

PROTOCOLO DE SUSPENSIÓN DE CÉLULAS DE CACAO

CAMPO

[0001] La presente divulgación se refiere generalmente a cultivos de células vegetales y, más específicamente, a métodos de establecer cultivos en suspensión de células de *Theobroma*.

ANTECEDENTES

[0002] *Theobroma* es un género de plantas de floración de la familia de malvas Malvaceae. *Theobroma* contiene aproximadamente veinte especies de pequeños árboles de sotobosque, nativos de los bosques tropicales de Centroamérica y Suramérica. *Theobroma cacao* puede usarse para hacer chocolate.

[0003] El cultivo en suspensión de células vegetales es un proceso por el cual células vegetales se desarrollan flotando libremente en un medio de cultivo. El cultivo de suspensión de células de *Theobroma* se presta generalmente a la producción a gran escala de metabolitos secundarios de *Theobroma* tales como teobromina. Intentos previos de establecer cultivos en suspensión de células de *Theobroma* se han basado en gran parte en usar cotiledóneas o desarrollar semillas como materiales de explante. Véase, por ejemplo, Tsai and Kinsella, *Annals of Botany* 48.4 (1981): 549-558; Leathers and Scragg, *Plant science* 62.2 (1989): 217-227; Rojas et al., *Actualidades Biológicas* 30.89 (2008): 117-123; Parra et al., *Plant physiology and biochemistry* 111 (2017): 59-66; Rúa et al., *Bioprocess and biosystems engineering* 40.10 (2017): 1479-1492; Gallego et al., *Scientific reports* 8.1 (2018): 13575. Sin embargo, obtener estas clases de explantes en una escala de producción comercial puede ser intensivo en tiempo e intensivo en trabajo, y puede aumentar en términos generales los costos de la producción comercial de los productos relacionados con *Theobroma*.

[0004] En consecuencia, existe una necesidad de métodos mejorados que provean protocolos eficientes y efectivos para establecer cultivos en suspensión de células de *Theobroma*.

BREVE RESUMEN

[0005] Se proveen aquí métodos para establecer cultivos en suspensión de células de *Theobroma* usando hojas jóvenes como fuente de explantes, apropiados para la producción de metabolitos secundarios de *Theobroma*, así como para el aislamiento de virus asociados con enfermedades de *Theobroma*. Se proveen asimismo aquí medios de cultivo usados en los métodos.

[0006] En un aspecto, se provee aquí un método para preparar un cultivo de suspensión de células de *Theobroma* mediante los pasos de: obtener un explante de una hoja de *Theobroma*; esterilizar el explante; inducir callo friable del explante en un medio de inducción de callo; proliferar el callo inducido en un medio de proliferación de callo; y suspender el callo proliferado en un medio de suspensión. En algunas modalidades, el medio de inducción de callo incluye un medio vegetal base (*base plant medium*); ácido 1-naftalenacético (NAA) y 6-bencilaminopurina (BAP). En ciertas variaciones, el ácido 1-naftalenacético (NAA) está presente en una concentración de 0,5 mg/L a 5 mg/L; y la 6-bencilaminopurina (BAP) está presente en una concentración de 0,5 mg/L a 5 mg/L.

[0007] En algunas modalidades, la esterilización incluye contactar el explante en una solución de hipoclorito bajo vacío. En algunas modalidades, el medio de proliferación de callo incluye un medio vegetal base; y glutamina. En algunas modalidades, el medio de suspensión incluye un medio vegetal base; y L-glicina. En algunas modalidades, la inducción de callo friable se obtiene después de un fotoperíodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad. En algunas modalidades, se provee un cultivo de suspensión de células de *Theobroma* producido por los métodos anteriores.

[0008] En otro aspecto, se provee aquí un método para producir un metabolito secundario de *Theobroma* mediante los pasos de: obtener un explante de una hoja de *Theobroma*; esterilizar el explante; inducir callo friable del explante en un medio de inducción de callo; proliferar el callo friable transformado en un medio de proliferación de callo; suspender el callo proliferado en un medio de suspensión; y recuperar un metabolito secundario del medio de suspensión. En algunas modalidades, el medio de inducción de callo incluye un medio vegetal base; ácido 1-

naftalenacético (NAA) y 6-bencilaminopurina (BAP). En ciertas variaciones, el ácido 1-naftalenacético (NAA) está presente en una concentración de 0,5 mg/L a 5 mg/L, y la 6-bencilaminopurina (BAP) está presente en una concentración de 0,5 mg/L a 5 mg/L.

[0009] En algunas variaciones, el método para producir un metabolito secundario de *Theobroma* comprende además transformar el callo inducido con un transgén expresable que codifica un producto en la ruta biosintética del metabolito secundario. En algunas modalidades, la transformación se logra por bombardeo de partículas o por mediación con *Agrobacterium*. En algunas modalidades, el metabolito secundario es un fenol, un flavonoide o metilxantina, o un ácido graso. En algunas modalidades, el *Theobroma* es *Theobroma cacao*, *Theobroma grandiflorum*, o *Theobroma bicolor*. En algunas modalidades, la esterilización incluye contactar el explante en una solución de hipoclorito bajo vacío. En algunas modalidades, el medio de proliferación de callo incluye un medio vegetal base; y glutamina. En algunas modalidades, el medio de suspensión incluye un medio vegetal base; y L-glicina. En algunas modalidades, la inducción de callo friable se obtiene después de un fotoperíodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad.

[0010] En algunas modalidades que pueden combinarse con cualquiera de las modalidades y variaciones precedentes, el método incluye además cocultivar la suspensión de células con uno o más virus. En algunas modalidades, el uno o más virus incluye(n) el virus del brote hinchado de cacao (CSSV - *cacao swollen shoot virus*). En algunas modalidades, se provee un metabolito secundario de *Theobroma* producido por los métodos anteriores.

[0011] En todavía otro aspecto, se provee aquí un medio de inducción de callo para inducir callo friable de explantes de hoja de *Theobroma*, que incluye: un medio vegetal base; ácido 1-naftalenacético (NAA) y 6-bencilaminopurina (BAP). En ciertas variaciones, el ácido 1-naftalenacético (NAA) está presente en una concentración de 0,5 mg/L a 5 mg/L, y la 6-bencilaminopurina (BAP) está presente en una concentración de 0,5 mg/L a 5 mg/L. En otras variaciones, el medio de inducción de callo incluye además una mezcla de vitaminas.

