos fueron analizados por medio de un Análisis de varianza (ANOVA), del que se obtuvo diferencia significativa, por lo que se realizó la prueba de Tukey (apéndice 2).

La interpretación del análisis estadístico sugiere que es la auxina la que tiene una acción primaria en el cultivo, siendo AIB la auxina que causa el mayor efecto; la citocinina tiene una acción secundaria, y se estima que es el BAP el que difiere significativamente de las otras citocininas. Lo cual concuerda con lo reportado en la literatura, ya que la auxina queda a nivel de membrana generando una bomba de protones del interior al exterior de la célula; con lo cual la pared celular se vuelve mas permeable, después la citocinina promueve la división celular (Skoog, 1971; Jacobsen, 1983; Demain, 1983 EN: Evans et al, 1984).

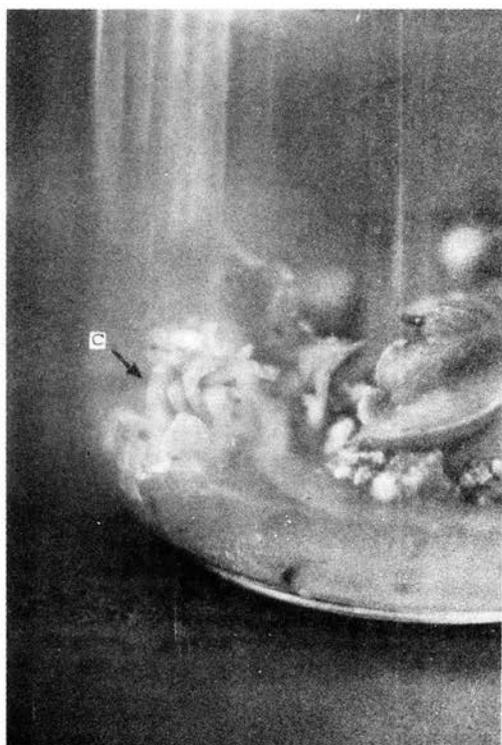
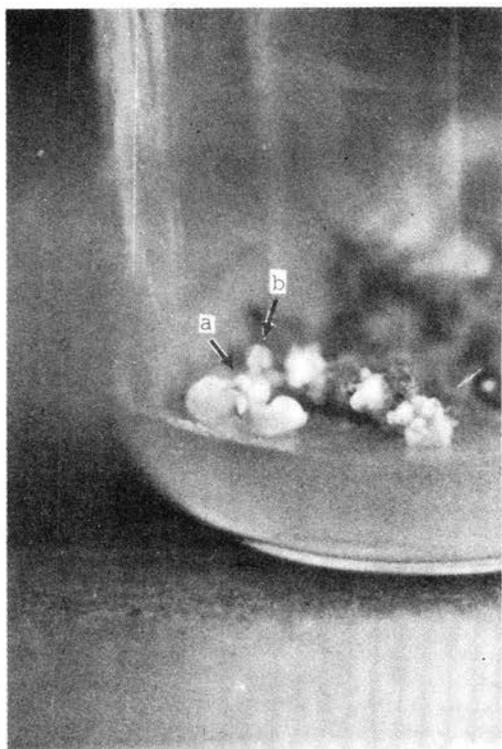
Debido a lo anterior, consideramos que el medio (K), suplementado con AIB y BAP, resulto ser el mejor tratamiento. Los tratamientos E, I y L, también muestran porcentajes altos de embriogénesis. La embriogénesis es directa en todos los tratamietos y los embriones somáticos son estructuras totalmente independientes del tejido que les dió origen (Fig. V.2).

Por otra parte, el factor tiempo también juega un papel importante, y es a la novena semana de cultivo cuando se obtiene un mayor número de embriones somáticos, lo cual concuerda con datos de la literatura, en los que después de 8 semanas de cultivo se observó la máxima respuesta embriogénica. (Pence et al, 1981).

Una vez determinado el mejor medio de cultivo para la respuesta embriogénica, se realizó un experimento para optimizar la concentración de los reguladores de crecimiento usando como explantes embriones sexuales blancos, blanco con rosa y rosa.

TRATAMIENTO		8 SEMANAS	9 SEMANAS	10 SEMANAS
A	RESPUESTA	0	0	0
	RENDIMIENTO	0	0	0
B	RESPUESTA	0.083	0.083	0.083
	RENDIMIENTO	2	2	2
C	RESPUESTA	0.083	0.333	0.333
	RENDIMIENTO	2	1.25	1.5
D	RESPUESTA	0	0	0
	RENDIMIENTO	0	0	0
E	RESPUESTA	0.666	0.666	0.666
	RENDIMIENTO	3.66	4	4.16
F	RESPUESTA	0	0.083	0.083
	RENDIMIENTO	0	2	2
G	RESPUESTA	0	0	0
	RENDIMIENTO	0	0	0
H	RESPUESTA	0.25	0.25	0.25
	RENDIMIENTO	2	2	2
I	RESPUESTA	0.5	0.583	0.583
	RENDIMIENTO	2.66	2.57	2.85
J	RESPUESTA	0	0	0
	RENDIMIENTO	0	0	0
K	RESPUESTA	0.583	0.75	0.833
	RENDIMIENTO	2.42	2.88	3.3
L	RESPUESTA	0.33	0.416	0.416
	RENDIMIENTO	2	2.4	3
M	RESPUESTA	0	0	0
	RENDIMIENTO	0	0	0
N	RESPUESTA	0.083	0.083	0.166
	RENDIMIENTO	1	1	2
O	RESPUESTA	0	0.083	0.083
	RENDIMIENTO	0	2	2
P	RESPUESTA	0	0	0
	RENDIMIENTO	0	0	0
Q	RESPUESTA	0.416	0.416	0.416
	RENDIMIENTO	2.4	3	2.2
R	RESPUESTA	0	0	0
	RENDIMIENTO	0	0	0

**TABLA V.8.** Respuesta y rendimiento obtenidos a partir de embriones sexuales blancos, blanco con rosa y rosa tenue a las 8, 9 y 10 semanas de incubación.



**FIG. V.2.** Embriones somá  
ticos en diferentes  
etapas de desarrollo.  
a. globular.  
b. torpedo joven.  
c. torpedo maduro.

En las tablas V.9, V.10 y V.11 se encuentran los resultados obtenidos en este experimento, en base a la respuesta y rendimiento obtenidos en este diseño factorial de reguladores de crecimiento, evaluados a la 9a. semana de cultivo.

El análisis estadístico de los resultados, se hizo por el método de comparación múltiple de Newman Keul's (apéndice 3). y posteriormente por la metodología de superficie de respuesta, las cuales se encuentran en las gráficas V.1 y V.2. Cabe aclarar que este análisis se hizo a aquellos diseños que permitieron generar la superficie de respuesta, que en este caso fueron embriones blancos y blanco con rosa.

Analizando dichos resultados se observó que para los embriones sexuales blancos (90 ddp) bajas concentraciones de auxina generaron una mayor respuesta embriogénica, aunque matemáticamente no existió una diferencia significativa entre las distintas concentraciones. La citocinina siguió el mismo patrón, notando que en este caso en concentraciones mayores, la respuesta embriogénica aumenta un poco. Pero definitivamente, la mejor respuesta se obtuvo a bajas concentraciones, lo cual concuerda con el modelo de respuesta generado (gráfica V.1).

Para embriones sexuales blanco con rosa (90 y 100 ddp) existen diferencias significativas tanto para las diferentes concentraciones de AIB como en las de BAP. Para AIB se observó que a bajas concentraciones se genera una mejor respuesta embriogénica al igual que en embriones blancos, pero con la citocinina (BAP) a bajas concentraciones hay poca respuesta embriogénica, la cual aumenta al usar una mayor concentración, pero al acrecentar aun más la concentración, la respuesta vuelve a decaer. De esta manera se tiene un punto óptimo en concentraciones intermedias (Gráfica V.2). También se observó que este estado fisiológico es el que genera la mejor respuesta embriogénica.

