

del árbol injertado; por ello se requiere una doble selección, del injerto y del portainjerto.

Desqueje. Los primeros ensayos de desqueje hortícola del hevea se hicieron en Ceylán en 1880. Rápidamente se comprobó que las tasas de enraizamiento de los esquejes del hevea variaban en función de los pies de cría. Wiersum comprobó en 1955 que el porcentaje de enraizamiento de los esquejes disminuía con el envejecimiento del árbol madre y que los mejores resultados se obtenían de yemas tomadas en la base del tronco (material juvenil). Muzik et al. (1958) confirmaron que la aptitud para el enraizamiento estaba vinculada con la juventud del material vegetal; estos investigadores tuvieron éxito en el desqueje del material clonal después de injertarlo una sola vez en plantas jóvenes. Mediante la utilización de buenas condiciones físicas de desqueje y un material 'joven', Levandowsky (1959) obtuvo hasta un 70% de enraizamiento.

Cualquiera que fuese la juventud de los esquejes utilizados, varios autores (MacIndoe, 1958; Levandowsky, 1959) comprobaron que había variabilidad en la estructura de los sistemas radicales y, en particular, debilidad en la raíz principal. La ausencia de raíz pivotante se traduce, en la práctica, en una fuerte disminución de la resistencia al viento y a la sequía. Este punto fue confirmado por los resultados del RRIM (Rubber Research Institute of Malaysia) donde el 80% de heveas jóvenes, de cuatro años, obtenidos de desquejes fueron desarraigados por el viento.

El desqueje hortícola del hevea, aunque realizable, nunca se ha utilizado en la práctica debido a las deficiencias del sistema radical de las plantas obtenidas de esquejes.

Técnicas de multiplicación vegetativa in vitro

Los cultivos in vitro de tejidos del hevea se realizaron con los siguientes objetivos: la obtención de callo y de suspensiones celulares (Wilson et al., 1974); la obtención de plantas haploides (Satchuthananthavale et al., 1972; Paranjothy et al., 1975; Chen-Chen et al., 1978); el aislamiento de protoplastos y la hibridación somática (Cailloux et al., 1979); la reproducción vegetativa (Carron, 1982; Enjalric, 1983); y la inducción del rejuvenecimiento.

Las investigaciones más estables e importantes sobre la multiplicación vegetativa in vitro del hevea han sido realizadas desde 1979 por el equipo del IRCA (Institut de Recherches sur le Caoutchouc). Estas investigaciones se hicieron en dos direcciones:

- La micropropagación del esqueje in vitro.
- La micropropagación por embriogénesis somática.

Microdesqueje. Los primeros intentos de desqueje in vitro del hevea fueron realizados, principalmente, por Enjalric (1983) y por Lardet (1984); fueron cultivos in vitro de fragmentos de tallo con yemas preexistentes y con puntas de brotes. Las observaciones hechas en los injertos en hevea permitieron considerar algunos parámetros para la selección del explante. En efecto, la reacción de éste depende de la edad de la planta, de la época en que es extraído, de su ubicación en la planta madre, y de sus dimensiones. El microdesqueje del hevea comprende cuatro etapas:

- La fase de proliferación durante la cual se activan las yemas axilares.
- La fase de desarrollo de las yemas activadas como tallos.
- La fase de multiplicación.
- La fase de enraizamiento y de transferencia a las condiciones corrientes del cultivo.

Los explantes están formados por fragmentos de tallo que comprenden 2 ó 3 entrenudos sin hojas. El hevea tiene un hábito de crecimiento rítmico determinado por vía endógena. Los estudios preliminares muestran que la reacción de las yemas axilares es independiente del estado de crecimiento; el explante puede tomarse en un período cualquiera del año. Después de desinfectar, enjuagar y fragmentar el explante, se somete éste a un tratamiento inductivo antes de colocarlo en el medio de cultivo. Se obtuvieron las mejores tasas de proliferación por inmersión de los explantes, durante dos horas, en una solución compuesta por elementos minerales de MS, y suplementada con BAP (44 μ M) y con AIB (25 μ M).

Después del pretratamiento, los explantes fueron cultivados en el medio mineral anterior desprovisto de reguladores del crecimiento, pero suplementado con carbón activado al 0.5% y con un contenido de sacarosa relativamente alto (60 g/litro).

La experiencia indica que un aumento en la duración del pretratamiento no afecta la proliferación, y que un contenido elevado de sacarosa en el medio la mejora. La adición de carbón activado al 0.5% reduce la tasa de proliferación pero favorece el alargamiento de los tallos. Una iluminación muy intensa disminuye el crecimiento de los tallos producidos por las yemas que han proliferado; de igual manera, la oscuridad, aunque no los afecta durante un período transitorio de diez días, se convierte también, más tarde, en un factor inhibitor.

La etapa de multiplicación comprende dos fases: la fragmentación en nuevos explantes del primer brote desarrollado in vitro, y los ciclos multiplicativos del explante primario. Después de un remojo durante 2 a 4 horas en una solución de inducción compuesta por BAP 44 μM + AIB 25 μM , los explantes primarios se trasplantan a un medio que contenga 60 g/litro de sacarosa. En estas condiciones se producen nuevos brotes, y el proceso puede repetirse 3 ó 4 veces.

Se ha comprobado un aumento de la miniaturización con cada nueva generación de brotes; en la tercera generación éstos están completamente bloqueados y son inutilizables. Por ello, un proceso totalmente libre de microdesqueje in vitro del hevea, es decir, sin el recurso periódico obligatorio a la planta donante, no ha podido establecerse hasta el momento.

La metodología empleada para el enraizamiento de los tallos es idéntica a la descrita para la callogénesis; comprende dos fases: una de inducción, donde el contenido de auxinas es elevado; y otra de desarrollo radical durante la cual el contenido de auxinas es reducido o nulo. En la fase de inducción, las bases de los brotes con hojas (separados del explante primario) se remojan en una solución de auxina; los mejores resultados se obtuvieron remojando durante tres días, en una solución que incluía 25 μM de AIB y 2.5 μM de ANA.

Los tallos así inducidos se trasplantan a un medio mineral sólido que contiene 40 g/litro de sacarosa. Aparentemente, una reducción del contenido de elementos minerales del medio no tiene efecto ni en la tasa de enraizamiento, ni en el desarrollo de las raíces. Además de los factores fisicoquímicos, el estado fisiológico del brote que enraiza desempeña un papel importante; así, los brotes en pleno crecimiento enraizan mejor que los que se hallan en crecimiento lento. Igualmente, hay una relación entre la facilidad de enraizamiento y la mayor o menor juventud de los tallos que están para enraizar.

El trasplante a tierra de los tallos de hevea enraizados en condiciones in vitro se hace fácilmente si se utiliza un sustrato con buen drenaje y con temperatura y luz adecuadas. Los mejores resultados se han obtenido con un sustrato compuesto de 1/3 de brezo, 1/3 de mantillo de corteza de pino, 1/3 de arena, humedad elevada, y una iluminación media. La experiencia señaló que las tasas de rebrote eran mejores cuando la transferencia era temprana y que había una tendencia al enraizamiento de los tallos cuando se trataban con el sustrato del vivero.

El sistema radical de los esquejes de hevea está formado principalmente por raíces plagiótropas. Después de colocadas en la tierra, algunas de estas

raíces toman una orientación ortótropa y hacen el papel de pseudopivote. La sensibilidad al viento y a la sequía son el mayor obstáculo para el empleo del hevea obtenido por desqueje; así se explica que, hasta el momento, las plantas de hevea obtenidas por desqueje hortícola *in vitro* no hayan salido del campo de la experimentación.