[0012] En todavía otro aspecto, se provee aquí un medio de proliferación de callo para proliferar callo friable inducido de explantes de hoja de *Theobroma*, que incluye: un medio vegetal base, y thidiazuron (TDZ) en una concentración de 1 mg/L a 5 mg/L. En algunas variaciones, el medio de inducción de callo incluye además una mezcla de vitaminas.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

[0013] FIG. 1 muestra una fotografía de hojas representativas para obtener explantes.

[0014] FIG. 2 muestra los efectos de la desinfección en hojas tipo-1, tipo-2, y tipo-3 (para la caracterización del tipo de hoja, véase Greathouse et al., *American journal of botany* 58.4 (1971): 281-286).

[0015] FIG. 3 muestra los efectos desinfectantes del hipoclorito de calcio y el alcohol en la eliminación de hongos en explantes de hojas.

[0016] FIG. 4 muestra los efectos desinfectantes del hipoclorito de calcio y el alcohol en la eliminación de bacterias en explantes de hojas.

[0017] FIG. 5 muestra los efectos del balance hormonal de BAP/AIA y condiciones de fotoperíodo sobre la formación del callo.

[0018] FIG. 6 muestra los efectos del balance hormonal de BAP/AIA sobre la formación del callo.

[0019] FIG. 7 muestra los efectos del balance hormonal de BAP/NAA sobre la formación del callo.

[0020] Con referencia a FIGS. 5-7, BAP es 6-bencilaminopurina; y NAA es ácido 1-naftalenacético.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

[0021] La siguiente descripción define composiciones, sistemas, métodos, parámetros ejemplares y similares. Debe reconocerse, no obstante, que tal descripción no se pretende como una limitación del ámbito de la presente divulgación, sino que, en cambio, se provee como una descripción de modalidades ejemplares.

Métodos para establecer cultivos en suspensión de células de *Theobroma*

[0022] En un aspecto, se provee aquí un método para preparar un cultivo de suspensión de células de *Theobroma* mediante los pasos de: obtener un explante de una hoja de *Theobroma*; esterilizar el explante; inducir un callo friable del explante en un medio de inducción de callo; proliferar el callo inducido en un medio de proliferación de callo; y suspender el callo proliferado en un medio de suspensión.

[0023] *Theobroma* es un género de plantas de floración en la familia de malvas Malvaceae. Ejemplos apropiados de la especie *Theobroma* para uso en los métodos descritos aquí incluyen, por ejemplo, *Theobroma cacao*, *Theobroma grandiflorum*, *Theobroma bicolor*, *Theobroma angustifolium*, *Theobroma canumanense*, *Theobroma mammosum*, *Theobroma microcarpum*, *Theobroma obovatum*, *Theobroma simiarum*, *Theobroma speciosum*, *Theobroma stipulatum*, *Theobroma subincanum*, o *Theobroma sylvestre*. En una variación, el *Theobroma* es *Theobroma cacao*. En otra variación, el *Theobroma* es *Theobroma grandiflorum*. En todavía otra variación, el *Theobroma* es *Theobroma bicolor*.

Explantos de hojas y su esterilización

[0024] El explante es un pedazo de tejido tomado de una planta donadora para cultivo. Intentos previos de establecer cultivos en suspensión de células de *Theobroma* se han basado en gran medida en usar cotiledóneas o desarrollar semillas de materiales de explante. Obtener estos tipos de explantes es intensivo en tiempo e intensivo en trabajo porque se requiere la polinización manual para producir semillas. Sin embargo, una vez obtenidas, las cotiledóneas o las semillas desarrolladas son relativamente fáciles de esterilizar para cultivo de tejido porque crecen dentro de un fruto protegido del ambiente externo. Por el contrario, puesto que las hojas

se encuentran expuestas al ambiente externo, normalmente son más difíciles de esterilizar, la cual es una de las razones para limitar su uso como fuente de explantes para cultivo de tejido.

[0025] En ciertas modalidades, se provee un método de esterilizar hojas de *Theobroma* para hacerlas apropiadas para uso como explantes en cultivo de tejido. En algunas modalidades, las hojas se limpian con jabón, se enjuagan con agua esterilizada destilada, y se cortan en pedazos. En algunas modalidades, los pedazos de hojas cortados se desinfectan por inmersión en etanol, se enjuagan con agua esterilizada, y se sumergen en una solución de hipoclorito bajo vacío. En algunas modalidades, luego de la desinfección, las hojas pueden usarse en una variedad de protocolos.

[0026] En algunas modalidades, el etanol se provee en una solución de etanol al 70%-95%.

[0027] En otras modalidades, la solución de hipoclorito comprende hipoclorito de calcio. En algunas modalidades, la solución de hipoclorito de calcio está en una concentración de entre 0,5% y 10%, o entre 0,5% y 5%; o alrededor de 1%, alrededor de 2%, alrededor de 3%, alrededor de 4%, alrededor de 5%, alrededor de 6%, alrededor de 7%, alrededor de 8%, alrededor de 9%, o alrededor de 10%.

[0028] En todavía otras modalidades, la solución de hipoclorito comprende hipoclorito de sodio. En algunas modalidades, la solución de hipoclorito de sodio está en una concentración de entre 5% y 30%; o alrededor de 5%, alrededor de 10%, alrededor de 15%, alrededor de 20%, alrededor de 25%, o alrededor de 30%.

[0029] En todavía otras modalidades, los pedazos de hojas cortados se sumergen en una solución de hipoclorito bajo vacío a entre 10 kPa y 100 kPa; o alrededor de 10 kilopascales, alrededor de 20 kPa, alrededor de 30 kPa, alrededor de 40 kPa, alrededor de 50 kPa, alrededor de 60 kPa, alrededor de 70 kPa, alrededor de 80 kPa, alrededor de 90 kPa, o alrededor de 100 kPa. En algunas modalidades, el protocolo de vacío y esterilización puede adaptarse para preparar otras muestras de cacao para protocolos tales como formación de raíces.

Inducción de callo friable

[0030] Un callo es una masa en crecimiento de células desorganizadas del parénquima de la planta. El callo se forma por la proliferación del tejido parental. Hablando en términos morfológicos, los cultivos de callo se clasifican típicamente como friables o compactos. El callo friable está constituido anatómicamente por células grandes organizadas holgadamente con espacios intercelulares. El callo friable es frágil, se desintegra fácilmente, y es apropiado para cultivo en suspensión, en la que el tejido puede dispersarse mediante agitación mecánica. Por el contrario, el callo compacto es duro y está constituido anatómicamente por células organizadas en forma compacta sin espacios intercelulares. El callo compacto no se desmorona fácilmente. *Véase generalmente* Kumar, et al. "Callus Induction." *Plant Biotechnology, Volume 1*. Apple Academic Press, 2017. 143-159.