En cuanto a la respuesta de los embriones sexuales rosas (110 ddp) aunque no se pudo generar la superficie de respuesta, los resultados reflejan que sigue el mismo patrón que para

		AIB (mg/1)					
		0.5		2.5		4.5	
BAP (mg/1)		RESPUESTA	RENDIMIEN	RESPUESTA	RENDIMIEN.	RESPUESTA	RENDIMIEN.
		0.1	0.666	6	0.333	2	0
	0.333	1	0.666	2	0	0	
	0.666	2.5	0	0	0.666	2.5	
	1	1.33	0	0	0	0	
	0.666	4	0.333	1	0	0	
	1	3	0	0	0	0	
	0	0	0.333	2	0	0	
	0.333	3	0.666	3.5	0	0	
	1	2	0	0	0	0	
	0	0	0	0	0	0	
	0	0	0	0	0	0	
	0.333	1	0	0	0	0	
0.5	0	0	0	0	0.333	1	
	0.333	1	0.333	1	0	0	
	0.333	4	0.333	1	0	0	
	0	0	0	0	0	0	
	0.666	1	0	0	0	0	
	0.666	4	0	0	0	0	

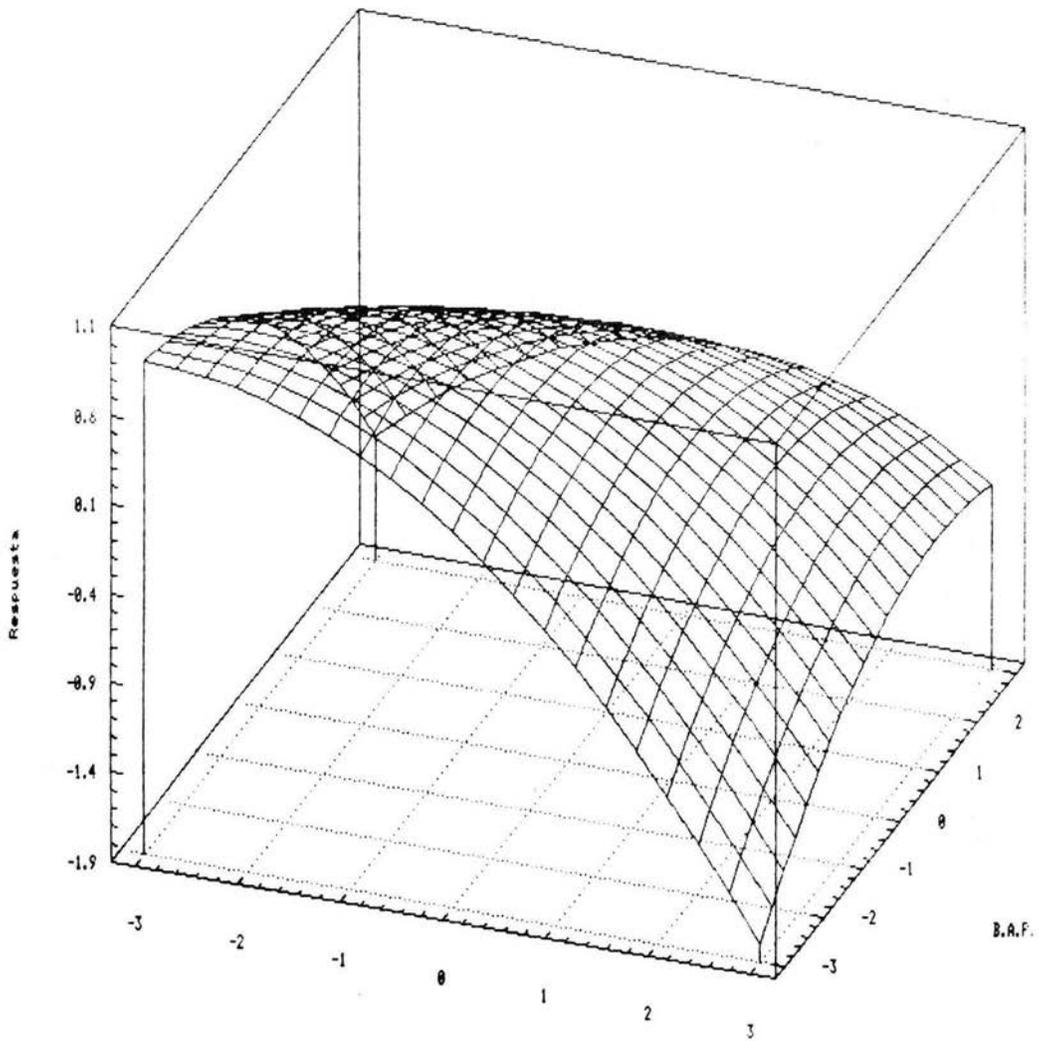
**TABLA V.9.** Respuesta y rendimiento obtenidos a partir de embriones sexuales blancos.

		AIB (mg/1)					
		0.5		2.5		4.5	
BAP (mg/1)		RESPUESTA	RENDIMIEN	RESPUESTA	RENDIMIEN	RESPUESTA	RENDIMIEN
		0.1	0	0	0	0	0.333
	0.333	1	0	0	0	0	
	0.666	4	0	0	0	0	
	0.333	2	0	0	0	0	
	0	0	0.333	2	0	0	
	0.333	2	0	0	0	0	
	0	0	0.333	1	0	0	
	0.666	9	0.666	8	0.666	2	
	0	0	0.333	7	0	0	
	0.333	5	0	0	0	0	
	0.333	4	0	0	0	0	
	1	9	0	0	0	0	
0.5	0.666	1	0	0	0	0	
	0	0	1	6	0	0	
	0.666	2	0	0	0	0	
	0	0	0.333	1	0	0	
	1	1	0	0	0	0	
	0	0	0	0	0	0	

**TABLA V.10.** Respuesta y rendimiento obtenidos a partir de embriones sexuales blanco con rosa.

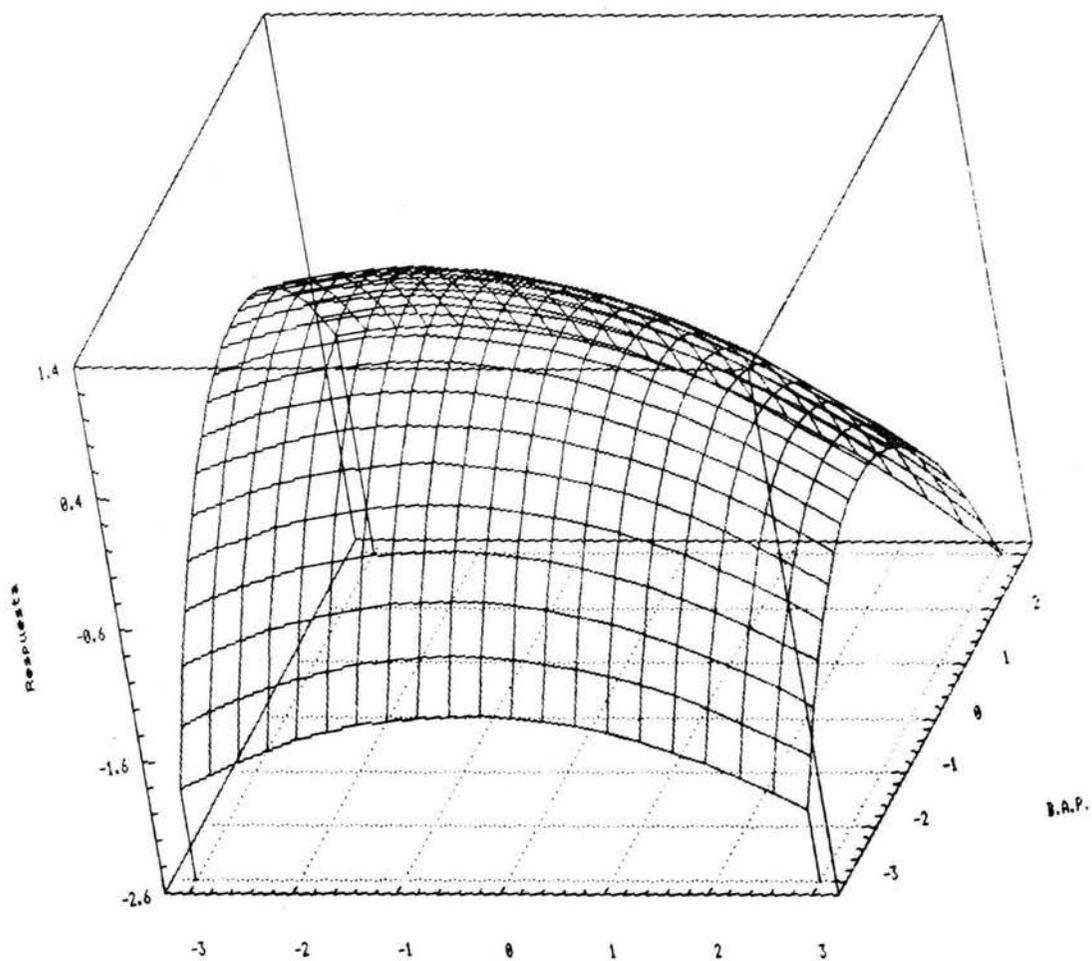
		AIB (mg/l)					
		0.5		2.5		4.5	
BAP (mg/l)		RESPUESTA	RENDIMIEN.	RESPUESTA	RENDIMIEN.	RESPUESTA	RENDIMIEN.
	0.1		0	0	0	0	0
		0	0	0	0	0	0
		0	0	0.666	2	0	0
		0	0	0	0	0	0
		0	0	0	0	0	0
	0.666	4.5	0	0	0	0	
0.3		0	0	0.333	1	0	0
		0	0	0	0	0	0
		1	6.66	0	0	0	0
		1	8.33	0	0	0	0
		0.333	7	0	0	0	0
		0.333	1	0	0	0	0
0.5		0	0	0	0	0.333	2
		0.666	2	0.666	4.5	0	0
		0	0	1	2.66	0	0
		0	0	1	6.33	0	0
		0	0	0	0	0	0
		0	0	0	0	0	0
		0	0	0	0	0	0

**TABLA V.11.** Respuesta y rendimiento obtenidos a partir de embriones sexuales rosas.



I.B.A.