Toda esta información ha sido obtenida de plantas jóvenes de hevea. Los explantes obtenidos de material adulto con potencialidades agronómicas conocidas y, por consiguiente, los únicos dignos de interés, presentan inicialmente una débil reacción *in vitro*, y una tasa de proliferación de 30%, en lugar del 85% obtenido con material joven. Además, las yemas que han proliferado permanecen bloqueadas y no se desarrollan como tallos.

Mediante el injerto en cascada del material adulto, según la técnica de Franclet (1979), se obtiene rápidamente un nivel suficiente de rejuvenecimiento y una reacción adecuada a las condiciones *in vitro*. Desde la primera generación de injertos, la tasa de proliferación *in vitro* (30% para el material no injertado) se eleva a un 70%. La juventud del material parece tener repercusión directa sobre la producción (Chen-Chen et al., 1978). Varios procesos de rejuvenecimiento del material adulto, como el corte, el desqueje sucesivo, el injerto en cascada, y el cultivo *in vitro* (Libby, 1979) se experimentaron con éxito diverso.

La multiplicación vegetativa *in vitro* permite recuperar caracteres morfológicos y fisiológicos juveniles mediante la ruptura de las relaciones existentes entre el explante y el conjunto de la planta; la expresión de la potencialidad juvenil será tanto más acentuada cuanto menor sea el número de células diferenciadas que presente el explante de origen. El meristema, cultivado *in vitro*, puede revelar una autonomía potencial que hasta entonces había estado enmascarada por las condiciones de la planta entera.

El tamaño de los explantes parece también un factor esencial para su supervivencia, es decir, para la diferenciación celular, el desarrollo en brotes con hojas y el enraizamiento (Druart et al., 1982).

Los cultivos de ápices hechos por Lardet (1984) permitieron reducir las tasas de infección, generalmente altas en los fragmentos de tallo, pero sólo pudieron obtenerse callos y la formación de algunos esbozos foliares. En ningún caso fue posible que estos meristemas se desarrollaran como tallos.

Embriogénesis somática. Las investigaciones sobre la organogénesis en el hevea son más numerosas, y anteriores a las realizadas sobre el micro-desqueje en esta especie. Los primeros intentos de cultivo de tejidos de

hevea fueron hechos en el IRCA y el RRIM, en 1953. Se colocaron en cultivo fragmentos de tallos que produjeron callo, pero en ningún caso se regeneraron plántulas. También Wilson et al. (1974) obtuvieron callos y suspensiones celulares partiendo de fragmentos de tallo.

En cada especie vegetal existe un órgano o fragmento de órgano que proporciona el explante óptimo para un proceso de cultivo in vitro (Murashige, 1974). Por otra parte, numerosos autores han puesto en relieve la capacidad de organogénesis que presentan todos los tejidos relacionados con la flor. En 1972, Satchuthananthavale et al. realizaron los primeros intentos de cultivo de anteras de hevea, con miras a obtener plántulas haploides. Se obtuvieron callos de estructura nodular. Tres años más tarde se obtenían los primeros embrioides mediante cultivo in vitro de anteras (Paranjothy et al., 1975). La frecuencia de inducción de estos embrioides fue baja y raramente se obtuvieron plántulas.

Los trabajos más notables fueron realizados desde 1973 por equipos de investigadores chinos del Baoting Institute of Tropical Crops y de la South China Academy of Tropical Crops, quienes obtuvieron embriones somáticos partiendo de los tejidos diploides de las paredes de las anteras y de las microsporas (Chen-Chen et al., 1978; Wang et al., 1980). Varias plántulas obtenidas de estos cultivos de anteras se sembraron en tierra.

Los objetivos de estas investigaciones fueron: primero, obtener descendencias híbridas homogéneas partiendo de progenitores homocigóticos resultantes de haploides duplicados; y segundo, recuperar la 'juvenilidad' de los tejidos por medio de la embriogénesis somática. Sin embargo, a pesar del avance en el conocimiento de las técnicas in vitro, las tasas de producción de plantas todavía permanecen muy bajas por las dificultades que presenta el ulterior desarrollo de los embrioides. Los trabajos de los investigadores chinos subrayaron el papel determinante del factor genotipo; en efecto, la mayoría de las regeneraciones se obtuvieron de un solo clon, el Haiken 2.

Las investigaciones realizadas por el IRCA sobre la inducción de callos y la regeneración en el hevea comenzaron en 1979. Los primeros estudios sobre inducción de callos se hicieron en fragmentos de tallos de heveas jóvenes obtenidos de semilla. Después de una desinfección clásica con hipoclorito de calcio al 10%, los explantes se cultivaron en cámaras controladas (fotoperíodo de 12 h, a 27 °C) en el medio de Murashige et al. (1962) suplementado con diversas combinaciones de citocininas y auxinas.

La capacidad de inducción de callos en fragmentos de tallo de una misma planta varía según la posición del explante a lo largo del tallo. Los

explantes más cercanos al punto de inserción de los cotiledones reaccionan mejor que los situados más arriba; la parte inferior del epicótilo aparece entonces como la zona más apta para la inducción de callos en las plántulas jóvenes del hevea.

El hevea tiene un crecimiento rítmico cuyas fases han sido descritas por diferentes autores (Lavarenne-Allary, 1965). El cambium, que se origina en los callos de los fragmentos de tallo, presenta también una actividad rítmica, en armonía con la del meristema apical. La inducción de callos es más rápida en los explantes cuyo cambium se encuentra en un período de reposo.

Diferentes medios se ensayaron en la inducción de callos; la combinación de nutrimentos que dio los mejores resultados fue la siguiente: el medio mineral de MS, las vitaminas de Morel, 2,4-D ($4.5 \mu\text{M}$), KIN ($4.6 \mu\text{M}$) y sacarosa (234 mM). El remplazo, en esta combinación, de la KIN por BAP, causa un cambio profundo en la estructura de los callos: BAP genera una estructura compacta con superficie granulosa, mientras que la KIN produce callos compactos con protuberancias y una fuerte tendencia a adquirir un color verde en presencia de la luz. El suministro simultáneo de 2,4-D tiene un efecto sinérgico sobre la proliferación celular; además, esta combinación permite mantener esa proliferación en un nivel alto. No obstante, todos los intentos de regeneración partiendo de los callos de fragmentos de tallo fracasaron.

Según Nozeran et al. (1969), el sistema radical inhibe la progresión de los fenómenos morfogénicos que se manifiestan desde la germinación. Así, próximas a este sistema radical están las yemas que se desarrollan cuando se acerca un estado de actividad juvenil. La flor es también la sede de ese rejuvenecimiento fisiológico y morfológico cuya expresión más intensa se halla, sin embargo, en la semilla y en el embrión en desarrollo. Este rejuvenecimiento puede extenderse también al fruto, a ciertos componentes florales, e incluso a las estructuras vegetativas cercanas a la flor. En relación con este punto, muchos autores han hecho hincapié en la capacidad de la embriogénesis somática de los tejidos de anteras de hevea (Paranjothy et al., 1975; Wang et al., 1980). Se descubrieron asimismo tejidos con potencialidades embriogénicas en las semillas inmaduras del hevea (Carron, 1982).

En el momento de la fecundación, el óvulo del hevea mide aproximadamente 0.1 mm. Durante los primeros meses después de la fecundación, sólo los tejidos maternos (tegumento interno, tegumento externo y nucela) crecen mientras que el embrión, todavía constituido por algunas células,

permanece anclado cerca del micrópilo; más tarde reanudará su crecimiento y alcanzará su tamaño definitivo, tres meses después de la fecundación.