[0031] En algunas modalidades de los métodos provistos, el callo friable de los explantes de hojas se induce en un medio de inducción de callo. En algunas modalidades, el medio de inducción de callo incluye: un medio vegetal base; ácido 1-naftalenacético (NAA), y 6-bencilaminopurina (BAP). En ciertas modalidades, el medio vegetal base incluye calcio. En otra modalidad, el medio vegetal base incluye nitratos. En una variación, el medio vegetal base incluye sales basales del medio Woody Plant Medium (WPM), sales basales de Murashige and Skoog (MS), o una mezcla de sales basales de Driver and Kuniyuki Walnut (DKW), o cualquier combinación de los anteriores. *Véase* Lloyd and McCown, *HortScience* 16 (1981): 453; Murashige and Skoog, *Physiologia plantarum* 15.3 (1962): 473-497; product manual of Woody Plant Medium (product code: PT026) from HiMedia Laboratories; product manual of Murashige and Skoog Plant Salt Mixture (product code: TS1004) from HiMedia Laboratories.

[0032] En algunas variaciones de las anteriores, el medio de inducción de callo incluye, además: una o más vitaminas, uno o más azúcares, L-glutamina, o mioinositol, o cualquier combinación de los anteriores. En ciertas variaciones, la una o más vitaminas es una mezcla de vitaminas. En otra variación, la mezcla de vitaminas incluye vitaminas Gamborg B-5 (B5), o vitaminas Driver and Kuniyuki Walnut (DKW), o cualquier combinación de las anteriores. *Véase*

Gamborg et al., *Experimental cell research* 50.1 (1968): 151-158; product manual of Woody Plant Medium (product code: PT026) from HiMedia Laboratories. En otra variación, el uno o más azúcares es sacarosa.

[0033] En una variación, el medio de inducción de callo incluye: sales basales de medio Woody Plant Medium (WPM); vitaminas Gamborg B-5 (B5); sacarosa; L-glutamina; mioinositol; ácido 1- naftalenacético (NAA); y 6-bencilaminopurina (BAP).

[0034] En algunas variaciones, el NAA está en una concentración de entre 0,1 mg/L y 5 mg/L; o alrededor de 0,1 mg/L, alrededor de 0,2 mg/L, alrededor de 0,3 mg/L, alrededor de 0,4 mg/L, alrededor de 0,5 mg/L, alrededor de 0,6 mg/L, alrededor de 0,7 mg/L, alrededor de 0,8 mg/L, alrededor de 0,9 mg/L, alrededor de 1,0 mg/L, alrededor de 1,1 mg/L, alrededor de 1,2 mg/L, alrededor de 1,3 mg/L, alrededor de 1,4 mg/L, alrededor de 1,5 mg/L, alrededor de 1,6 mg/L, alrededor de 1,7 mg/L, alrededor de 1,8 mg/L, alrededor de 1,9 mg/L, alrededor de 2,0 mg/L, alrededor de 3,0 mg/L, alrededor de 4,0 mg/L, o alrededor de 5,0 mg/L.

[0035] En algunas variaciones, la BAP está en una concentración de entre 0,1 mg/L y 5 mg/L; o alrededor de 0,1 mg/L, alrededor de 0,2 mg/L, alrededor de 0,3 mg/L, alrededor de 0,4 mg/L, alrededor de 0,5 mg/L, alrededor de 0,6 mg/L, alrededor de 0,7 mg/L, alrededor de 0,8 mg/L, alrededor de 0,9 mg/L, alrededor de 1,0 mg/L, alrededor de 1,1 mg/L, alrededor de 1,2 mg/L, alrededor de 1,3 mg/L, alrededor de 1,4 mg/L, alrededor de 1,5 mg/L, alrededor de 1,6 mg/L, alrededor de 1,7 mg/L, alrededor de 1,8 mg/L, alrededor de 1,9 mg/L, alrededor de 2,0 mg/L, alrededor de 3,0 mg/L, alrededor de 4,0 mg/L, o alrededor de 5,0 mg/L.

[0036] En algunas variaciones, la L-glutamina está en una concentración de entre 50 mg/L y 300 mg/L, o entre 200 mg/L y 275 mg/L, o entre 230 mg/L y 270 mg/L, o entre 245 mg/L y 255 mg/L; o alrededor de 50 mg/L, alrededor de 75 mg/L, alrededor de 100 mg/L, alrededor de 125 mg/L, alrededor de 150 mg/L, alrededor de 175 mg/L, alrededor de 200 mg/L, alrededor de 225 mg/L, alrededor de 250 mg/L, alrededor de 275 mg/L, o alrededor de 300 mg/L.

[0037] En algunas variaciones, el mioinositol está en una concentración de entre 10 mg/L y 200 mg/L, o entre 75 mg/L y 125 mg/L, o entre 90 mg/L y 110 mg/L, o entre 95 mg/L y 105 mg/L; o alrededor de 10 mg/L, alrededor de 20 mg/L, alrededor de 30 mg/L, alrededor de 40 mg/L, alrededor de 50 mg/L, alrededor de 60 mg/L, alrededor de 70 mg/L, alrededor de 80 mg/L, alrededor de 90 mg/L, alrededor de 100 mg/L, alrededor de 110 mg/L, alrededor de 120 mg/L, alrededor de 130 mg/L, alrededor de 140 mg/L, alrededor de 150 mg/L, alrededor de 160 mg/L, alrededor de 170 mg/L, alrededor de 180 mg/L, alrededor de 190 mg/L, o alrededor de 200 mg/L.

[0038] En algunas variaciones, el azúcar (tal como, sacarosa) está en una concentración de entre 5 g/L y 100 g/L; o entre 20 g/L y 80 g/L; o alrededor de 5 g/L, alrededor de 10 g/L, alrededor de 15 g/L, alrededor de 20 g/L, alrededor de 25 g/L, alrededor de 30 g/L, alrededor de 35 g/L, alrededor de 40 g/L, alrededor de 45 g/L, alrededor de 50 g/L, alrededor de 55 g/L, alrededor de 60 g/L, alrededor de 65 g/L, alrededor de 70 g/L, alrededor de 75 g/L, alrededor de 80 g/L, alrededor de 85 g/L, alrededor de 90 g/L, alrededor de 95 g/L, o alrededor de 100 g/L.