**GRAFICA V.1.** Superficie de respuesta generada a partir de los resultados obtenidos en embriones sexuales blancos.



B.A.P.

I.B.A.

**GRAFICA V.2.** Superficie de respuesta generada a partir de los resultados obtenidos en embriones sexuales blanco con rosa.

embriones sexuales blanco con rosa pero con una menor respuesta embriogénica.

En la literatura Pence, Hasegawa y Janick en 1979 y 1980 mencionaron que para la variedad Amelonado procedente de Puerto Rico, fueron los embriones blancos los que presentaron la más alta respuesta embriogénica y en segundo lugar los embriones blanco con rosa. Al comparar la respuesta informada por estos autores con la obtenida en el presente trabajo para los embriones blanco con rosa, se observó que la respuesta es más alta, siendo totalmente reproducible a lo largo de las diferentes épocas del año. La cantidad de embriones somáticos por explante fue de  $14 \pm 4$ , obtenidos a las 9 semanas después de la siembra del inóculo.

Con el propósito de que el medio de cultivo tuviera una composición más definida se buscó eliminar el agua de coco, observándose que no existió un cambio crítico en la respuesta y la generación de embriones somáticos se mantuvo, por lo cual puede decirse que el agua de coco no juega un papel importante en la generación de embriones somáticos. Esto difiere de otras investigaciones donde el agua de coco es un factor indispensable para estimular la embriogénesis (Pence, Hasegawa y Janick, 1979 y 1980), ya que es utilizada como una fuente de citocinina. Sin embargo, el uso de fitohormonas con concentraciones definidas permite tener una mayor reproducibilidad en los experimentos, además de tener mayor entendimiento de los procesos de desarrollo.

Es importante que el explante sólo esté en presencia de la auxina el tiempo necesario para inducir la embriogénesis, ya que, basándose en la literatura, la auxina es importante para la inducción de embriogénesis, sin embargo, para el desarrollo normal de los embriones somáticos la auxina puede inhibirlo o modificarlo (Evans et al, 1984). Considerando esto, los embriones sexuales de cacao se sometieron a intervalos de tiempo en presencia de la auxina. Los explantes se mantuvieron 1,2,3,4,5,6 y 9 semanas en presencia de los reguladores y

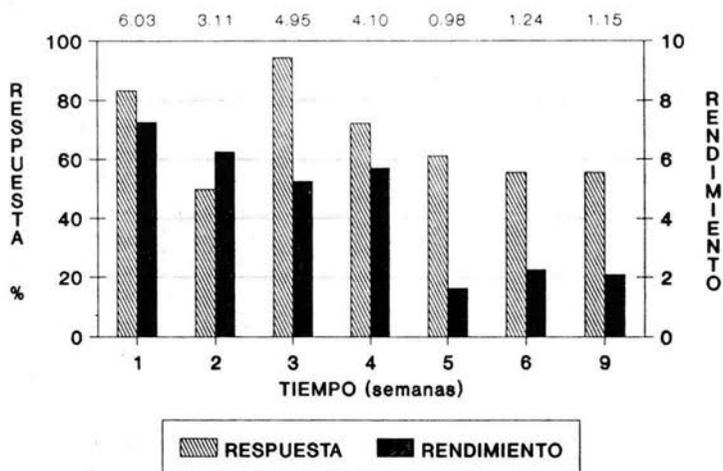
posteriormente se rescataron a un medio libre de reguladores de crecimiento hasta completar su desarrollo. En la gráfica V.3 se muestran los resultados de respuesta y rendimiento, y del análisis de la gráfica se puede mencionar que tan sólo una semana en presencia de reguladores de crecimiento es suficiente para inducir el proceso embriogénico, lo cual concuerda con los hallazgos de otros autores donde en algunos cultivos con un solo día que el explante esté en presencia de auxinas es suficiente para inducir la embriogénesis (Ammirato, 1987).

En el caso de los embriones sexuales de cacao la mejor respuesta se observó dejando el explante 3 semanas en presencia de reguladores y posteriormente se hizo una resiembra a un medio libre de estos. Si bien en términos de eficiencia embriogénica el tratamiento de una semana tuvo una eficiencia de 6.03 mientras que para 3 semanas fue de 4.95, se podría decir que una semana en presencia de reguladores es el mejor tratamiento, sin embargo, los embriones generados en el tratamiento de 3 semanas en presencia de reguladores tuvieron un desarrollo más normal (Fig V.3) lo cual es muy importante para la futura germinación.

Existen otros factores de gran importancia para obtener una mejor eficiencia embriogénica como con la fuente de carbono y el tipo y nivel de nitrógeno en el medio de cultivo.

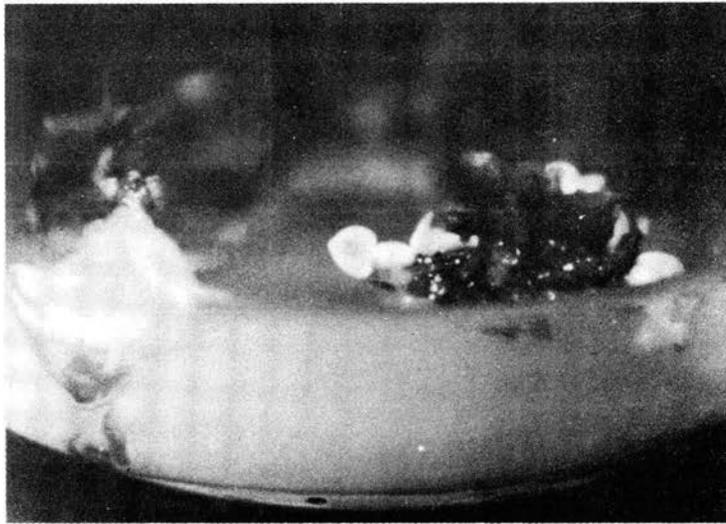
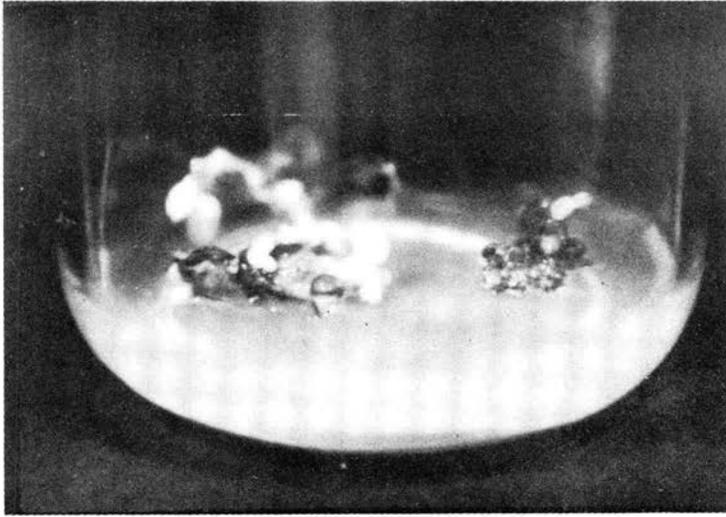
En el caso de la fuente de carbono, la sacarosa es la fuente de carbono más frecuentemente utilizada. Se ha informado en otros trabajos que altos niveles de concentración de la fuente de carbono produjeron un mejor desarrollo de los embriones somáticos (Kao y Michayluk, 1981; Lu et al, 1982; Wright, 1984 EN: Evans, 1984).

Por otra parte, altos niveles en la fuente de carbono pueden producir un efecto en la actividad metabólica secundaria, ya que es sabido que la manipulación de los nutrientes en el medio puede variar las condiciones fisiológicas y los procesos metabólicos asociados en los cultivos podrían permitir inducir la síntesis de un metabolito



• Los valores en la parte superior de la gráfica indican la eficiencia de cada tratamiento ( X 100 ).

**GRAFICA V.3.** Respuesta y rendimiento de embriones sexuales de cacao sometidos a diferentes tiempos en medio de inducción, con reguladores de crecimiento, y posteriormente transplantados a medio de desarrollo sin reguladores.



**FIG. V.3.** Embriones somáticos de cacao obtenidos al separar la fase de inducción y la fase de desarrollo.

deseado (Lindsey, 1985 EN: Leathers, 1989).

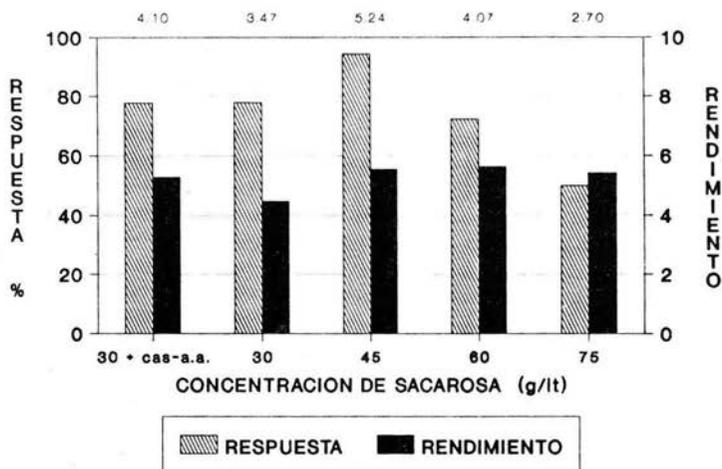
En trabajos anteriores realizados para cacao, se ha observado que altas concentraciones de sacarosa en el medio de cultivo inducen cambios en la composición de los ácidos grasos, alcaloides y antocianinas, lo cual puede ser considerado como un marcador del desarrollo de los embriones somáticos (Pence, Hasegawa y Janick, 1981; Wright, Kononowicz y Janick, 1984).