Se cultivaron fragmentos de tegumento, restos de nucela y semillas inmaduras en un medio mineral MS suplementado con tiamina ($2 \mu\text{M}$), inositol ($550 \mu\text{M}$), 2,4-D ($4.5 \mu\text{M}$), KIN ($2.25 \mu\text{M}$) y sacarosa (243mM). De estos tejidos, la nucela y el tegumento interno produjeron callos; la mayor proliferación de callos se obtuvo en el cultivo de las semillas que habían alcanzado su tamaño definitivo pero que todavía eran inmaduras. Los callos producidos por la nucela son traslúcidos y esponjosos, mientras aquéllos obtenidos de los tegumentos internos son amarillentos y friables.

Después de varios subcultivos en medios de la misma composición del anterior—excepto que KIN y 2,4-D se sustituyen por ANA ($9.9 \mu\text{M}$) y BAP ($9 \mu\text{M}$)—aparecen nódulos meristemáticos y luego embrioides en los callos resultantes de los tegumentos internos. Aunque estos embrioides se cultivaron en una gama de medios diferentes, permanecieron bloqueados y no se desarrollaron como plántulas; en varios casos, desarrollaron un sistema radical pivotante fuerte, coronado sólo por hojas cotiledonares.

Las condiciones de inducción de la embriogénesis somática en el hevea están mal definidas; diferentes autores (Paranjothy et al., 1975; Chen-Chen et al., 1978) utilizan el medio MS suplementado con KIN o BAP (0.1 a 0.5 mg/litro), ANA (0.1 a 0.3 mg/litro), bromouracilo (0.3 mg/litro), agua de coco (5%-10%), y una fuerte concentración de sacarosa. Prescindiendo de las condiciones de cultivo y del tipo de explantes empleados (anteras, tegumentos ovulares) el desarrollo de los embrioides en plántulas organizadas continúa siendo muy difícil y aleatorio.

Conclusiones

El problema de la multiplicación vegetativa in vitro del hevea sigue prácticamente sin resolver. En el microdesqueje, la etapa de la obtención continua de tallos in vitro durante generaciones sucesivas que parten de una sola planta primaria, no ha podido lograrse. Los tallos de la segunda o tercera generación, obtenidos del ciclo continuo del explante primario o de los tallos de la primera generación, adquieren rápidamente una miniaturización excesiva que los vuelve inutilizables; a menudo, no van más allá de la etapa de yemas que proliferan pero que permanecen bloqueadas.

El enraizamiento no plantea mayores dificultades, aunque el sistema radical conserva una tendencia plagiótropa, aun en esquejes obtenidos de

heveas jóvenes o de clones rejuvenecidos por injerto. Un sistema radical pivotante, con anclaje potente y profundo, le confiere a la planta mayor resistencia contra el viento y la sequía, una característica indispensable para el árbol de hevea. Por embriogénesis somática se han obtenido en la China (Chen-Chen et al., 1978) pocos heveas con ese carácter; actualmente, a los cinco años de su obtención in vitro, presentan éstos un desarrollo morfogenético y un comportamiento en el campo idéntico al del hevea obtenido por reproducción sexual.

La inducción de la embriogénesis somática en el hevea y el desarrollo de embriones hasta plántulas organizadas es aún, desafortunadamente, un proceso muy aleatorio y fuertemente ligado al genotipo. Sin embargo, los explantes provenientes de los órganos florales, particularmente los de las anteras, son muy promisorios.

Cacao

Introducción y antecedentes históricos

Entre las diferentes especies del género *Theobroma*, sólo el cacao (*Theobroma cacao*) se cultiva comercialmente. Originario de los valles amazónicos, el cacao cultivado presenta una gran variabilidad en sus características: color, dimensiones y forma de las flores, de los frutos y de las semillas.

Según Cheesman (1944) el cacao cultivado se divide en dos poblaciones: criollo y forastero; el cacao forastero comprende, a su vez, dos grupos: alto amazónico y bajo amazónico. El tipo amelonado se cultiva en África occidental y en Brasil y pertenece al grupo forastero bajo amazónico. El grupo forastero alto amazónico tiene importancia primordial en el mejoramiento genético del cacao por su resistencia a varias enfermedades que atacan esta especie. El tipo trinitario es el resultado de cruces naturales entre forastero bajo amazónico y criollo, y constituye una tercera población muy diferente de las anteriores.

El cacao cultivado tiene numerosas características como el dimorfismo vegetativo, los tallos floridos, las flores con anteras escondidas que producen poco polen, la breve viabilidad de las flores (48 h), la autoincompatibilidad, y la escasa viabilidad de las semillas, caracteres que inciden directamente en el mejoramiento de esta especie.

El cacao produce muchas flores (de 20 a 100,000 por árbol). Por diferentes razones, algunas todavía desconocidas, menos del 5% de estas flores se

convierten en frutos. La producción individual del cacaotero varía considerablemente: bajo polinización natural, un árbol puede producir de 0 a 700 mazorcas al año.

El mejoramiento del cacao cultivado se basa esencialmente en el aprovechamiento de una heterosis de grupo que aparece en todos los cruzamientos, y que asocia un progenitor alto amazónico (UPA = 'upper amazonian') con un progenitor de uno cualquiera de los tipos de otros grupos (amelonado o trinitario), genéticamente más distantes (Braudeau, 1969). Los híbridos amazónicos obtenidos de estos cruces se caracterizan por su gran vigor, su precocidad para la producción, y una gran heterogeneidad de todos sus caracteres. Esta heterogeneidad es la consecuencia directa de la heterocigosis de los progenitores UPA, especialmente, que son autoincompatibles. El descubrimiento de los primeros haploides del cacao y la obtención de progenitores fértiles (Dublin, 1972; 1974) permitió crear híbridos amazónicos homogéneos y aprovechar mejor el fenómeno de la heterosis del cacao.

La heterogeneidad genética de las poblaciones de cacao suscitó rápidamente el interés por una selección basada en la reproducción asexual. La selección clonal del cacao se realizó por primera vez en Trinidad con el híbrido natural trinitario; luego se extendió a varios países productores de cacao. Se elaboraron diversas técnicas de esqueje bajo invernáculo partiendo de ramificaciones plagiótropas jóvenes (Pyke, 1933).

En un cacao adulto, recién seleccionado como cabeza de clon, la totalidad de sus ramificaciones con hojas son, en realidad, plagiótropas. El cacao obtenido de esquejes plagiótropos tiene porte extendido y requiere cortes frecuentes. Además, su sistema radical no es pivotante y por ello la planta es sensible a la sequía; ésta es la causa de las pérdidas que se registran en las siembras clonales iniciadas con esquejes plagiótropos. Los injertos sobre plantas nacidas de semilla, para compensar la ausencia de raíz pivotante, no han dado los resultados esperados. Por otra parte, la reproducción por esqueje plagiótropo de individuos de alto desempeño y de alta productividad y su selección, es una práctica poco confiable.

Estas dificultades llevaron progresivamente al abandono de la selección clonal en beneficio de una selección sexual basada en la heterosis, que resultó favorecida también por el descubrimiento de los haploides y el perfeccionamiento de las técnicas de su diploidización (Dublin, 1974).

La reproducción vegetativa in vitro del cacao tiene ciertas ventajas: un coeficiente elevado de multiplicación, mejor enraizamiento, y una posibilidad de reversión de la plagiotropía en ortotropía (Dublin, 1984); ellas

contribuirían a su mejoramiento genético mediante una nueva evaluación de la selección clonal. La micropropagación del cacao facilitará los intercambios de material vegetal, la creación de colecciones de plantas in vitro y la salvaguardia de los recursos genéticos de la especie, hoy amenazados por varias enfermedades criptogámicas (*Phytophthora*, moniliasis).