[0039] Debe entenderse que cualquier descripción de los distintos componentes en el medio de inducción de callo descritos aquí pueden combinarse unos con otros, lo mismo que si todas y cada una de las combinaciones se enumeraran individualmente. Por ejemplo, un medio de inducción de callo que incluya ácido 1-naftalenacético (NAA) y 6-bencilaminopurina (BAP) puede tener, en algunas variaciones, una concentración de NAA de alrededor de 1,0 mg/L y una concentración de BAP de 0,5 mg/L. En otra variación, la concentración de NAA es alrededor de 1,0 mg/L y la concentración de BAP es alrededor de 1 mg/L. En todavía otra variación, la concentración de NAA es alrededor de 1,0 mg/L y la concentración de BAP es alrededor de 3,0 mg/L.

[0040] En otras variaciones, el medio de inducción de callo incluye NAA, BAP y sacarosa. En una variación de las anteriores, el NAA está en una concentración de alrededor de 1,0 mg/L, la BAP está en una concentración entre 0,5 mg/L y 3 mg/L, y la sacarosa está en alrededor de 30 g/L.

[0041] En todavía otras variaciones, el medio de inducción de callo incluye NAA, BAP, sacarosa y L-glutamina. En una variación de las anteriores, el NAA está en una concentración de alrededor de 1,0 mg/L, la BAP está en una concentración entre 0,5 mg/L y 3 mg/L, la sacarosa está en alrededor de 30 g/L, y la L-glutamina está en alrededor de 250 mg/L.

[0042] En todavía otras variaciones, el medio de inducción de callo incluye NAA, BAP, sacarosa, L-glutamina, y mioinositol. En una variación de las anteriores, el NAA está en una concentración de alrededor de 1,0 mg/L, la BAP está en una concentración entre 0,5 mg/L y 3 mg/L, la sacarosa está en alrededor de 30 g/L, la L-glutamina está en una concentración de alrededor de 250 mg/L, y el mioinositol está en una concentración de alrededor de 100 mg/L.

[0043] En algunas modalidades de los métodos provistos aquí, la inducción de callo friable se obtiene después de un fotoperíodo. El fotoperíodo se expresa aquí como una razón de horas de luz a horas de oscuridad; y las horas totales de luz y oscuridad equivalen a 24 horas.

[0044] En una variación, el fotoperíodo va de 12:12 a 24:0, de 13:11 a 20:4, o de 14:10 a 18:6; o alrededor de 16:8.

[0045] La exposición a la luz puede garantizarse poniendo los sustratos en cámaras apropiadamente iluminadas, tal como se entiende en la técnica. En algunas modalidades, puede usarse una radiación fotosintéticamente activa (PAR - *photosynthetic active radiation*) o una densidad de flujo de fotones fotosintéticos (PPFD - *photosynthetic photon flux density*) de 30-240 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{segundo}$, 50-200 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{segundo}$, 50-190 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{segundo}$, 50-180 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{segundo}$, 50-170 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{segundo}$, 50-160 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{segundo}$, 50-150 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{segundo}$, 50-100 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{segundo}$, 50-90 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{segundo}$, 50-80 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{segundo}$, 50-70 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{segundo}$, o 50-60 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{segundo}$.

[0046] Debe entenderse que cualquier descripción de los fotoperíodos, PAR y PPFD descritos aquí pueden combinarse unos con otros, lo mismo que si todas y cada una de las combinaciones se enumeraran individualmente. Por ejemplo, en una variación, un fotoperíodo de 16:8 horas de luz : oscuridad y una radiación fotosintéticamente activa (PAR) o una densidad de

flujo de fotones fotosintéticos (PPFD) de 50- 200 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{segundo}$ se emplean en los métodos incluidos aquí.

Proliferación de callo

[0047] En algunas modalidades, el callo inducido se prolifera en un medio de proliferación de callo. En algunas modalidades, el medio de proliferación de callo incluye: un medio vegetal base; y tidiazuron (TDZ). En ciertas modalidades, el medio vegetal base incluye calcio. En otra modalidad, el medio vegetal base incluye además nitratos. En una variación, el medio vegetal base incluye sales basales de medio Woody Plant Medium (WPM), sales basales Murashige and Skoog (MS), o una mezcla de sales basales DKW, o cualquier combinación de los anteriores. Véase Lloyd and McCown, *HortScience* 16 (1981): 453; Murashige and Skoog, *Physiologia plantarum* 15.3 (1962): 473- 497; product manual of Woody Plant Medium (product code: PT026) from HiMedia Laboratories; product manual of Murashige and Skoog Plant Salt Mixture (product code: TS1004) from HiMedia Laboratories.

[0048] En algunas variaciones de las anteriores, el medio de proliferación de callo incluye, además: una o más vitaminas, uno o más azúcares, L-glutamina, o mioinositol, o cualquier combinación de los anteriores. En ciertas variaciones, la una o más vitaminas es una mezcla de vitaminas. En otra variación, la mezcla de vitaminas incluye vitaminas Gamborg B-5 (B5), o vitaminas Driver and Kuniyuki Walnut (DKW), o cualquier combinación de las anteriores. Véase Gamborg et al., *Experimental cell research* 50.1 (1968): 151-158; product manual of Woody Plant Medium (product code: PT026) from HiMedia Laboratories. En otra variación, el uno o más azúcares incluyen sacarosa.

[0049] En una variación, el medio de inducción de callo incluye: sales basales de medio Woody Plant Medium (WPM); vitaminas Gamborg B-5 (B5); sacarosa; L-glutamina; mioinositol; y tidiazuron (TDZ).

[0050] En algunas variaciones, el TDZ está en una concentración de entre 0,1 mg/L y 5 mg/L; o alrededor de 0,1 mg/L, alrededor de 0,2 mg/L, alrededor de 0,3 mg/L, alrededor de 0,4

mg/L, alrededor de 0,5 mg/L, alrededor de 0,6 mg/L, alrededor de 0,7 mg/L, alrededor de 0,8 mg/L, alrededor de 0,9 mg/L, alrededor de 1,0 mg/L, alrededor de 1,1 mg/L, alrededor de 1,2 mg/L, alrededor de 1,3 mg/L, alrededor de 1,4 mg/L, alrededor de 1,5 mg/L, alrededor de 1,6 mg/L, alrededor de 1,7 mg/L, alrededor de 1,8 mg/L, alrededor de 1,9 mg/L, alrededor de 2,0 mg/L, alrededor de 2,1 mg/L, alrededor de 2,2 mg/L, alrededor de 2,3 mg/L, alrededor de 2,4 mg/L, alrededor de 2,5 mg/L, alrededor de 2,6 mg/L, alrededor de 2,7 mg/L, alrededor de 2,8 mg/L, alrededor de 2,9 mg/L, alrededor de 3,0 mg/L, alrededor de 4,0 mg/L, o alrededor de 5,0 mg/L.