En la gráfica V.4 se muestran los resultados de nuestra investigación y se puede observar que los tratamientos con concentraciones de 45 y 60 g/l presentaron altas eficiencias embriogénicas, además se observó que el desarrollo de los embriones somáticos es mejor, ya que estos empiezan a cambiar de color, tomando tonos ligeramente rosas y después rosa más fuerte como ocurre con los embriones sexuales en su desarrollo in vivo (Fig. V.4), lo que nos indica que se activó la síntesis y acumulación de los lípidos de reserva, sugiriendo que la concentración de la fuente de carbono tiene gran importancia en el crecimiento y desarrollo de los embriones somáticos.

En el caso de la fuente de nitrógeno (Gráfica V.5) se observó que esta también fue de gran importancia en la embriogénesis somática; no sólo en su concentración sino también en su relación en el aporte de nitrógeno.

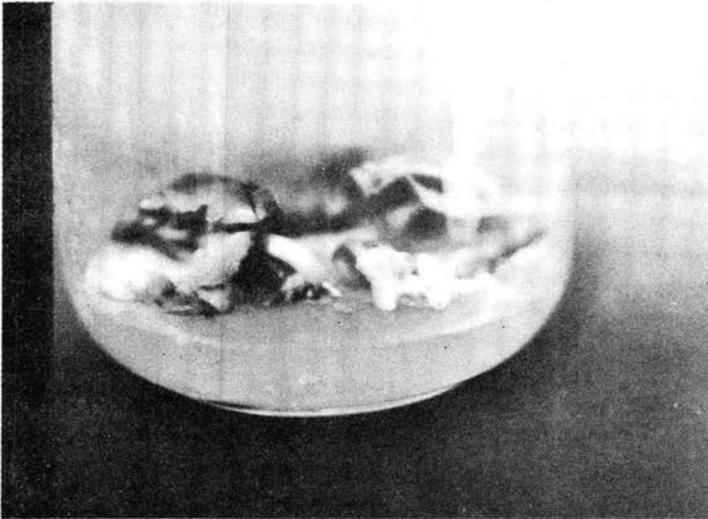
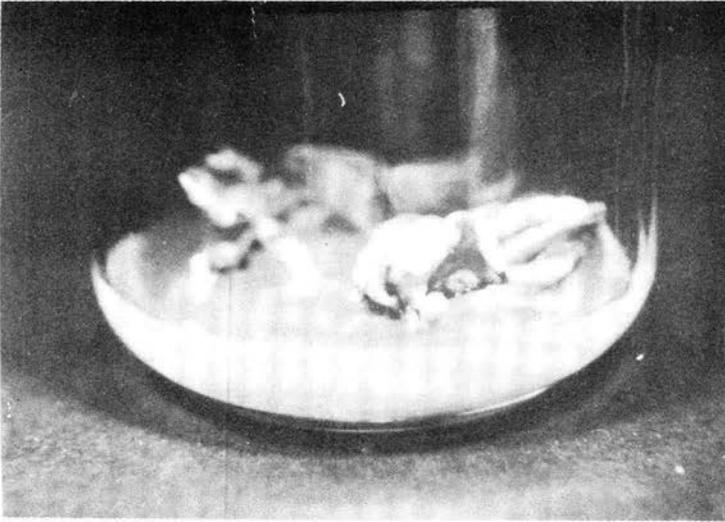
La relación de nitrógeno  $\text{NO}_3/\text{NH}_4$  2:1 fue la que permitió una mejor eficiencia embriogénica en sus tratamientos y fue la concentración de 60 mM con la que se obtuvieron mejores resultados. La relación  $\text{NO}_3/\text{NH}_4$  1:1 tuvo baja eficiencia embriogénica por lo que podría decirse que en el caso de cacao es necesario un mayor aporte de iones  $\text{NO}_3^-$  en el medio de cultivo. Al comparar con datos bibliográficos se observó que en un estudio realizado por Wright y Janick (1984), es también la concentración de 60 mM la que dió una mejor respuesta, además la composición la composición de ácidos grasos fue muy similar a la de la manteca de cacao.

Todos los experimentos antes realizados utilizaron como explante embriones sexuales de cacao de la variedad Amelonado.

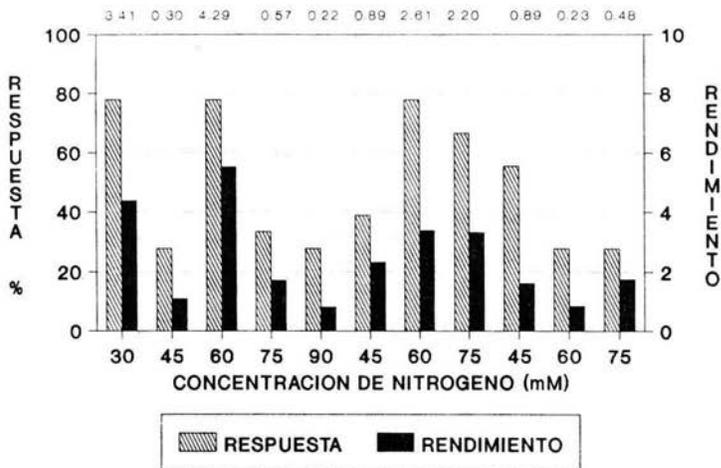


• Los valores en la parte superior de la gráfica indican la eficiencia de cada tratamiento ( X 100 ).

**GRAFICA V.4.** Respuesta y rendimiento de embriones sexuales de cacao sometidos a diferentes concentraciones de carbono en el medio de cultivo.



**FIG. V.4.** Embriones somáticos de cacao obtenidos con altas concentraciones de carbono en el medio de cultivo.



• Los valores en la parte superior de la gráfica indican la eficiencia de cada tratamiento ( X 100 ).

**GRAFICA V.5.** Respuesta y rendimiento de embriones sexuales de cacao sometidos a diferentes concentraciones y relaciones de nitrógeno ( $\text{NO}_3/\text{NH}_4$ ) en el medio de cultivo, siendo la relación 2:1 en los primeros cinco tratamientos, 1:1 en los siguientes tres y 1:2 en los tres últimos.

Pero otra variedad de cacao de gran interes es el Criollo, al que comercialmente se llama cacao fino y que es utilizado en chocolateria para la fabricación de productos de lujo; desafortunadamente, el cacao Criollo casi no se cultiva ya que es poco vigoroso y más sensible a las enfermedades (Braudeau, 1970), por lo que únicamente se pudo realizar un diseño experimental con él, obteniendose la formación de embriones somáticos en tratamientos que contenían AIA y Cin; BAP y AIB (Tabla V.12). El hecho de obtener embriogénesis somática en el mismo medio (K) que para la variedad Amelonado resulta muy interesante, ya que una vez establecido el sistema, se puede retomar la variedad Criollo, reduciéndose notablemente el gasto de material vegetativo.

	2,4-D	ANA	AIA	PICLORAM	AIB	O
CIN	A	B	C	D	E	F
BAP	G	H	I	J	K	L
O	M	N	O	P	Q	R

**TABLA V.12.** Resultados de embriones sexuales de la Variedad Criollo.

 Formación de callo.

 Embriogénesis somática.

## B. ANALISIS DE ACIDOS GRASOS POR CROMATOGRAFIA DE GASES

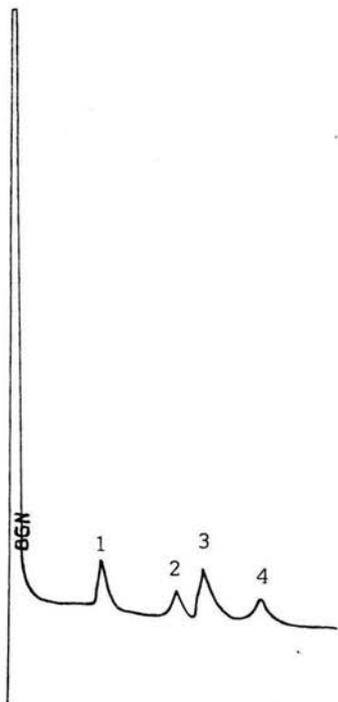
La manteca de cacao, la grasa extraída de las semillas de Theobroma cacao, es ampliamente utilizada en la manufactura del chocolate, y es una de las grasas vegetales de más costo en el mercado.

La única propiedad física de la manteca de cacao es su rápida fusión a 33°C y abajo de 20°C se solidifica, lo cual la hace un ingrediente especial en la manufactura de productos de chocolate. Esta propiedad se refleja directamente de la composición de los ácidos grasos y del arreglo estereoespecífico de los ácidos grasos en triglicéridos, los cuales forman cristales con definidos puntos de fusión a la temperatura de la boca.