Los primeros intentos del cultivo de tejidos en cacao fueron hechos por Archibald (1954); se colocaron fragmentos de tallo en el medio de White (1939) desprovisto de todas las sustancias de crecimiento, y se obtuvieron callos que no regeneraron plantas. Las investigaciones más importantes sobre el cultivo in vitro de los tejidos de cacao fueron hechas durante estos últimos años por Hall et al. (1974), Orchard et al. (1979), Esan (1975), Pence et al. (1979; 1981), y Passey et al. (1983).

Hall et al. (1974) cultivaron fragmentos de tallos ortótopos de cacao joven de los tipos amelonado y alto amazónico en diferentes medios basales (White, 1939; Murashige et al., 1962) suplementados con sustancias de crecimiento simples o complejas (KIN, AC, extracto de frutos del cacao) y con diferentes combinaciones de temperatura y luz. Obtuvieron callos, pero todos los intentos de regeneración de las plantas fracasaron.

Orchard et al. (1979) realizaron cultivos de ápices en el medio de Linsmaier et al. (1965) suplementado con diversas sustancias de crecimiento (KIN, ZEA, AIB, AIA, AG). Los ápices extraídos de plantas jóvenes de cacao del grupo alto amazónico se cultivaron en un medio sólido y en un medio líquido agitado; se obtuvo una tumefacción de los meristemas cultivados, seguida en algunos casos de una elongación de las hojas.

K. Miller en Kew Gardens hizo cultivos de nudos con el propósito de obtener tallos in vitro y luego plantas enraizadas; ensayó durante cuatro años diferentes combinaciones de medios y de reguladores del crecimiento, pero sólo logró que algunas yemas proliferaran sin que se formaran tallos.

Passey et al. (1983) cultivaron ápices caulinares y nudos de 0.5-1 cm de longitud extraídos de brotes jóvenes en pleno crecimiento, y los colocaron en un medio de MS suplementado con diversas combinaciones de citocininas (BAP, ZIP, IPA) y de auxinas (AIB, ANA). Obtuvieron algunos brotes con hojas de escaso desarrollo; a pesar de las frecuentes transferencias a un medio fresco, ninguno de estos brotes sobrevivió más de 12 meses. En un medio basal suplementado con giberelinas se logró la elongación de hojas y entrenudos, pero ni unas ni otras continuaron creciendo. Asimismo, se indujo el enraizamiento de explantes primarios y de brotes separados del explante de origen cultivándolos en un medio mineral de

concentración débil, suplementado con AIB (2.5 μM), ANA (2.5 μM), y fluoroglucenol (1 mM). Sin embargo, no pudo obtenerse ningún crecimiento regular de los brotes hasta un nivel satisfactorio de reproducción in vitro del cacao.

Maxwell et al. (1984) obtuvieron nudos de brotes jóvenes de plantas de cacao amelonado de 4 a 5 años de edad. Estos explantes se cultivaron en un medio basal simple, suplementado con reguladores del crecimiento, y produjeron una primera generación de brotes.

Esan (1975) y Pence et al. (1979) realizaron varios trabajos de aproximación, con una orientación diferente. Obtuvieron embriones somáticos de la gemación directa de los tejidos de embriones sexuales inmaduros del cacao, en un medio mineral de MS suplementado con ANA y compuestos complejos (AC, CH). Los embriones somáticos, incapaces de desarrollarse hasta plántulas, procedían ya sea directamente de los tejidos somáticos de embriones sexuales o de los callos originados en tejidos jóvenes de esos mismos embriones (Kononowicz et al., 1984).

Estos datos muestran claramente que dificultades inherentes a *T. cacao* han obstaculizado, hasta el momento, el establecimiento de procedimientos de reproducción vegetativa in vitro de esa especie.

Multiplicación in vitro: avances recientes

Los resultados obtenidos por el CIRAD (Dufour et al., 1985) brindan nuevas orientaciones a la investigación sobre la multiplicación vegetativa in vitro del cacao. Algunos de estos resultados se discutirán a continuación junto con la metodología empleada para llegar a ellos.

El cultivo in vitro de un órgano o de un fragmento de órgano, con miras a su reproducción vegetativa, se desarrolla siguiendo una estrategia clásica que comprende tres etapas esenciales:

- La instalación del cultivo en condiciones in vitro.
- La multiplicación activa de las estructuras capaces de desarrollarse como individuos idénticos a la planta donante.
- El paso de la heterotrofia a la autotrofia, y la adaptación de las plántulas obtenidas a las condiciones ordinarias de cultivo.

La primera etapa es a menudo delicada, particularmente en las plantas leñosas; en ella se presentan infecciones y oxidaciones fenólicas. Los explantes primarios utilizados durante nuestras investigaciones estaban

formados por fragmentos de tallos jóvenes ortótropos, de 4 a 5 cm de longitud, que contaban con 1 ó 2 nudos. Estos explantes se extrajeron de plantas jóvenes de cacao amelonado de 8 a 10 meses, se lavaron con agua corriente suplementada con un agente humectante, se remojaron rápidamente con alcohol de 70^o, y se enjuagaron con agua destilada.

Se utilizaron dos productos desinfectantes, hipoclorito de calcio y peróxido de hidrógeno (10% en volumen), con un tiempo de remojo diferente (20 a 60 minutos), y en atmósfera normal o con vacío parcial. La mejor desinfección se obtuvo remojando los explantes durante 45 minutos al vacío, en una solución de hipoclorito de calcio al 10% seguida de tres enjuagues con agua destilada estéril. Las tasas de infección (25%) se mantuvieron elevadas a causa de infecciones bacterianas, posiblemente debidas a bacterias endógenas, que aparecieron en los subcultivos sucesivos.

El medio basal que se utilizó con más frecuencia estaba compuesto por elementos minerales del medio de MS suplementado con vitaminas de Morel. Se ensayaron varias sustancias de crecimiento (citocininas, auxinas, giberelinas) así como varias concentraciones de sacarosa, en medio sólido (Bacto Agar Difco a 7 g/litro) y en medio líquido no agitado. El pH de los medios se ajustó a 5.6 antes de colocarlos en el autoclave, donde estos medios se esterilizaron a 120 °C durante 20 minutos. Los cultivos se colocaron en cámara termoregulada (25 y 27 °C) con una iluminación reducida (80 $\mu\text{E}/\text{m}^2$ por sg) y un fotoperíodo de 12 horas. Cuando se estudió el efecto de los factores físicos se empleó un medio que contenía los elementos minerales de MS suplementados con 2.5 μM de BAP. Para discutir mejor los resultados obtenidos, se los ha agrupado en los siguientes temas.

Intercambio gaseoso. Los desarrollos espontáneos de callo en los explantes de cacao cultivados in vitro en medios no inductores de callos se deben, tal vez, a factores endógenos o a un equilibrio gaseoso inadecuado en los explantes. Para mejorar ese intercambio gaseoso, se ensayaron dos tipos de tapones (algodón y policarbonato) y tres recipientes de forma y volumen diferentes. Se registró (Figura 26.1) una mejoría en las tasas de proliferación celular con los tapones de algodón cuya capacidad de intercambio gaseoso es mejor que la de los capuchones de policarbonato; para un contenido de BAP de 2.5 μM en medio sólido, las tasas de proliferación fueron 9% con los capuchones de policarbonato y 39% con los tapones de algodón. También se ensayaron tres tipos de recipientes: tubos de ensayo de 70 cc y de 110 cc (con tapones de algodón) y potes de vidrio de 250 cc con cierre de aluminio; se encontró que el mayor volumen de los recipientes de cultivo tenía un efecto positivo en la tasa de proliferación.