[0051] En algunas variaciones, la L-glutamina está en una concentración de entre 50 mg/L y 300 mg/L, o entre 200 mg/L y 275 mg/L, o entre 230 mg/L y 270 mg/L, o entre 245 mg/L y 255 mg/L; o alrededor de 50 mg/L, alrededor de 75 mg/L, alrededor de 100 mg/L, alrededor de 125 mg/L, alrededor de 150 mg/L, alrededor de 175 mg/L, alrededor de 200 mg/L, alrededor de 225 mg/L, alrededor de 250 mg/L, alrededor de 275 mg/L, alrededor de 300 mg/L.

[0052] En algunas variaciones, el mioinositol está en una concentración de entre 10 mg/L y 200 mg/L, o entre 75 mg/L y 125 mg/L, o entre 90 mg/L y 110 mg/L, o entre 95 mg/L y 105 mg/L; o alrededor de 10 mg/L, alrededor de 20 mg/L, alrededor de 30 mg/L, alrededor de 40 mg/L, alrededor de 50 mg/L, alrededor de 60 mg/L, alrededor de 70 mg/L, alrededor de 80 mg/L, alrededor de 90 mg/L, alrededor de 100 mg/L, alrededor de 110 mg/L, alrededor de 120 mg/L, alrededor de 130 mg/L, alrededor de 140 mg/L, alrededor de 150 mg/L, alrededor de 160 mg/L, alrededor de 170 mg/L, alrededor de 180 mg/L, alrededor de 190 mg/L, o alrededor de 200 mg/L.

[0053] En algunas variaciones, el azúcar (tal como, sacarosa) está en una concentración de entre 5 g/L y 100 g/L; o entre 20 g/L y 80 g/L; o alrededor de 5 g/L, alrededor de 10 g/L, alrededor de 15 g/L, alrededor de 20 g/L, alrededor de 25 g/L, alrededor de 30 g/L, alrededor de 35 g/L, alrededor de 40 g/L, alrededor de 45 g/L, alrededor de 50 g/L, alrededor de 55 g/L, alrededor de 60 g/L, alrededor de 65 g/L, alrededor de 70 g/L, alrededor de 75 g/L, alrededor de 80 g/L, alrededor de 85 g/L, alrededor de 90 g/L, alrededor de 95 g/L, o alrededor de 100 g/L.

[0054] Cualquier descripción de los distintos componentes en el medio de proliferación de callo descritos aquí pueden combinarse unos con otros, lo mismo que si todas y cada una de las combinaciones se enumeraran individualmente. Por ejemplo, un medio de proliferación de callo que incluya TDZ y L-glutamina puede tener, en algunas variaciones, una concentración de TDZ entre 2 mg/L y 3 mg/L, y la concentración de L-glutamina entre 200 mg/L y 300 mg/L.

[0055] En otras variaciones, el medio de proliferación de callo incluye TDZ, L-glutamina, y sacarosa. En una variación de las anteriores, el TDZ está en una concentración entre 2 mg/L y 3 mg/L, la L-glutamina está en una concentración entre 200 mg/L y 300 mg/L, y la sacarosa está en una concentración entre 20 g/L y 40 g/L.

[0056] En otras variaciones, el medio de proliferación de callo incluye TDZ, L-glutamina, sacarosa, y mioinositol. En una variación de las anteriores, el TDZ está en una concentración entre 2 mg/L y 3 mg/L, la L-glutamina está en una concentración entre 200 mg/L y 300 mg/L, la sacarosa está en una concentración entre 20 g/L y 40 g/L, y el mioinositol está en una concentración entre 50 mg/L y 150 mg/L.

Suspensión de callo

[0057] Las tecnologías de fermentación conocidas en el estado de la técnica, desarrolladas para cultivos microbianos sumergidos, pueden aplicarse en los sistemas de cultivos en suspensión de plantas descritos aquí.

[0058] En algunas modalidades, el callo proliferado de la presente invención se suspende en un medio de suspensión.

[0059] En algunas modalidades, el medio de suspensión incluye: un medio vegetal base; ácido 2,4- diclorofenoxiacético (2,4-D); y kinetina (KIN). En ciertas modalidades, el medio vegetal base incluye calcio. En otra modalidad, el medio vegetal base incluye además nitratos. En una variación, el medio vegetal base incluye sales basales de medio Woody Plant Medium (WPM), sales basales Murashige and Skoog (MS), o una mezcla de sales basales DKW, o cualquier combinación de las anteriores. Véase Lloyd and McCown, *HortScience* 16 (1981): 453;

Murashige and Skoog, *Physiologia plantarum* 15,3 (1962): 473-497; product manual of Woody Plant Medium (product code: PT026) from HiMedia Laboratories; product manual of Murashige and Skoog Plant Salt Mixture (product code: TS1004) from HiMedia Laboratories.

[0060] En algunas variaciones de las anteriores, el medio de suspensión incluye, además: una o más vitaminas, uno o más azúcares, L-glicina, o penicilina, o cualquier combinación de los anteriores. En ciertas variaciones, la una o más vitaminas es una mezcla de vitaminas. En otra variación, la mezcla de vitaminas incluye vitaminas Gamborg B-5 (B5), o vitaminas Driver and Kuniyuki Walnut (DKW), o cualquier combinación de los anteriores. Véase Gamborg et al., *Experimental cell research* 50.1 (1968): 151-158; product manual of Woody Plant Medium (product code: PT026) from HiMedia Laboratories. En otra variación, los uno o más azúcares incluyen sacarosa.

[0061] En una variación, el medio de suspensión incluye: sales basales Murashige and Skoog (MS); vitaminas Driver and Kuniyuki Walnut (DKW); sacarosa; penicilina; ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D); y kinetina (KIN).

[0062] En algunas variaciones, el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) está en una concentración de entre 0,1 mg/L y 5 mg/L; o alrededor de 0,1 mg/L, alrededor de 0,2 mg/L, alrededor de 0,3 mg/L, alrededor de 0,4 mg/L, alrededor de 0,5 mg/L, alrededor de 0,6 mg/L, alrededor de 0,7 mg/L, alrededor de 0,8 mg/L, alrededor de 0,9 mg/L, alrededor de 1,0 mg/L, alrededor de 2,0 mg/L, alrededor de 3,0 mg/L, alrededor de 4,0 mg/L, o alrededor de 5,0 mg/L.