Se han producido bastantes sustitutos de esta grasa, pero ninguno ha sido completamente satisfactorio debido a sus malas propiedades de fusión y altos precios; debido a esto, se puede explorar la posibilidad de producir un cultivo de embriones in vitro que produzcan un tipo de manteca de cacao, lo cual tendría grandes ventajas ya que se podría tener un abastecimiento del producto sin las restricciones del clima, la producción podría estar libre de contaminación y enfermedades y el metabolismo de los embriones podría ser modificado o regulado para obtener una máxima producción.

Por esta razón, fue necesario conocer el patrón de ácidos grasos de los embriones somáticos y compararlo con el de las semillas maduras. Para lo cual era indispensable establecer un método de extracción de los ácidos grasos. Se utilizaron dos métodos, el primero usó solventes con diferente grado de polaridad (etanol, cloroformo-metanol, acetato de etilo y hexano), un segundo método fue el de Folch donde se usó como solvente una mezcla de cloroformo-metanol y posteriormente un lavado con NaCl. Inicialmente estos dos métodos sólo fueron probados para semilla.

En la figura V.5 se observa que el extracto con etanol



	Tr	% dentro de la mezcla
1. Palmítico	4.66	22.9781
2. Esteárico	7.97	20.7246
3. Oleico	9.25	41.9482
4. Linoleico	11.61	14.3491

**FIG. V.5.** Perfil de ácidos grasos en semilla madura de cacao. Extracto realizado con etanol.

presentó un patrón de 4 ácidos grasos, los cuales fueron palmítico, estearico, oleico y linoleico.

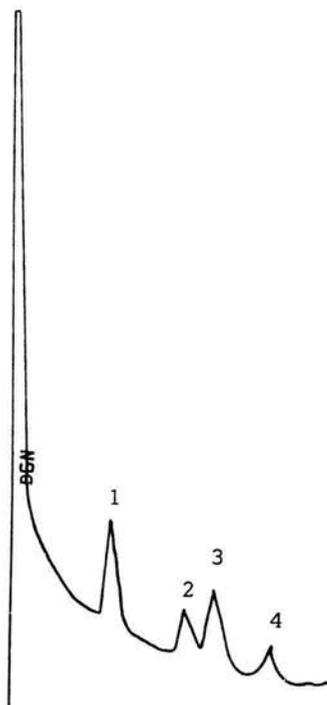
Los perfiles de ácidos grasos con los extractos de cloroformo-metanol (Figura V.6) y acetato de etilo (Figura V.7) fueron similares al de etanol pero con los componentes ligeramente más concentrados.

Al observar el patrón de ácidos grasos del extracto de hexano (Figura V.8) se observó que es el mismo que en los anteriores, pero en este caso con una concentración más alta de los componentes.

Por otra parte el método de Folch (Figura V.9) mostró el mismo patrón de ácidos grasos pero en este caso en una mayor concentración que la obtenida con los otros solventes. Este método dio una mayor resolución, lo cual puede deberse a que el procedimiento de lavado con NaCl remueve esencialmente los componentes no-lípidicos del extracto con una pérdida muy baja de material lípidico. Debido a esto para las extracciones en embriones somáticos solo se utilizó este método.

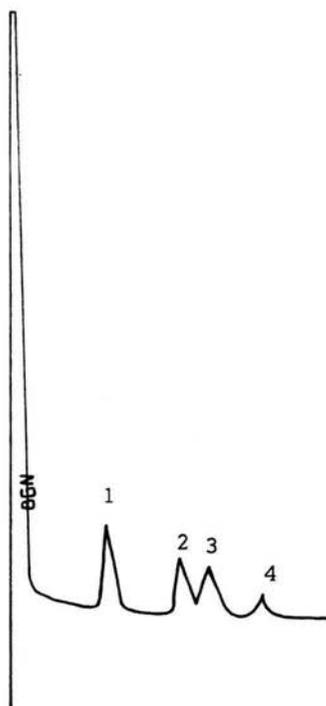
Para la identificación de los ácidos grasos se usó como referencia el tiempo de retención de los estándares, siendo aproximadamente de 4.6 para el palmítico, para el esteárico 7.85, para el oleico 9.1 y para el linoleico 11.77. También se hicieron co-cromatogramas con los estándares para tener una mayor seguridad en la identificación de los picos (Figuras V.10, V.11, V.12 y V.13).

Una vez determinado el método de extracción e identificados los componentes de la mezcla se utilizaron embriones somáticos obtenidos de embriones sexuales de diferentes estados de desarrollo (mezcla de 90, 100 y 110 ddp) para realizar el extracto y se observó en el análisis que el patrón de ácidos grasos fue el mismo que para semilla madura (palmítico, esteárico, oleico y linoleico) (Fig V.14). Lo cual concuerda con lo reportado por Wright, Kononowicz y Janick en 1984, con la diferencia de que ellos encontraron además en el patrón de ácidos grasos al ácido linolénico y al araquidónico



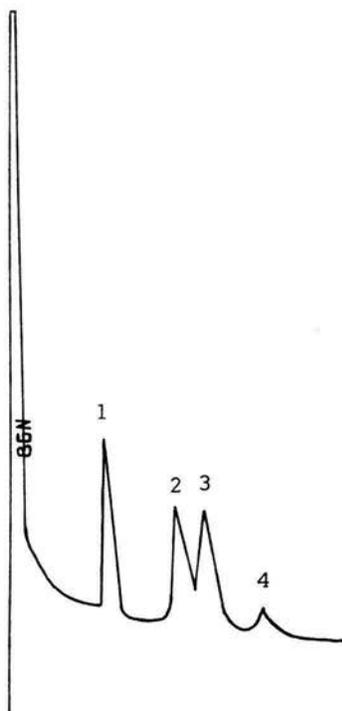
	Tr	% dentro de la mezcla
1. Palmítico	4.71	34.3984
2. Esteárico	8.08	23.6169
3. Oleico	9.32	27.3615
4. Linoleico	11.72	14.6232

**FIG. V.6.** Perfil de ácidos grasos en semilla madura de cacao. Extracto realizado con cloroformo-metanol.



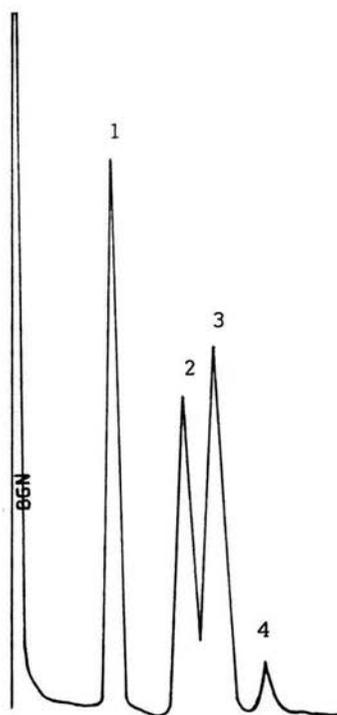
	Tr	% dentro de la mezcla
1. Palmítico	4.71	28.8103
2. Esteárico	8.07	33.0512
3. Oleico	9.31	33.9716
4. Linoleico	11.69	4.1669

**FIG. V.7.** Perfil de ácidos grasos en semilla madura de cacao. Extracto realizado con acetato de etilo.



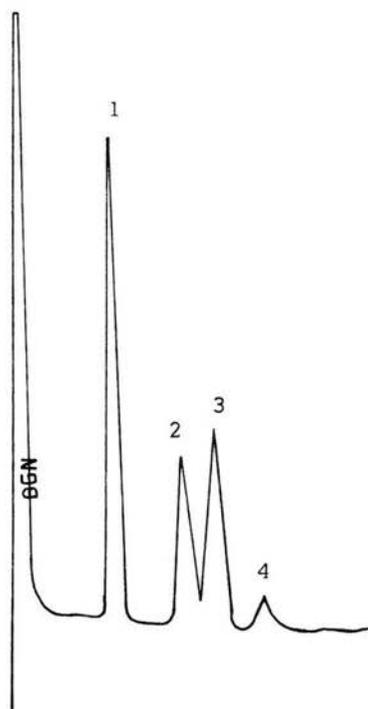
	Tr	% dentro de la mezcla
1. Palmítico	4.65	28.4926
2. Esteárico	7.95	35.4781
3. Oleico	9.20	34.4453
4. Linoleico	11.58	1.5841