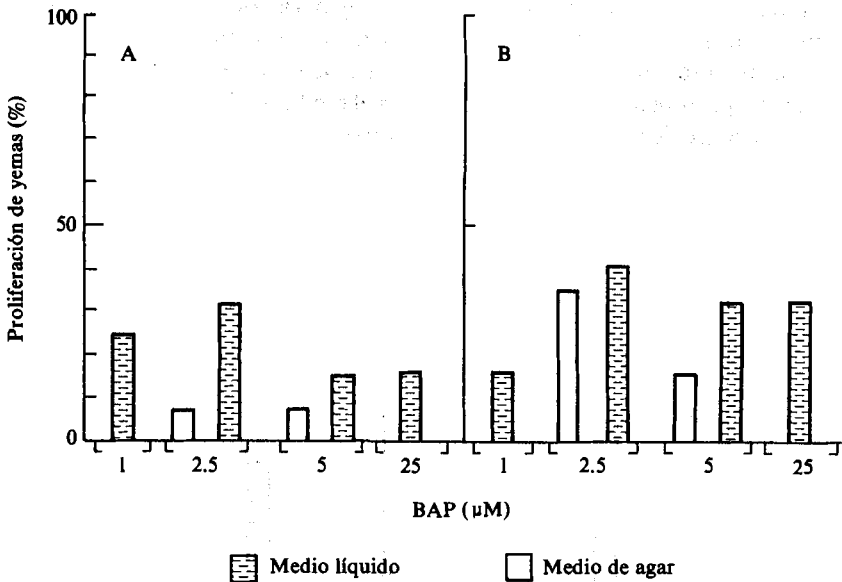


Figura 26.1. Influencia de la naturaleza física del medio y del tipo de tapón del recipiente en el porcentaje de proliferación de las yemas axilares del cacao (*T. cacao*). A) Capuchones de policarbonato; B) tapones de algodón.

Estructura de los medios. Se compararon dos medios de cultivo, uno sólido con 7 g/litro de Bacto Agar Difco, y otro líquido; en este último, las bases de los explantes se colocaron entre los pliegues de un papel filtro doblado en forma de acordeón y sumergido hasta la mitad en el medio líquido. Se comprobó (Figura 26.1) mayor proliferación y menor callogenesis en el medio líquido.

Carbón activado. Los efectos del carbón activado en el cultivo in vitro son muchos, y a veces opuestos; se ha utilizado, por ejemplo, para intensificar la rizogénesis o para obtener la elongación de los tallos. Los fragmentos de tallos de cacao cultivados en un medio suplementado con carbón activado (0.5 g/litro) presentan una reducción de la callogenesis junto con un mejoramiento de las tasas de proliferación; sin embargo, el medio recibió una dosis doble de BAP (5 µM en vez de 2.5 µM).

Macroelementos. El medio normal de MS, utilizado para el estudio de los factores físicos, puede considerarse como un medio rico con tendencia a la inducción de callos. Para aminorar esta formación de callo no controlada y favorecer el desarrollo de las yemas axilares hasta que se conviertan

en tallos capaces de producir una segunda generación de microesquejes (repetiendo el ciclo sucesivamente), se ensayaron varias concentraciones de macroelementos, de sacarosa, y de auxinas. Se comprobó (Figura 26.2) que los mejores resultados se obtenían con el medio MS diluído a la mitad y con un contenido de sacarosa de 20 g/litro.

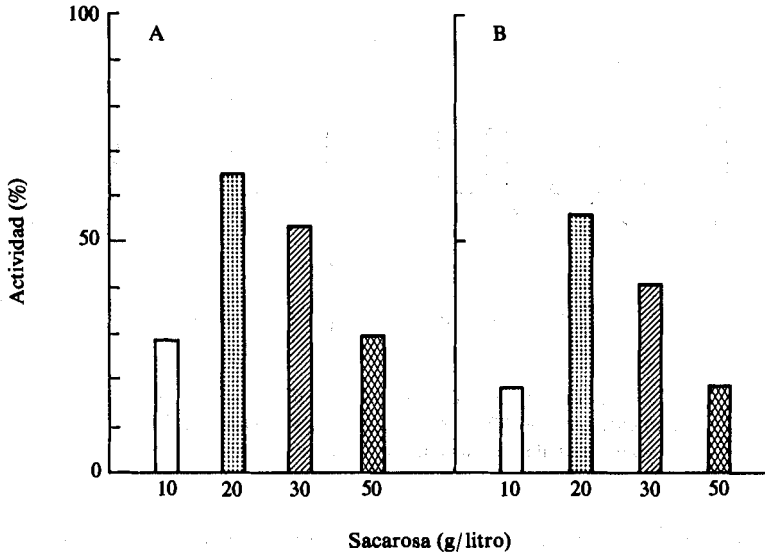


Figura 26.2. Influencia de la concentración de sacarosa en la expansión (A) y proliferación (B) de las yemas axilares del cacao.

Citocininas. Se emplearon tres citocininas: BAP, KIN y N-6-isopentilaminopurina (IPA), en concentraciones variables. Se comprobó (Figura 26.3) que las mejores tasas de proliferación se obtuvieron con BAP en una concentración de 2.5 μM . Cualquiera sea la dosis de citocinina de los medios, siempre se presentan formaciones de callo que invaden los explantes e inhiben el crecimiento de las yemas que proliferan.

Auxinas. Se ensayó una sola auxina, AIB, conjuntamente con BAP. La adición de la auxina al medio de cultivo favorece la proliferación de las yemas axilares y el vigor de los tallos. La combinación AIB (24.6 μM) y BAP (2.22 μM) permite obtener brotes vigorosos con entrenudos largos.

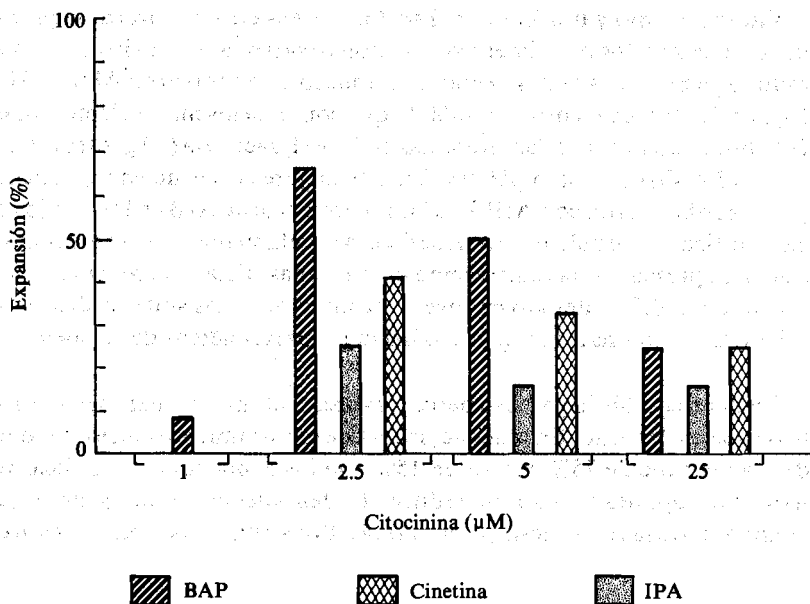


Figura 26.3. Tasa de expansión de las yemas del cacao respecto a la concentración de tres citocininas, después de dos meses de cultivo.