[0063] En algunas variaciones, la kinetina (KIN) está en una concentración de entre 0,01 mg/L y 0,5 mg/L; o alrededor de 0,01 mg/L, alrededor de 0,02 mg/L, alrededor de 0,03 mg/L, alrededor de 0,04 mg/L, alrededor de 0,05 mg/L, alrededor de 0,06 mg/L, alrededor de 0,07 mg/L, alrededor de 0,08 mg/L, alrededor de 0,09 mg/L, alrededor de 0,1 mg/L, alrededor de 0,11 mg/L, alrededor de 0,12 mg/L, alrededor de 0,13 mg/L, alrededor de 0,14 mg/L, alrededor de 0,15 mg/L, alrededor de 0,16 mg/L, alrededor de 0,17 mg/L, alrededor de 0,18 mg/L, alrededor

de 0,19 mg/L, alrededor de 0,2 mg/L, alrededor de 0,3 mg/L, alrededor de 0,4 mg/L, o alrededor de 0,5 mg/L.

[0064] En algunas variaciones, la L-glicina está en una concentración de entre 0,5 mg/L y 5 mg/L; o alrededor de 0,5 mg/L, alrededor de 1 mg/L, alrededor de 1,5 mg/L, alrededor de 2 mg/L, alrededor de 2,5 mg/L, alrededor de 3 mg/L, alrededor de 3,5 mg/L, alrededor de 4 mg/L, o alrededor de 5 mg/L.

[0065] En algunas variaciones, la penicilina está en una concentración de entre 10 mg/L y 300 mg/L; o alrededor de 10 mg/L, alrededor de 20 mg/L, alrededor de 30 mg/L, alrededor de 40 mg/L, alrededor de 50 mg/L, alrededor de 60 mg/L, alrededor de 70 mg/L, alrededor de 80 mg/L, alrededor de 90 mg/L, alrededor de 100 mg/L, alrededor de 110 mg/L, alrededor de 120 mg/L, alrededor de 130 mg/L, alrededor de 140 mg/L, alrededor de 150 mg/L, alrededor de 160 mg/L, alrededor de 170 mg/L, alrededor de 180 mg/L, alrededor de 190 mg/L, alrededor de 200 mg/L, o alrededor de 300 mg/L.

[0066] En algunas variaciones, el azúcar (tal como, sacarosa) está en una concentración de entre 5 g/L y 100 g/L; o entre 20 g/L y 80 g/L; o alrededor de 5 g/L, alrededor de 10 g/L, alrededor de 15 g/L, alrededor de 20 g/L, alrededor de 25 g/L, alrededor de 30 g/L, alrededor de 35 g/L, alrededor de 40 g/L, alrededor de 45 g/L, alrededor de 50 g/L, alrededor de 55 g/L, alrededor de 60 g/L, alrededor de 65 g/L, alrededor de 70 g/L, alrededor de 75 g/L, alrededor de 80 g/L, alrededor de 85 g/L, alrededor de 90 g/L, alrededor de 95 g/L, o alrededor de 100 g/L.

[0067] Cualquier descripción de los distintos componentes en el medio de suspensión descritos aquí pueden combinarse unos con otros, lo mismo que si todas y cada una de las combinaciones se enumeraran individualmente. Por ejemplo, el medio de suspensión que incluye ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y kinetina (KIN) puede tener, en algunas variaciones, una concentración de 2,4-D entre 0,1 mg/L y 1 mg/L, y una concentración de KIN entre 0,05 mg/L y 0,5 mg/L.

[0068] En algunas otras variaciones, el medio de suspensión incluye 2,4-D, KIN y sacarosa. En una variación de las anteriores, el 2,4-D está en una concentración entre 0,1 mg/L y 1 mg/L, KIN está en una concentración entre 0,05 mg/L y 0,5 mg/L, y la sacarosa está en una concentración entre 20g/L y 40 g/L.

[0069] En otras variaciones, el medio de suspensión incluye 2,4-D, KIN, sacarosa, y L-glicina. En una variación de las anteriores, el 2,4-D está en una concentración entre 0,1 mg/L y 1 mg/L, KIN está en una concentración entre 0,05 mg/L y 0,5 mg/L, la sacarosa está en una concentración entre 20g/L y 40 g/L, y la L-glicina está en una concentración entre 0,1 mg/L y 10 mg/L.

[0070] En otras variaciones, el medio de suspensión incluye 2,4-D, KIN, sacarosa, L-glicina, y penicilina. En una variación de las anteriores, el 2,4-D está en una concentración entre 0,1 mg/L y 1 mg/L, KIN está en una concentración entre 0,05 mg/L y 0,5 mg/L, la sacarosa está en una concentración entre 20g/L y 40 g/L, la L-glicina está en una concentración entre 0,1 mg/L y 10 mg/L, y la penicilina está en una concentración entre 10 mg/L y 300 mg/L.

[0071] La referencia a “alrededor de” de un valor o parámetro mencionado aquí incluye (y describe) modalidades que se dirigen a ese valor o parámetro *per se*. Por ejemplo, la descripción que se refiere a “alrededor de x” incluye la descripción de “x” *per se*. En otras instancias, el término “alrededor de”, cuando se emplea en asociación con otras mediciones, o se emplea para modificar un valor, una unidad, una constante, o un intervalo de valores, se refiere a variaciones de +/- 10%.

[0072] Debe entenderse igualmente que la referencia a “entre” dos valores o parámetros mencionados aquí incluye (y describe) modalidades que comprenden estos dos valores o parámetros *per se*. Por ejemplo, la descripción que se refiere a “entre x y” incluye la descripción de “x” y “y” *per se*.

Producción de metabolitos secundarios

[0073] Los métodos descritos aquí pueden ser útiles para producir metabolitos secundarios en *Theobroma*. Por consiguiente, en otro aspecto, se provee aquí un método para producir un metabolito secundario de *Theobroma* mediante los pasos de: obtener un explante de una hoja de *Theobroma*; esterilizar el explante; inducir callo friable del explante en un medio de inducción de callo; proliferar el callo friable transformado en un medio de proliferación de callo; suspender el callo proliferado en un medio de suspensión; y recuperar un metabolito secundario del medio de suspensión. En algunas variaciones del aspecto anterior, cualquiera de las variaciones del medio de inducción de callo, el medio de proliferación de callo, y el medio de suspensión descritos aquí pueden usarse en el método.