**FIG. V.8.** Perfil de ácidos grasos en semilla madura de cacao. Extracto realizado con Hexano.



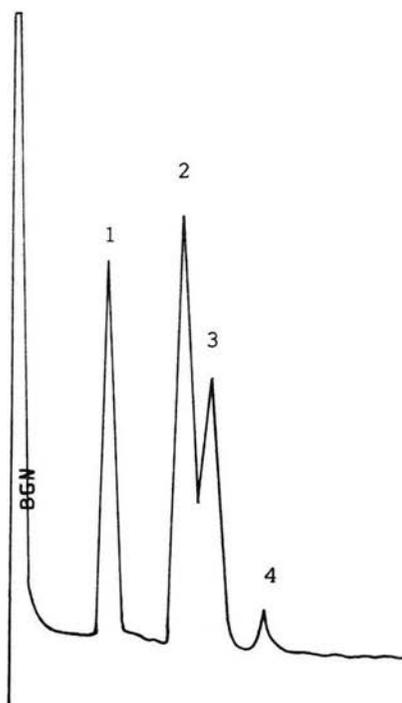
	Tr	% dentro de la muestra	Area BC
1. Palmítico	4.73	28.4256	3.4753
2. Esteárico	8.10	29.6963	3.6307
3. Oleico	9.37	36.2579	4.4329
4. Linoleico	11.76	5.4872	0.6708

**FIG. V.9.** Perfil de ácidos grasos en semilla madura de cacao. Extracto realizado con el método de Folch.



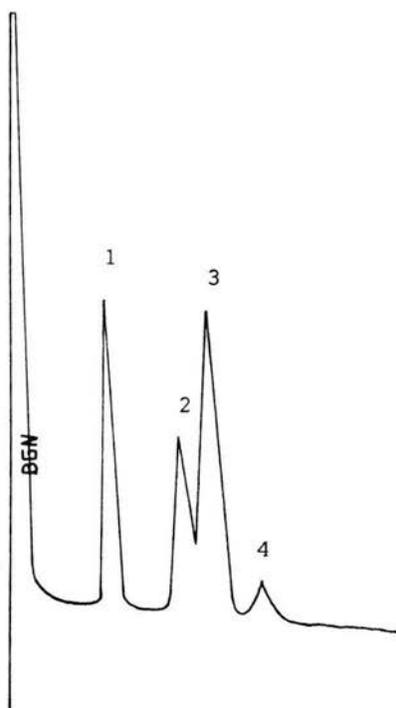
	Tr	% dentro de la mezcla
1. Palmítico	4.6	37.1816
2. Esteárico	7.9	28.1288
3. Oleico	9.1	29.4169
4. Linoleico	11.5	5.2727

**FIG. V.10.** Extracto de semilla madura de cacao realizado con el método de Folch y coinycetado con un estandar de el ácido palmítico.



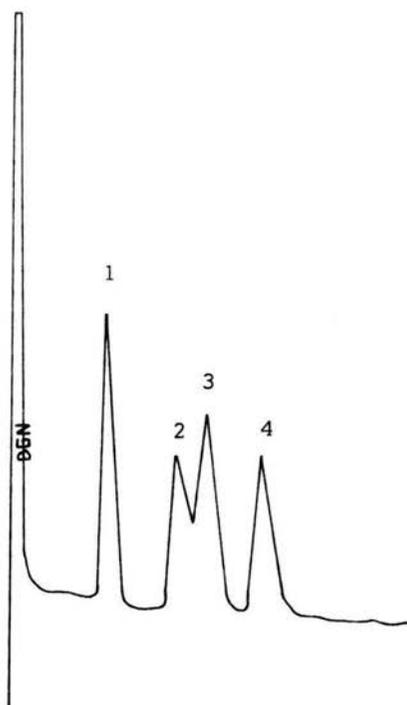
	Tr	% dentro de la mezcla
1. Palmítico	4.55	19.7350
2. Esteárico	7.85	46.5061
3. Oleico	9.05	30.1791
4. Linoleico	11.46	3.2081

**FIG. V.11.** Extracto de semilla madura de cacao realizado con el método de Folch y coinyectado con estandar del ácido esteárico.



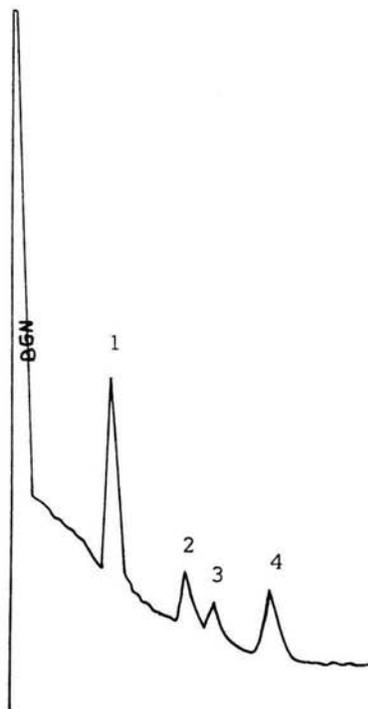
	Tr	% dentro de la mezcla
1. Palmítico	4.59	24.4764
2. Esteárico	7.85	25.0038
3. Oleico	9.10	46.4176
4. Linoleico	11.43	4.1022

**FIG. V.12.** Extracto de semilla madura de cacao realizado con el método de Folch y coinyectado con un estándar del ácido oleico.



	Tr	% dentro de la mezcla
1. Palmítico	4.69	22.3674
2. Esteárico	8.07	21.2159
3. Oleico	9.29	32.2669
4. Linoleico	11.77	24.1498

**FIG. V.13.** Extracto de semilla madura de cacao realizado con el método de Folch y coinyectado con un estandar del ácido linoleico.



	Tr	% dentro de la muestra	Area BC
1. Palmítico	4.67	44.5019	0.3945
2. Esteárico	7.99	10.7007	0.0948
3. Oleico	9.19	4.6183	0.0409
4. Linoleico	11.65	25.9408	0.2299

**FIG. V.14.** Perfil de ácidos grasos en embrión somático de cacao. Extracto realizado con el método de Folch.

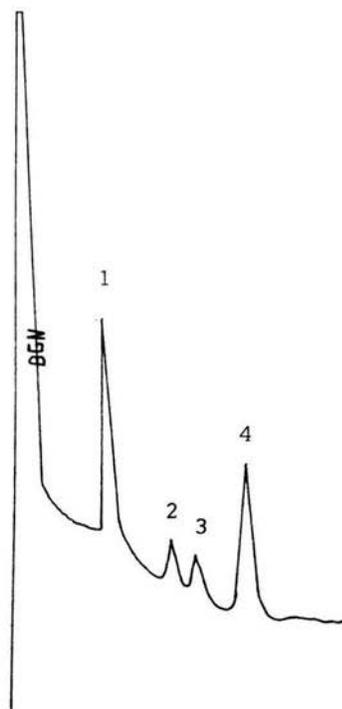
aunque en muy bajas concentraciones. En nuestro caso no se obtuvieron estos ácidos grasos probablemente por que quedaron traslapados en otros picos y hubiese sido necesario el uso de columnas capilares, las cuales dan una mayor resolución.

Para observar las diferencias en la concentración de ácidos grasos de la semilla madura con respecto a los embriones somáticos se realizó un análisis semicuantitativo, para lo cual se utilizaron las áreas bajo la curva de cada componente; se puede decir que el embrión somático va a contener un 24.12% de ácido palmítico con respecto a la semilla madura, 5.54% para el ácido esteárico, 1.89% para el oleico y 34% para linoleico. El hecho de que este último se presente en una concentración más alta es importante debido a que es un ácido graso esencial.

Posteriormente se realizaron análisis para extractos de embriones somáticos pero esta vez de acuerdo al estado fisiológico del explante del que se generaron: blanco (Figura V.16), blanco con rosa (Figura V.17), rosa (Figura V.18) y también para embriones somáticos obtenidos a partir de un medio de cultivo no suplementado con agua de coco (Figura V.15).

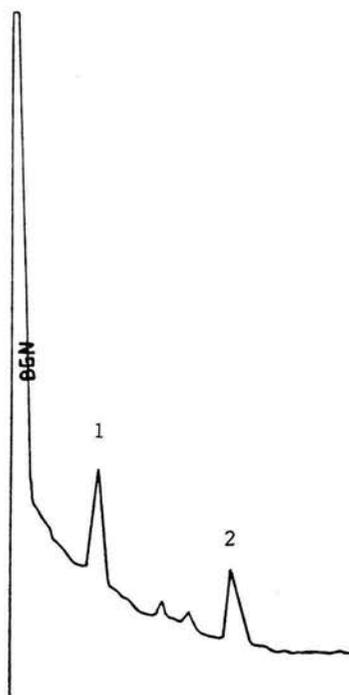
Los embriones somáticos obtenidos del cultivo de embriones sexuales blancos tuvieron una concentración muy baja de los ácidos esteárico y oleico, la cual aumenta conforme el embrión sexual utilizado como explante tiene un mayor desarrollo; por lo que los embriones somáticos formados a partir de embriones sexuales blanco con rosa y rosa sí presentaron un perfil lipídico más semejante al de la semilla. Para los embriones somáticos que fueron generados en un medio sin agua de coco el perfil de ácidos grasos también va a estar formado por los mismos cuatro componentes presentes en la semilla.