Giberelina. Se ensayó el AG en dos modalidades: adicionado al medio de cultivo —y esterilizando éste en autoclave— o colocado en condiciones estériles directamente sobre las yemas latentes. En cada caso se emplearon dos concentraciones, 10 µM y 1 µM. No se observó ninguna mejoría en las proliferaciones ni en el desarrollo de las yemas hasta tallos. En algunos casos se observó una elongación de las hojas de lámina estrecha o de los tallos, aunque éstos siempre permanecían endebles.

La experiencia enseña que tanto la velocidad como la tasa de proliferación dependen de la posición de los explantes en su tallo de origen. Las yemas cercanas a la extremidad del tallo se desarrollan más rápidamente que las que están más alejadas del meristema terminal. La reactivación de estas últimas es a veces difícil de lograr. Con el fin de apresurar la ruptura de la latencia de estas yemas, se pretrataron los explantes con diversas combinaciones de AIB y BAP, remojándolas durante lapsos variables. Los mejores resultados se obtuvieron con un remojo de dos horas en una solución que contenía 44 µM de BAP y 25 µM de AIB. Los explantes pretratados se cultivaron en un medio desprovisto de reguladores del crecimiento.

Enraizamiento y transferencia al suelo. Los ensayos de enraizamiento se hicieron con tallos de primera generación desarrollados *in vitro*, ya separados o ya provistos de sus explantes primarios. Se ensayaron AIA y AIB a 10, 30 y 50 μM , en medio basal sólido que contenía los macroelementos de MS diluidos a la mitad, las vitaminas de Morel, sacarosa (30 g/litro), Agar Difco (7 g/litro), y cuyo pH era 5.6. Las mejores tasas de enraizamiento (50%) se obtuvieron con AIB 30 μM . La presencia de AIB en los medios de cultivo tiene un doble efecto benéfico: paralelamente a la formación de raíces, se presenta una reactivación de las yemas. Esta se debe, sin duda, a un aumento del contenido endógeno de las citocininas sintetizadas en las raíces, las cuales habrían migrado hacia las partes aéreas del esqueje.

Un buen equilibrio gaseoso parece favorecer el enraizamiento *in vitro* de los esquejes de cacao. En realidad, la tasa de enraizamiento con los tapones de algodón fue de 75% contra un 15% con los capuchones de policarbonato. Los tapones de algodón reducen los fenómenos de calogénesis que compiten con la rizogénesis (Figura 26.4). Por su parte, la comparación de

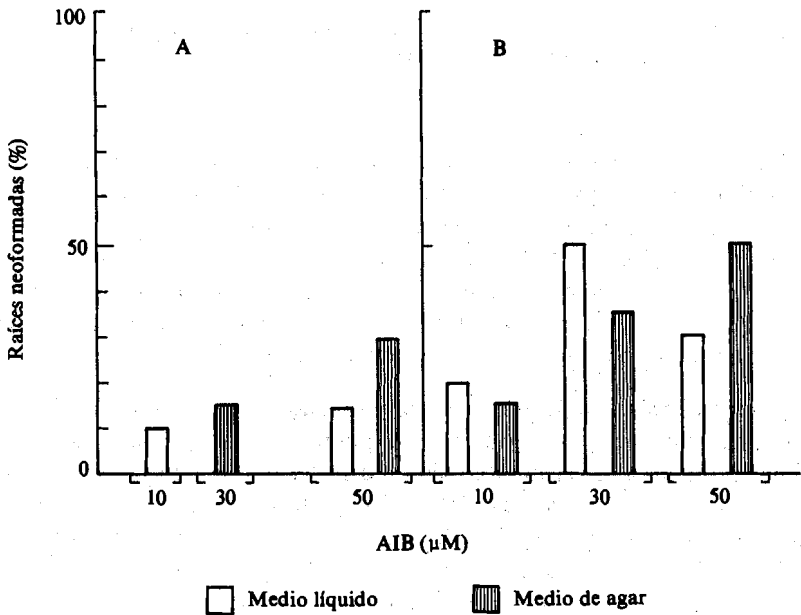


Figura 26.4. Porcentaje de raíces neoformadas de cacao en función de la naturaleza del medio de cultivo, de la concentración de AIB, y del tipo de tapón del recipiente. A) Capuchones de policarbonato; B) tapones de algodón.

dos medios de enraizamiento de la misma composición pero de estructura diferente, uno líquido y el otro solidificado con 6 g/litro de Bacto Agar Difco, indica que las tasas de enraizamiento son mejores en los medios sólidos.

Se ha recomendado con frecuencia reducir la concentración de los elementos minerales de los medios que se emplean en la inducción de la rizogénesis. Se ensayaron tres soluciones de macroelementos: MS, MS a la mitad, y MS a la cuarta parte, combinadas con tres dosis de AIB. Se comprobó que una dilución de la solución de macroelementos es favorable para el enraizamiento in vitro de los esquejes de cacao, con tal que esa dilución no sea muy importante.

Cumplido el proceso de enraizamiento, las necesidades de sacarosa varían en proporción notable según el tipo de planta. Una disminución del contenido de sacarosa de los medios de enraizamiento es a menudo favorable, aunque se han señalado ejemplos de un mejoramiento de la rizogénesis cuando aumenta la dosis de sacarosa. Se ensayaron pues cinco contenidos de sacarosa (5, 10, 30, 50, y 70 g/litro) combinados con tres dosis de AIB (10, 30, 50 μM), en medios líquidos y sólidos. Se comprobó que cualquiera sea la estructura de los medios, los mejores enraizamientos se obtienen con 30 g/litro de sacarosa.

Passey y Jones (1983) obtuvieron hasta un 80% de esquejes de cacao enraizados in vitro, en un medio que contenía AIB 2.5 μM , ANA 2.5 μM y fluoroglucinol 1 mM. La adición de una cantidad equivalente de fluoroglucinol a un medio que contenía AIB 5 μM no mejoró de manera significativa el enraizamiento in vitro de los esquejes de cacao. La combinación de ANA + AIB, más activa que el AIB solo, podría explicar los resultados obtenidos por Passey y Jones.

Los microesquejes enraizados que se obtuvieron durante las experiencias anteriores se trasplantaron al sustrato del vivero y se colocaron en un recinto controlado (27 °C) con una humedad de 100%. La tasa de recuperación fue del 100%. Estos esquejes produjeron hojas rápidamente y se transformaron en plántulas de desarrollo normal. Esta última etapa de adaptación del cacao enraizado in vitro a las condiciones corrientes de cultivo no presenta ninguna dificultad.

Conclusiones

Los resultados anteriores muestran que es posible obtener, con fragmentos de tallos ortótropos de cacao cultivados in vitro, microesquejes

enraizados que después de trasferidos a las condiciones corrientes de cultivo producen plántulas bien desarrolladas, aptas para su siembra en el campo. No obstante, no se puede afirmar que la reproducción vegetativa in vitro del cacao cultivado esté ya lista; por el contrario, el problema de la micropropagación del cacao todavía está por resolverse casi en su totalidad. La etapa principal, la multiplicación in vitro de generaciones sucesivas de tallos partiendo de un mismo explante, no ha terminado aún.

Los resultados experimentales antes descritos han permitido precisar varios puntos y señalar nuevas orientaciones a la investigación que harán progresar la micropropagación del cacao.