[0074] El metabolismo secundario se refiere a las rutas biológicas que no se requieren absolutamente para la supervivencia del organismo. Una ruta metabólica en el metabolismo secundario se designa como una “ruta metabólica secundaria”. Compuestos tales como sustratos, intermedios y productos de rutas metabólicas secundarias se designan, por lo tanto, como “metabolitos secundarios”. Ejemplos de metabolitos secundarios de plantas incluyen fenoles, flavonoides, taninos, alcaloides, esteroides, terpenos, etc. Ejemplos de metabolitos secundarios hallados en *Theobroma* incluyen metilxantinas tales como teobromina y cafeína. En algunas modalidades, el metabolito secundario es un fenol, un flavonoide o metilxantina, o un ácido graso.

[0075] Tecnologías de fermentación apropiadas conocidas en la técnica, desarrolladas para cultivos microbianos sumergidos, pueden aplicarse en los sistemas de cultivos en suspensión de plantas descritos aquí para producir metabolitos secundarios de plantas.

[0076] Los metabolitos secundarios de *Theobroma* pueden procesarse en, o contribuir al gusto y/o el sabor de, un producto de *Theobroma*. Los productos de *Theobroma* incluyen, por ejemplo, licor de cacao, chocolate, chocolate compuesto, sustancia tipo chocolate, polvo de cacao, y manteca de cacao.

[0077] En algunas variaciones, el método para producir un metabolito secundario de *Theobroma* comprende, además, transformar el callo inducido con un transgén expresable que codifica un producto en la ruta biosintética del metabolito secundario. En algunas modalidades, el transgén codifica una enzima que sintetiza el metabolito secundario. En algunas modalidades, el transgén codifica una enzima que sintetiza un precursor al metabolito secundario. En algunas modalidades, el transgén codifica un producto génico que inhibe la degradación del metabolito secundario. Técnicas de transformación apropiadas incluyen, por ejemplo, transfección con factores víricos; transformación con vectores plasmídicos; electroporación; microinyección; transferencia mediada por *Agrobacterium*; absorción directa de ADN; transformación mediada por fibras de carburo de silicio (*Whiskers*); y bombardeo con microproyectiles. Métodos de transformar células vegetales, plantas y sus porciones se describen en Draper et al., 1988, Plant Genetic Transformation and Gene Expression. A Laboratory Manual, Blackwell Sci. Pub. Oxford, p. 365; Potrykus and Spangenburg, 1995, Gene Transfer to Plants. Springer-Verlag, Berlin; and Gelvin et al., 1993, Plant Molecular Biol. Manual. Kluwer Acad. Pub. Dordrecht. Una revisión de plantas transgénicas, incluyendo técnicas de transformación, se provee en Galun and Breiman, 1997, Transgenic Plants. Imperial College Press, London. En algunas modalidades, la transformación se consigue por bombardeo de partículas o por mediación por *Agrobacterium*.

Producción de partículas de virus

[0078] En ciertas modalidades, los métodos descritos aquí pueden ser útiles para aislar y analizar partículas de virus relacionados con enfermedades infecciosas en *Theobroma*. En algunas modalidades, los métodos descritos aquí incluyen cocultivar la suspensión de células con uno o más virus. En algunas modalidades, el uno o más virus comprenden el virus del brote hinchado de cacao (CSSV), el cual es el patógeno responsable de la enfermedad del brote hinchado de cacao.

[0079] CSSV es un virus patógeno de plantas de la familia *Caulimoviridae* que infecta principalmente los árboles de cacao. El CSSV puede disminuir el rendimiento del cacao en el primer año de infección y, usualmente, mata el árbol en el término de unos pocos años. Los

síntomas varían por cepa, pero generalmente ocurren decoloración de la hoja, hinchamiento del tallo/raíz, y extinción paulatina (*die-back*). El virus se transmite de un árbol al otro por vectores de cochinillas harinosas (*mealybug vectors*). Por consiguiente, los métodos y medios divulgados en esta invención pueden facilitar el aislamiento y la caracterización del CSSV y el manejo de la enfermedad del brote hinchado de cacao.

EJEMPLOS

[0080] Los siguientes ejemplos se ofrecen para ilustrar las modalidades provistas y no tienen como finalidad limitar el ámbito de la presente divulgación.

Ejemplo 1

Establecimiento de suspensión de células de cacao usando explantes de hoja

[0081] Este ejemplo muestra el establecimiento de una suspensión de células de cacao usando hojas como explantes de la donadora.

[0082] Se seleccionaron plantas de *Theobroma cacao* de uno o dos años y se usaron como material de la donadora para recolectar hojas jóvenes como explantes para la formación de callo. Las segundas hojas más jóvenes con un color de reverdecimiento rápido (Clasificadas como fase II por Greathouse et al., *American journal of botany* 58.4 (1971): 281-286) se seleccionaron y se recolectaron para cultivo *in vitro* (**FIG. 1**).

[0083] Las hojas se limpiaron con jabón y se enjuagaron con agua esterilizada destilada por tres veces. Posteriormente, las hojas se cortaron en pedazos en tamaños de 2 cm², se desinfectaron por inmersión en alcohol al 70% durante cinco minutos, y se enjuagaron tres veces con agua esterilizada ultrapura. Seguidamente, los explantes de hoja se sumergieron en hipoclorito de calcio al 1% o hipoclorito de sodio al 20% durante 50-60 minutos en condición de vacío (70 k-pascales) y se enjuagaron 3-5 veces con agua esterilizada ultrapura.

[0084] Después de la desinfección, las hojas esterilizadas se cortaron en pedazos de 1 cm² en una cámara de flujo laminar en condiciones asépticas, y se depositaron en placas de Petri con 30

mL de medio de inducción de callo sólido (CIM) (**Tabla 1**) durante un mes. Luego de este período de cultivo, los explantes de hoja se transfirieron inmediatamente a medio de proliferación de callo sólido (CPM) (**Tabla 2**) durante 8 semanas, con transferencias cada 2-3 semanas hasta que los callos proliferaron en abundancia. Los cultivos se incubaron en un fotoperíodo de 16h luz : 8h oscuridad, con temperaturas en 27 ± 2 °C.

Tabla 1. Medio de Inducción de Callo (CIM - *Callus Induction Medium*)

Componentes del medio	Concentración
Sales de medio Woody Plant Medium (WPM)	50% ^a
Vitaminas Gamborg B-5 (B5)	1 ml/L
L-glutamina	250 mg/L
Mioinositol	100 mg/L
Sacarosa	30 g/L
Ácido 1-naftalenacético (NAA)	1,0 mg/L
6-bencilaminopurina (BAP)	0,5-3,0 mg/L

^a 100% del componente en el medio se refiere al uso de la fórmula para 1 litro de solución como se describe en el manual del producto de Woody Plant Medium (código de producto: PT026) de HiMedia Laboratories.