Al comparar los porcentajes dentro de la mezcla de los ácidos grasos presentes en los embriones somáticos obtenidos de diferentes explantes (embriones sexuales en mezcla, blanco, blanco con rosa y rosa) se pudo observar (Tabla V.13) que los embriones somáticos generados a partir de embriones sexuales blancos presentaron un alto porcentaje de los ácidos palmítico



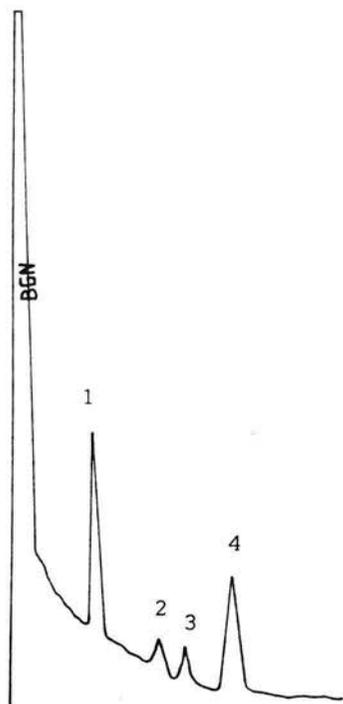
	Tr	% dentro de la mezcla.	Area BC
1. Palmítico	4.13	35.5376	0.1408
2. Esteárico	8.02	8.5967	0.0340
3. Oleico	9.16	6.3402	0.0251
4. Linoleico	10.96	47.9051	0.1898

**FIG. V.15.** Perfil de ácidos grasos de embriones somáticos cultivados en un medio sin agua de coco. Extracto realizado con el método de Folch.



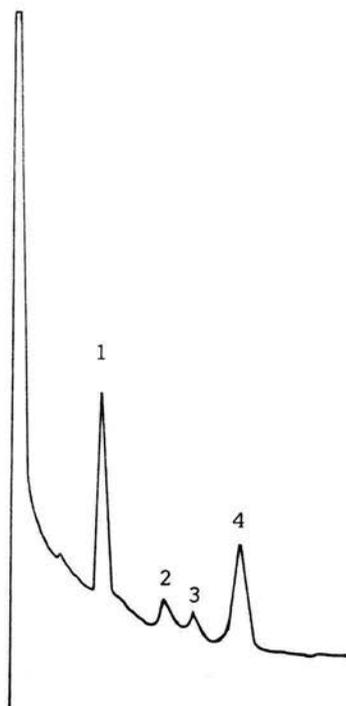
	Tr	% dentro de la mezcla.	Area BC
1. Palmítico	4.23	56.0934	0.0398
2. Linoleico	10.97	43.9066	0.0312

**FIG. V.16.** Perfil de ácidos grasos de embriones somáticos generados a partir de embriones sexuales blancos. Extracto realizado con el método de Folch.



	Tr	% dentro de la mezcla	Area BC
1. Palmítico	4.12	32.1528	0.0926
2. Esteárico	6.98	6.7014	0.0193
3. Oleico	9.0	8.3889	0.0241
4. Linoleico	10.95	52.7569	0.1519

**FIG. V.17.** Perfil de ácidos grasos de embriones somáticos generados a partir de embriones sexuales blanco con rosa. Extracto realizado con el método de Folch.



	Tr	% dentro de la mezcla	Area BC
1. Palmítico	4.14	38.8657	0.1081
2. Esteárico	7.92	6.6705	0.0185
3. Oleico	9.17	2.1995	0.0061
4. Linoleico	10.98	50.4672	0.1404

**FIG. V.18.** Perfil de ácidos grasos de embriones somáticos generados a partir de embriones sexuales rosas. Extracto realizado con el método de Folch.

Acido Graso	PORCENTAJE DENTRO DE LA MEZCLA SEGUN EL ESTADO FISIOLÓGICO.			
	MEZCLA	BLANCO	BLANCO C/ROSA	ROSA
PALMITICO	44.5019	56.0934	32.1528	38.8657
ESTEARICO	10.7	---	6.7	6.67
OLEICO	4.61	---	8.38	2.19
LINOLEICO	25.94	43.9	52.75	50.46

**TABLA V.13** Comparación de los porcentajes obtenidos en la mezcla para cada ácido graso de extractos de embriones somáticos generados a partir de embriones sexuales en diferentes estados fisiológicos.

y linoleico mientras que los ácidos esteárico y oleico no fueron detectados; esto es muy semejante a lo que ocurre en la naturaleza ya que en los embriones sexuales inmaduros el ácido linoleico esta en una concentración de más de la mitad del total de ácidos grasos y los ácidos esteárico y oleico se encuentran en muy bajas concentraciones (Pence et al, 1981).

Al observar el porcentaje de los ácidos grasos de embriones somáticos generados a partir de embriones sexuales blanco con rosa y rosa, se pudo analizar que al usar explantes más maduros los porcentajes de los ácidos esteárico, oleico y linoleico se incrementaban, mientras que el palmítico disminuyó. Las semillas de cacao se comportan de manera semejante al madurar, ya que los niveles de síntesis del ácido esteárico se incrementan, lo cual esta asociado a la acumulación de triglicéridos (Griffiths y Harwood, 1989).

Con estos resultados se observó que el estado fisiológico del explante aparte de jugar un papel importante en la respuesta embriogénica, también tiene una influencia sobre el patrón de ácidos grasos en los embriones somáticos.

## VI. CONCLUSIONES

En el presente estudio, donde el objetivo principal fue establecer la embriogénesis somática en Theobroma cacao y analizar el patrón de ácidos grasos de los embriones somáticos generados, se llegó a las siguientes conclusiones:

El material vegetativo no generó una respuesta embriogénica, existiendo solo formación de tejido calloso.

La edad del inóculo utilizado juega un papel de gran importancia, ya que los embriones cigótico van a expresar diferentes potenciales de embriogénesis dependiendo de su grado de desarrollo. Observándose que los embriones blanco con rosa expresan la más alta respuesta embriogénica.

El ácido indolbutírico y la bencil aminopurina tiene un efecto benéfico en la estimulación de la embriogénesis somática en cacao: Siendo que bajas concentraciones de AIB (0.5 a 1.5 mg/l) y concentraciones de 0.3 mg/l , para BAP generan la mejor respuesta embriogénica.

La ausencia de agua de coco en el medio de cultivo no afecta la inducción de embriones somáticos.

Para un mejor desarrollo de los embriones somáticos es importante separar las fases de inducción y desarrollo, por lo que el explante debe permanecer solo 3 semanas en presencia de reguladores de crecimiento (fase de inducción) y después completar su desarrollo en un medio libre de estos.

Altas concentraciones de sacarosa (45 y 60 g/l) permiten un mejor desarrollo de los embriones somáticos, mientras que la fuente de nitrógeno debe de ser de 60 mM.

La variedad Criollo presenta potenciales embriogénicos en presencia de AIB y BAP.

La composición de ácidos grasos para semillas maduras y embriones somáticos consiste de 4 componentes básicos (Palmítico, Esteárico, Oleico y Linoleico).

La vía de síntesis de los ácidos grasos de semillas y embriones somáticos tiene una gran similitud en cuanto a la composición pero con diferencias significativas en la concentración, siendo más baja para embriones somáticos.

## VII. B I B L I O G R A F I A.

Ammirato, P.V., Embryogenesis EN: Evans, D.A., W. Sharp, Y. Yamada y P. Ammirato (1982) Handbook of plant cell culture, Ed. MacMillan. Vol. 1, N.Y.

Archibald, J.F. (1954) Culture in vitro of cambial tissue of cocoa. Nature, Lond. 173:351-2.

Braudeu, J. (1970) El cacao. Ed. Blume, Barcelona, España.

Brunner B.B. et al. (1985) Acidification, proteolysis and flavour potential in fermenting cocoa beans. J. SCI. FOOD AGRIC. 36:583-598.

Burton, D.J. (1984) Química orgánica y Bioquímica. 1a. edición. Ed. Interamericana. México D.F.

Chapman, D. (1973) Lípidos, Ed. Alhambra S.A. Madrid, España.

Davis, T.R. y P. Dimick (1989) Lipid composition of high-melting seed crystals formed during cocoa butter solidification. J.A.O.C.S. 66 (10): 1494-1498.

De la Vega, Adolfo y A. Sotelo (1985) Estudio comparativo de la composición química del cacao (Theobroma cacao, L) y de dos Theobromas silvestres. Rev. Soc. Quim. Mex. 29 (5):325-328.

Díaz, G.M.(1989) Ecología del cacao y características de su agroecosistema en el estado de Tabasco. EN: Tercer taller de cultivo de cacao. SARH, U.N.P.C.; Huimanguillo, Tabasco. México.

Dublin, P.; Cacao EN: Evans et al. (1984) Handbook of plant cell culture, Ed. MacMillan, Vol. 1, N.Y.

Enríquez, G.A. (1985) Curso sobre el cultivo del cacao. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza CATIE. Turrialba, Costa Rica. pp 19-44.

Evans, D.A., W. Sharp, Y. Yamada y P. Ammirato (1984) Handbook of plant cell culture, Ed. MacMillan. Vol. 1, N.Y.

Folch, J. y G.H. Stanley (1956) A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. J. Biol. Chem. 226:497-509.

Geeraert, E. y P. Sandra (1987) Capillary GC of triglycerides in fats and oils using a high temperature phenylmethylsilicone stationary phase. Part II. The analysis of chocolate fats. J.A.O.C.S. 64 (1):100-105.