- Los medios básicos destinados a fomentar tanto la proliferación celular como el enraizamiento in vitro deben ser poco ricos en elementos minerales (MS a la mitad). Las necesidades de sacarosa son diferentes según las etapas del microcultivo: 20 g/litro para fomentar el desarrollo del callo y 30 g/litro para inducir la rizogénesis.
- El porcentaje de yemas que han proliferado puede mejorarse de modo notable si se remojan los explantes en una solución de BAP, antes de colocarlos en cultivo.
- La tendencia a la callogénesis anárquica, típica de cualquier explante de cacao colocado in vitro, constituye un serio problema para la multiplicación vegetativa in vitro del cacao mediante el microdesqueje. Estas formaciones callosas pueden reducirse mejorando el equilibrio gaseoso, lo que se logra con una selección razonable de los recipientes de cultivo y de sus tapones. La prioridad que se da a la reducción de la callogénesis explica, en parte, ciertas orientaciones —disminución de los elementos minerales y de la sacarosa en el medio de cultivo— derivadas de los resultados de estas investigaciones.

Referencias

- Amar, C., 1984. Contribution à l'étude du comportement de plantules *Coffea arabica* développés in vitro à l'égard de la rouille orangée *Hemileia vastatrix* Berk et Br. Tesis (D.e.A.) Université de Sciences et Techniques du Languedoc (USTL), Montpellier, Francia. 66 p.
- Aponte de Londoño, M. E. 1981. Cultivo de meristemas de café. Cenicafé (Colombia) 32(3):106-111.
- Archibald, J. F. 1954. Culture in vitro of cambial tissue of cocoa. Nature (Londres) 173:351-352.

- Berthaud, J. 1977. Caractéristiques comparées des hybrides interspécifiques tétraploides et hexaploides *C. arabica* x *C. canephora*. Colloque de l'Association Scientifique International du Café (ASIC), 8ème, Abidjan. p. 197-202.
- . 1980. L'incompatibilité chez *Coffea canephora*. Méthode de test et déterminisme génétique. Colloque de l'Association Scientifique International du Café (ASIC), 9ème, Londres. p. 517-516.
- Bettemcourt, A. J.; Lorpès, I. L. y Godinho, N. 1980. Genetic improvement of coffee: Transfer of factors for resistance to *Hemileia vastatrix* Berk and Br. into high yielding cultivars of *Coffea arabica* L. Colloque de l'Association Scientifique International du Café (ASIC), 9ème, Londres. p. 647-658.
- Braudeau, J. 1969. Le cacaoyer. Maisonneuve et Larose, Paris. 304 p.
- Cailloux, M. y Lleras, E. 1979. Fusão de protoplastos de *Hevea brasiliensis* Muell. Arg. e *Hevea pauciflora* Muell. Arg.: Estabelecimento de técnica. Acta Amazonica 9(1):9-13.
- Capot, J. 1972. L'amélioration du caféier en Côte d'Ivoire: les hybrides *Arabusta*. Café-Cacao-Thé 16(1):3-17.
- Carron, M. P. 1982. L'embryogenèse somatique de l'*Hevea brasiliensis* (Kunth) Muell. Arg.: Une technique de multiplication végétative au service de l'amélioration génétique. Tesis. Université de Sciences et Techniques du Languedoc (USTL), Montpellier, Francia. 167 p.
- Carvalho, A. 1982. Melhoramento do cafeiro: Cruzamentos entre *C. arabica* et *C. canephora*. Colloque de l'Association Scientifique International du Café (ASIC), 10ème, Salvador, Bahia, Brasil. p. 363-368.
- et al. 1982. Present status of research on *Icatu coffee*. Colloque de l'Association Scientifique International du Café (ASIC), 10ème, Salvador, Bahia, Brasil.
- Cheesman, E. E. 1944. Notes on the nomenclature, classification and possible relationship of cacao populations. Trop. Agric. (Trinidad) 21:144-159.
- Chen-Chen, H. et al. 1978. Obtaining pollen plants of *Hevea brasiliensis* Muell. Arg. Proceedings of a symposium on plant tissue culture, Pekín. p. 11-12.
- Cherrier, A. 1980. Conservation of the genetic resources of the genus *Coffea*. En: Colloque de l'Association Scientifique International du Café (ASIC), 9ème, Londres. p. 507-526.
- . 1982. L'amélioration génétique des cafés. La Recherche (Paris) 13(136): 1006-1016.

- Couturon, E. y Berthaud, J. 1982. Présentation d'une méthode de récupération d'haploïdes spontanés et d'obtention de plantes diploïdes homozygotes chez les caféiers de l'espèce *C. canephora*. Colloque de l'Association Scientifique International du Café (ASIC), 10ème, Salvador, Bahia, Brasil.
- Custers, J. B. M. 1980. Clonal propagation of *Coffea arabica* L. by nodal culture. Colloque de l'Association Scientifique International du Café (ASIC), 9ème, Londres. 589-591.
- Danchechin Dorval, J. B. 1983. Microgreffage d'apex d'embryons somatiques chez le *C. coffea*. Tesis (D.e.A.). Université de Sciences et Techniques du Languedoc (USTL), Montpellier, Francia. 88 p.
- Deuss, J. y Descroix, F. 1982. Le bouturage du caféier *Robusta* dans le programme de replantation de la caféière du Togo. Colloque de l'Association Scientifique International du Café (ASIC), 10ème, Salvador, Bahia, Brasil. p. 483-494.
- Druart, P.; Kevers, C.; Boxus, P. y Gaspart, T. 1982. *In vitro* promotion of root formation by apple shoots through darkness effect on endogenous phenols and peroxydases. Z. Pflanzenphysiol. 108(5):429-436.
- Dublin, P. 1964. Le bouturage des caféiers Excelsa. Café-Cacao-Thé 8(1):3-15.
- . 1967. L'amélioration du caféier *Robusta*; Bilan de dix années de sélection clonale. Café-Cacao-Thé 11(2):101-137.
- . 1972. Polyembryony and haploidy in *Theobroma cacao*. Café-Cacao-Thé 16:295-311.
- . 1974. Haploids of *Theobroma cacao* L.: Diploidization and production of homozygous individuals. Café-Cacao-Thé 18:83-97.
- . 1980a. Induction de bourgeons néoformés et embryogénèse somatique: Deux voies de multiplication végétative *in vitro* des caféiers cultivés. Café-Cacao-Thé 24(2):121-130.
- . 1980b. Multiplication végétative *in vitro* de l'*Arabusta*. Café-Cacao-Thé 24(4):281-290.
- . 1981. Embryogénèse somatique directe sur fragments de feuilles de caféier *Arabusta*. Café-Cacao-Thé 25(4):237-242.
- . 1982. Culture de tissus et amélioration génétique des caféiers cultivés. Colloque de l'Association Scientifique International du Café (ASIC), 10ème, Salvador, Bahia, Brasil. p. 433-459.
- . 1984. Cacao. En: P.V. Amirato et al. (eds). Handbook of plant cell culture. MacMillan Publishing, Londres. v. 3, p. 541-563.
- y Parvais, N. 1975. Premiers cas d'haploïdie découverts chez le *Coffea canephora*. C. R. Acad. Sci. Paris, série D (281):1157-1158.