Tabla 2. Medio de Proliferación de Callo (CPM - *Callus Proliferation Medium*)

Componentes del medio	Concentración
Sales de medio Woody Plant Medium (WPM)	100% ^a
Vitaminas Gamborg B-5 (B5)	1 ml/L
L-glutamina	250 mg/L
Mioinositol	100 mg/L
Sacarosa	30 g/L
Thidiazuron (TDZ)	2,2 mg/L

^a 100% del componente en el medio se refiere al uso de la fórmula para 1 litro de solución como se describe en el manual del producto de Woody Plant Medium (código de producto: PT026) de HiMedia Laboratories.

[0085] Después de eso, 500-1000 mg del callo friable se transfirieron a matraces de 250ml con 30 mL de medio de suspensión líquido (SUM, **Tabla 3**) con 500 mg/L de pectinasa durante 4 semanas, renovándose el medio cada semana (permitiendo a las células sedimentarse y retirando 20 mL de sobrenadante de medio usado y agregar 20 mL de medio nuevo). A continuación, las suspensiones de células se renovaron en medio SUM sin pectinasa cada semana durante 2-6 meses. Los cultivos en medio líquido se incubaron en la oscuridad, con temperaturas en 27 ± 2 °C puestos en un agitador a 120 rpm.

Tabla 3. Medio de Suspensión (SUM)

Componentes del medio	Concentración
Sales de Murashige and Skoog (MS)	100% ^a
Vitaminas de Driver and Kuniyuki Walnut (DKW)	1 ml/L
L-glicina	2 mg/L
Sacarosa	30 g/L
Penicilina	100 mg/L
2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético)	0,5 mg/L
Kinetina (KIN)	0,1 mg/L

^a 100% del componente en el medio se refiere al uso de la fórmula para 1 litro de solución como se describe en el manual del producto de Murashige and Skoog Plant Salt Mixture (código de producto: TS1004) de HiMedia Laboratories.

Ejemplo 2

Desinfección de la hoja

[0086] Este Ejemplo explora los factores que afectan la desinfección de la hoja en el establecimiento de cultivos en suspensión de células de cacao.

[0087] **FIG. 2** muestra que el mejor tipo de hoja para inducir la formación de callo son la hojas tipo 2. No obstante, debido a un alto porcentaje de muerte de las hojas luego del uso de una elevada concentración de hipoclorito de calcio, se diseñó un experimento para usar una baja

concentración de hipoclorito de calcio como un tratamiento con vacío durante un período de tiempo (**FIGS. 3 y 4; Tablas 4 y 5**). Se encontró que una baja concentración de hipoclorito de calcio (0,5 mg/L) durante 40 minutos fue el mejor tratamiento para la desinfección de hoja de cacao.

Tabla 4. Análisis de desviación para la presencia de hongos

	Df*	Deviance	Resid. Df	Resid. Dev	Pr(>Chi)
Null (Desconocido)			47	49,13	
Hipoclorito	1	9,35	46	39,78	0,0022
Tratamiento con alcohol	1	0,00	45	39,78	1,0000
Tratamiento con fungicida	1	0,00	44	39,78	1,0000
Tiempo	1	0,61	43	39,16	0,4330
Hipoclorito : tratamiento con alcohol	1	11,46	42	27,70	0,0007
Hipoclorito : tratamiento con fungicida	1	3,61	41	24,10	0,0576
Tratamiento con alcohol: tratamiento con fungicida	1	0,56	40	23,54	0,4554
Tratamiento con alcohol: tiempo	1	0,00	39	23,54	1,0000
Hipoclorito: tratamiento con alcohol: tratamiento con fungicida	1	0,00	38	23,54	0,9998

* **Deviance:** Desviación

Df (Degrees of freedom): Grados de libertad

Resid. Df (Residual Degrees of freedom): Grados de libertad residuales

Resid. Dev: Desviación residual

Tabla 5. Análisis de desviación para la presencia de bacterias

	Df	Deviance	Resid. Df	Resid. Dev	Pr(>Chi)
Null (Desconocido)			47	36,17	
Hipoclorito	1	1,54	46	34,63	0,2145
Tratamiento con alcohol	1	9,46	45	25,17	0,0021

Tratamiento con fungicida	1	0,98	44	24,18	0,3218
Tiempo	1	4,10	43	20,09	0,0430
Hipoclorito: tratamiento con alcohol	1	0,00	42	20,09	1,0000
Hipoclorito: tratamiento con fungicida	1	0,00	41	20,09	1,0000
Tratamiento con alcohol: tratamiento con fungicida	1	0,00	40	20,09	1,0000
Tratamiento con alcohol: tiempo	1	0,00	39	20,09	0,9998
Hipoclorito: tratamiento con alcohol: tratamiento con fungicida	1	0,00	38	20,09	1,0000

Ejemplo 3

Efectos de las hormonas y el fotoperíodo sobre la inducción de callo

[0088] Este Ejemplo muestra los efectos de las hormonas y el fotoperíodo sobre la inducción de callo en el establecimiento de cultivos en suspensión de células de cacao.

[0089] El cribado (*screening*) de un conjunto de hormonas de crecimiento vegetal llevó a la combinación de ácido 1-naftalenacético (NAA) y 6-bencilaminopurina (BAP) en el uso del medio de inducción de callo. **FIGS. 5 y 6** muestran los resultados de la combinación de BAP y ácido indolacético (IAA), y **FIG. 7** muestra los resultados de la combinación de NAA con BAP. Se encontró que NAA en 1 mg/L en combinación con BAP en 0,5-3 mg/L indujo sorpresivamente la formación de callo friable en cantidad deseada. Otras combinaciones de hormonas vegetales produjeron callos de inferior calidad (es decir, callo compacto, el cual no es apropiado para establecer cultivos en suspensión de células) y/o en una cantidad demasiado baja para establecer cultivos en suspensión de células. Sin querer entrar en limitaciones teóricas, se cree que la combinación de NAA y BAP es importante para la inducción de callo friable para el establecimiento de cultivos en suspensión de células de cacao.

[0090] **FIG. 5** muestra también los resultados de usar luz en la incubación del cultivo. Se encontró que la eficiencia de la formación de callo friable fue alta cuando los cultivos se incubaron en un fotoperíodo de 16h luz : 8h oscuridad.