Griffiths, G. y J. Harwood (1989) Fat synthesis in cacao (Theobroma cacao). Biochemical Society Transactions. Vol 17: 688-689.

Hall, T.R. y H.A. Collin (1975) Initiation and growth of tissue cultures of Theobroma cacao. Ann. Bot. 39: 555-570.

Hardy, F. (1961) Manual del cacao. Botánica morfológica de la planta de cacao. Ed. Antonio Lehmann. Turrialba, Costa Rica. pp: 329-337.

Knorr, D., S. Miazga y R. Teutonico (1985) Plant tissue culture: Food applications. Food Technology.

Kononowicz, A.K. y J. Janick (1984) The influence of carbon source on the growth and development of asexual embryos of Theobroma cacao. *Physiol. Plant.* 61: 155-162.

Leathers, R. y A.H. Scragg (1989) The effect of different temperatures on the growth, lipid content and fatty acid composition of Theobroma cacao cell suspension cultures. *Plant Science* 62: 217-227.

Lehrian, D.W. y P. Keeney (1980) Triglyceride characteristics of cocoa butter from cacao fruit matured in a microclimate of elevated temperature. *J.A.O.C.S.* 66-69.

López, M.R. (1987) El cacao en Tabasco, 1a. edición, Universidad Autónoma Chapingo, México D.F.

Margara, J. (1982) Bases de la multiplicación vegetativa, Intitut National de la Recherche Agronomique, Versailles Paris.

Martin, D., P. Mayes y V. Rodwell (1982) Bioquímica de Harper, editorial El Manual Moderno, México D.F.

Metcalfe, L.D. y A. Schmitz (1961) The rapid preparation of fatty acid esters for gas chromatographic analysis. *Anal. Chem.* 33: 363-364.

Minifie, B.W. (1980) Chocolate, cocoa and confectionery: science and technology, 2° ed. Avi Publishing Company Inc. Westport, Connecticut.

Murashige, T. y F. Skoog (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tabaco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-475.

Patiño, V.M. (1958) Historia del género Theobroma en América equinoccial. EN: Conferencia Interamericana de cacao. Bogotá, Colombia. Ministerio de Agricultura.

Pence, V.C., P.M. Hasegawa y J. Janick (1979) Asexual embryogenesis in Theobroma cacao L., J. Amer. Soc. Hort. Sci. 104 (2): 145-148.

Pence, V.C., P.M. Hasegawa y J. Janick (1980) Initiation and development of asexual embryos of Theobroma cacao L. in vitro; Z. Pflanzenphysiol. 98: 1-14.

Pence, V.C., P.M. Hasegawa y J. Janick (1981) In vitro cotyledonary development and anthocyanin synthesis in zygotic and asexual embryos of Theobroma cacao. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 106 (3): 381-385.

Pence, V.C., P.M. Hasegawa y J. Janick (1981) Sucrose-mediated regulation of fatty acid composition in asexual embryos of Theobroma cacao. Physiol. Plant. 53: 378-384.

Street, H.E. (1977) Plant tissue and cell culture, 2nd ed. Univ. California Press, Berkeley.

Sharp, W.R., M.R. Sondahl, L.S. Caldas y S.B. Maraffa (1980) The physiology of in vitro asexual embryogenesis. Hort. Rev. 2:268-310.

Wang, Y. y J. Janick (1985) Characterizing the germination inhibitor from asexual embryo leachate of Theobroma cacao. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 110 (1): 113-117.

Wright, D.C., A.D. Kononowicz y J. Janick (1984) Factors affecting in vitro fatty acid content and composition in asexual embryos of Theobroma cacao. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 109 (1): 77-81.

Apéndice 1

MACRONUTRIENTES	CONCENTRACION (mg/l)
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650
KNO <sub>3</sub>	1900
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	370
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170
CaCl <sub>2</sub> · H <sub>2</sub> O	332
<b>MICRONUTRIENTES</b>	
KI	0.88
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.2
Mn SO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	16.9
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	8.5
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.25
CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0.025
CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0.025
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	27.8
Na <sub>2</sub> EDTA	37.3
<b>VITAMINAS</b>	
Acido nicotínico	0.5
Piridoxina-HCl	0.5
Tiamina-HCl	1.0
Mio-inositol	100
Glicina	2.0

Composición basal del Medio MS (Murashige y Skoog, 1962).

Apéndice 2

Análisis de Varianza y prueba de Tukey para las diferentes Auxinas y Citocininas probadas en el diseño experimental.

Análisis de Varianza

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Media cuadrados	Fcal	Fteo.
Auxina	0.36352	3	0.12117	7.756	0.017
Citoc.	0.16004	2	0.08002	5.122	0.0504
Error	0.09373	6	0.01562		

Prueba para el efecto llamado:

Citocinina

1	2	3	4	5	6
0.00000	0.00000	0.000	0.00000	1.00000	- 1.00000

Fuente	S.C.	GL	M.C.	Fcal.	Fteo.
Hipotesis	0.08611	1	0.08611	5.5124	0.0572
Error	0.09373	6	0.01562		

Ho: C1 = C2      6      C1-C2 = 0    \*

Ha: C1 ≠ C2      6      C1-C2 ≠ 0

Fuente	S.C.	GL	M.C.	Fcal.	Fteo.
Hipotesis	0.00788	1	0.00788	0.50413	0.5043
Error	0.09373	6	0.01562		

Ho: C1 = C3    \*

Ha: C1 ≠ C3

Ho: C2 = C3

Ha: C2 ≠ C3    \*

Prueba para el efecto llamado:

Auxina

Fuente	S.C.	GL	M.C.	Fcal.	Fteorica.
Hipótesis	0.005	1	0.005	0.298	0.605
Error	0.094	6	0.016		

Ho: A1 = A2 \*

Ha: A1 ≠ A2

Fuente	S.C.	GL	M.C.	Fcal.	Fteor.
Hipótesis	0.260	1	0.260	16.671	0.006
Error	0.094	6	0.016		

Ho: A1 = A3

Ha: A1 ≠ A3 \*

Fuente	S.C.	GL	M.C.	Fcal.	Fteor.
Hipótesis	0.000	1	0.000	0.000	0.992
Error	0.094	6	0.016		

Ho: A1 = A4 \*

Ha: A1 ≠ A4

Fuente	S.C.	GL	M.C.	Fcal.	Fteor.
Hipótesis	0.195	1	0.195	12.514	0.012
Error	0.094	6	0.016		

Ho: A2 = A3

Ha: A2 ≠ A3 \*

Fuente	S.C.	GL	M.C.	Fcal.	Fteor.
Hipótesis	0.005	1	0.005	0.308	0.599
Error	0.094	6	0.016		

Ho: A2 = A4 \*

Ha: A2 = A4

Fuente	S.C.	GL	M.C.	Fcal.	Fteor.
Hipótesis	0.262	1	0.262	16.751	0.006
Error	0.094	6	0.016		

Ho: A3 = A4

Ha: A3 ≠ A4 \*

Análisis de rango múltiple (Prueba de Tukey).

Prueba para citocininas a las 9 semanas (respuesta).

Nivel		Promedio (tukey)	Grupos homogéneos.
3	4	.1662500	*
1	4	.2912500	**
2	4	.4997500	*

Prueba para auxinas a las 9 semanas (respuesta).

Nivel		Promedio (tukey)	Grupos homogéneos
1	3	.1386667	*
4	3	.1940000	*
2	3	.3330000	**
3	3	.6106667	*

Prueba para auxinas a las 10 semanas (respuesta).

Nivel		Promedio (tukey)	Grupos homogéneos.
1	3	.1663333	*
4	3	.1940000	*
2	3	.3330000	**
3	3	.6383333	*

Prueba para citocininas a las 10 semanas (respuesta).

Nivel		Promedio (tukey).	Grupos homogéneos.
3	4	.1870000	*
1	4	.2912500	**
2	4	.5205000	*

Apéndice 3

		AIB (mg/l)			
		0.5	2.5	4.5	
BAP (mg/l)	0.1	2.97	0.83	0.41	1.40
	0.3	1	0.91	0	0.63
	0.5	1.66	0.33	0.16	0.72
		1.87	0.69	0.19	

Resultados obtenidos a partir de la prueba de comparación múltiple de Newman Keul's para embriones sexuales blancos.

		AIB (mg/l)			
		0.5	2.5	4.5	
BAP (mg/l)	0.1	1.5	0.33	0.49	0.77
	0.3	4.5	2.66	0.33	2.5
	0.5	0.66	1.16	0	0.61
		2.22	1.38	0.27	

Resultados obtenidos a partir de la prueba de comparación múltiple de Newman Keul's para embriones sexuales blanco con rosa.

		AIB (mg/l)			
		0.5	2.5	4.5	
BAP (mg/l)	0.1	0.75	0.33	0	0.36
	0.3	3.83	0.16	0	1.33
	0.5	0.33	2.24	0.33	0.97
		1.63	0.91	0.11	

Resultados obtenidos a partir de la prueba de comparación múltiple de Newman Keul's para embriones sexuales rosa.