- Duçeau, P. 1980. Critères de sélection pour l'amélioration des hybrides *Arabusta* en Côte d'Ivoire. Colloque de l'Association Scientifique International du Café (ASIC), 9ème, Londres p. 606-609.
- Dufour, M. y Dublin, P. 1985. Quelques données sur la multiplication végétative *in vitro* des cacaoyers cultivés (*T. cacao*). Café-Cacao-Thé.
- Enjalric, F. 1983. Étude sur le microbouturage *in vitro* de l'*Hevea brasiliensis* Muell. Arg. Tesis (D.e.A.). Université de Paris-Sud, Centre d'Orsay, Francia. 161 p.
- Esan, E. B. 1975. Tissue culture studies on cacao (*Theobroma cacao* L.). En: Fifth International Conference on Cacao Research. Memorias. Ibadan, Nigeria. p. 116-124.
- Francllet, A. 1979. Rajeunissement des arbres adultes en vue de leur propagation végétative. Études et Recherches (AFOCEL) 12:3-18.
- . 1983. Rajeunissement: Culture *in vitro* et pratique sylvicole. Bull. Soc. Bot. no.130. Actual. Bot. 2:87-98.
- Hall, T. R. H. y Collin, H. A. 1974. Initiation and growth of tissue cultures of *Theobroma cacao*. Ann. Bot. (39):555-570.
- Hermann, E. B. y Haas, G. J. 1975. Clonal propagation of *C. arabica* L. from callus culture. HortScience 10:588-589.
- Kartha, K. K.; Mroginski, L. A.; Pahl, K. y Leung, N. L. 1981. Germplasm preservation of coffee (*Coffea arabica* L.) by *in vitro* culture of shoot apical meristems. Plant Science Letters 22:301-307.
- Kononowicz, H.; Kononowicz, A. K. y Janick, J. 1984. Asexual embryogenesis via callus of *Theobroma cacao*. Z. Pflanzenphysiol. 113:347-358.
- Lanaud, C. 1981. Production de plantules de *C. canephora* par embryogénèse somatique réalisée à partir de culture *in vitro* d'ovules. Café-Cacao-Thé 25(4):231-236.
- Lardet, L. 1984. Problèmes et perspectives de la culture d'apex pour la micro-propagation de l'*Hevea brasiliensis* Muell. Arg. Tesis (D.e.A.). Université de Sciences et Techniques du Languedoc (USTL), Montpellier, Francia. 47 p.
- Lavarenne-Allary, S. 1965. Recherches sur la croissance des bourgeons de chêne et de quelques autres espèces ligneuses. Ann. Sci. Forest. 22(1):1-203.
- Leguizamón, J. 1983. Contribution a la connaissance de la résistance incomplete du caféier a *Hemileia vastatrix* Berk et Br. Tesis (D.e.A.). Université de Sciences et Techniques du Languedoc (USTL), Montpellier, Francia.

- Le Pierres, D. y Anthony, F. 1980. Les hybrides interspécifiques hexaploides *C. canephora* x *C. canephora*: Influence du milieu et de la structure. Colloque de l'Association Scientifique International du Café (ASIC), 9ème, Londres. p. 568-570.
- Levandowsky, D. W. 1959. Multiplication de l'*Hevea brasiliensis* par bouture. Rev. Gen. Caout. et Plast. 36(9):1132-1141.
- Libby, W. J. 1979. Clonal selection of forest trees. California agriculture.
- Linsmaier, E. M. y Skoog, F. 1965. Organic growth factor requirements of tobacco tissue culture. Physiol. Plant. 18:100-127.
- Louarn, J. 1982. Bilan des hybridations interspécifiques entre caféiers africains diploides en collection en Côte d'Ivoire. Colloque de l'Association Scientifique International du Café (ASIC), 10ème, Salvador, Bahía, Brasil. p. 375-383.
- MacIndoe, K. G. 1958. The development of clonal rootstocks in *Hevea*. Q. Circ. Ceylan Rubber. Res. Inst. 34:39-57.
- Margara, J. 1978. Mise au point d'une gamme de milieux minéraux pour les conditions de culture *in vitro*. C. R. Acad. Agric. 8:654-661.
- Maxwell, P. y Blake, J. 1984. Plant tissue and its agricultural applications. Nottingham, Inglaterra. p. 79.
- Mónaco, L. et al. 1977. Application of tissue culture in the improvement of coffee. En: Reinert, J. y Bajaj, Y. P. S. (eds.). Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue and organ culture. Springer-Verlag, Nueva York. p. 109-126.
- Murashige, T. 1974. Plant propagation through tissue culture. Ann. Rev. Plant Physiol. 25:135-166.
- y Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth on bioassays with tobacco cultures. Physiol. Plant. 15:473-497.
- Muzik, T. J. y Cruzado, H. J. 1958. Transmission of juvenile rooting ability from seedlings to adults of *Hevea brasiliensis*. Nature 181:1288.
- Nozeran, R. y Du Plessix, J. 1969. Amélioration de productivité, multiplication végétative et morphogénèse de l'*Hevea brasiliensis*: Trois aspects d'un même problème. Rev. Gen. Caout. et Plast. 46:861-867.
- y Bancilhon, L. 1972. Les cultures *in vitro* en tant que techniques pour l'approche de problèmes posés par l'amélioration des plantes. Ann. Amélior. Plantes. 22(2):167-185.
- Orchard, J. E.; Collin, H. y Hardwick, K. 1979. Culture of shoot apices of *Theobroma cacao*, Physiol. Plant. 47:207-210.

- Paranjothy, K. y Ghandimathi, H. 1975. Tissue and organ culture of *Hevea*. Proceedings of the International Rubber Conference, Kuala Lumpur, Malaysia. p. 59-83.
- Passey, A. J. y Jones, O. P. 1983. Shoot proliferation and rooting *in vitro* of *Theobroma cacao* L., type 'melonado'. J. Hortic. Sci. 58(4):589-592.
- Pence, V. C.; Hasegawa, P. M. y Janick, J. 1979. Asexual embryogenesis in *Theobroma cacao* L. J. Am. Soc. Hortic. Sci. 104:145-148.
- Pierson, E. S. et al. 1983. *In vitro* development of embryoids from punched leaf disc of *Coffea canephora*. Protoplasma 115:208-216.
- Pyke, E. E. 1933. The vegetative propagation of cacao; II: Softwood cuttings. En: Second annual report on cacao research, Trinidad, 1932. p. 3-9.
- Saleil, V. 1982. Étude en conditions *in vitro* de quelques facteurs d'induction de tiges néoformées et de leur enracinement chez les caféiers *Arabusta*. Tesis (D.e.A.). Université de Sciences et Techniques du Languedoc (USTL), Montpellier, Francia. 88 p.
- Satchuthananthavale, R. y Irugalbangara, Z. E. 1972. Propagation of callus from *Hevea* anthers. Q. Jl. Rubber. Res. Inst. Ceylan 49:65-68.
- Sondhal, M. R. y Sharp, W. R. 1977. High frequency induction of somatic embryos in cultured leaf explants of *Coffea arabica*. Z. Pflanzenphysiol. 8:395-408.
- Staritsky, G. 1970. Embryoid formation in callus culture tissue of coffee. Acta. Bot. Neerl. (Leiden) 19:509-514.
- Templeton, J. K. y Sheperd, R. 1967. Some technical aspects of green budding. Planter's bulletin (RRIM) 92:190-197.
- Valleys, G. 1952. Le bouturage du caféier *Robusta*. Bulletin d'information de l'Institut National pour l'Étude Agronomique au Congo (INEAC). p. 205-228.
- Wang, Z. et al. 1980. Induction of rubber plantlets from anther of *Hevea brasiliensis* Muell. Arg. *in vitro*. Chinese Journal of Tropical Crops 1(1):25-26.
- White, P. 1939. Potentially unlimited growth of excised plant callus in an artificial nutrient. Am. J. Bot. 26:59-64.
- Wilson, H. M. y Street, H. E. 1974. The growth, anatomy and morphogenetic potential of callus and cell suspension cultures of *Hevea brasiliensis*. Physiol. Plant. 36:399-402.
- Zok, S. 1983. Multiplication végétative *in vitro* du caféier (*Coffea arabica*) par culture de méristemes et de sommets végétatifs. Tesis. Université de Sciences et Techniques du Languedoc (USTL), Montpellier, Francia.