

Desarrollo de líneas de cacao (*Theobroma cacao* L.) editadas genéticamente que limiten la acumulación de cadmio en sus tejidos: FASE-I

Jose Ángel Rodríguez Bolaño^a, Neyder Alejandro Marín Vélez^a, Diego Fernando Villanueva-Mejía^b

^aPregrado en Biología, Departamento de Ciencias Biológicas, Escuela de Ciencias, Universidad EAFIT, Medellín, Colombia.

^bDepartamento de Ciencias Biológicas, Escuela de Ciencias, Universidad EAFIT, Medellín, Colombia.

Material de soporte

Tabla S1. Términos de búsqueda generales y resultados obtenidos entre todos los motores búsqueda empleados. Un total de 276 trabajos fueron descargados y revisados en búsqueda de información relevante para cada tema.

Términos de búsqueda	Resultados
<i>Theobroma cacao</i> /Phylogeny/Taxonomy	29
<i>Theobroma cacao</i> /Geographical distribution	13
<i>Theobroma cacao</i> /History	19
<i>Theobroma cacao</i> /Colombia	18
<i>Theobroma cacao</i> /Cadmium uptake	29
<i>Theobroma cacao</i> /Genome	33
<i>Theobroma cacao</i> /Heavy metals	16
Plants/Cadmium Uptake/Genes	103
<i>Theobroma cacao</i> /Gene editig/Genetic engeneeirig	16
TOTAL	276

Figura S1. Red IPP de las FPAC de *Arabidopsis thaliana*. Un total de 44 proteínas pertenecientes a las FPAC de *A. thaliana* fueron sometidas al software *STRING* (versión 11.0) y se generó la red IPP correspondiente con un *p-value* < 1x10⁻¹⁶.

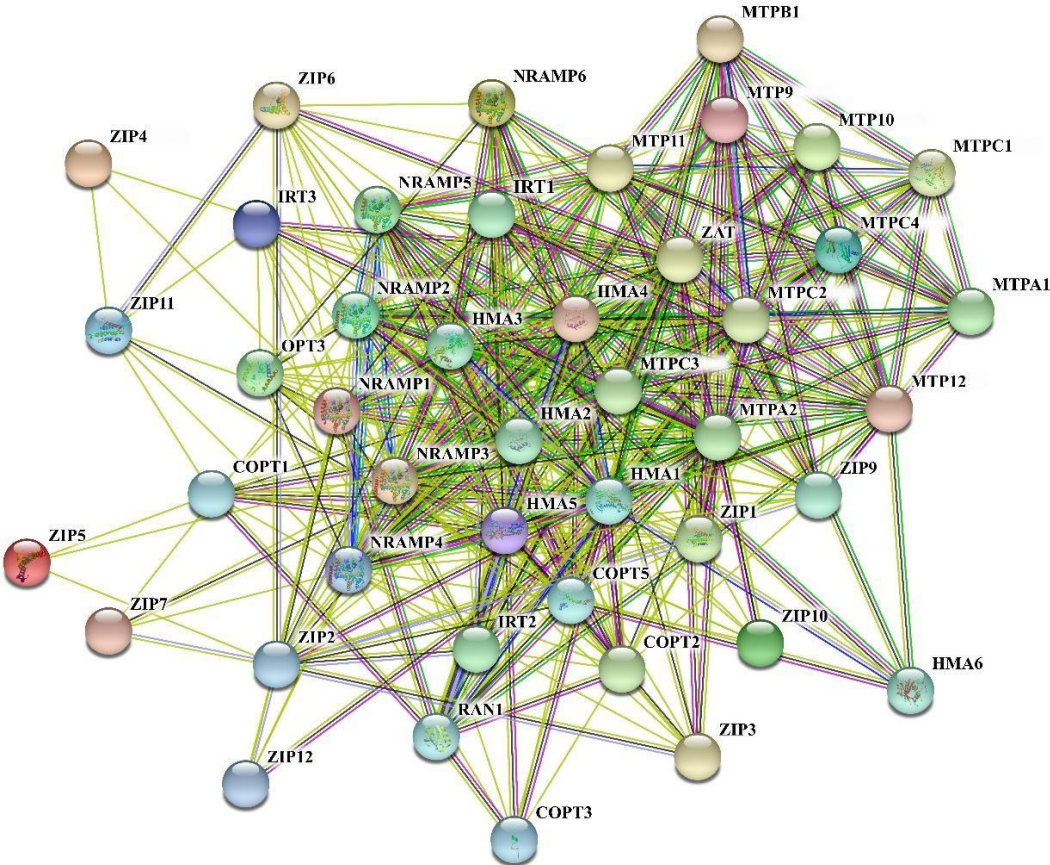


Figura S2. Red IPP de las FPAC de *Oryza sativa*. Un total de 37 proteínas pertenecientes a las FPAC de *O. sativa* fueron sometidas al software *STRING* (versión 11.0) y se generó la red IPP correspondiente con un *p-value* < 1x10⁻¹⁶.

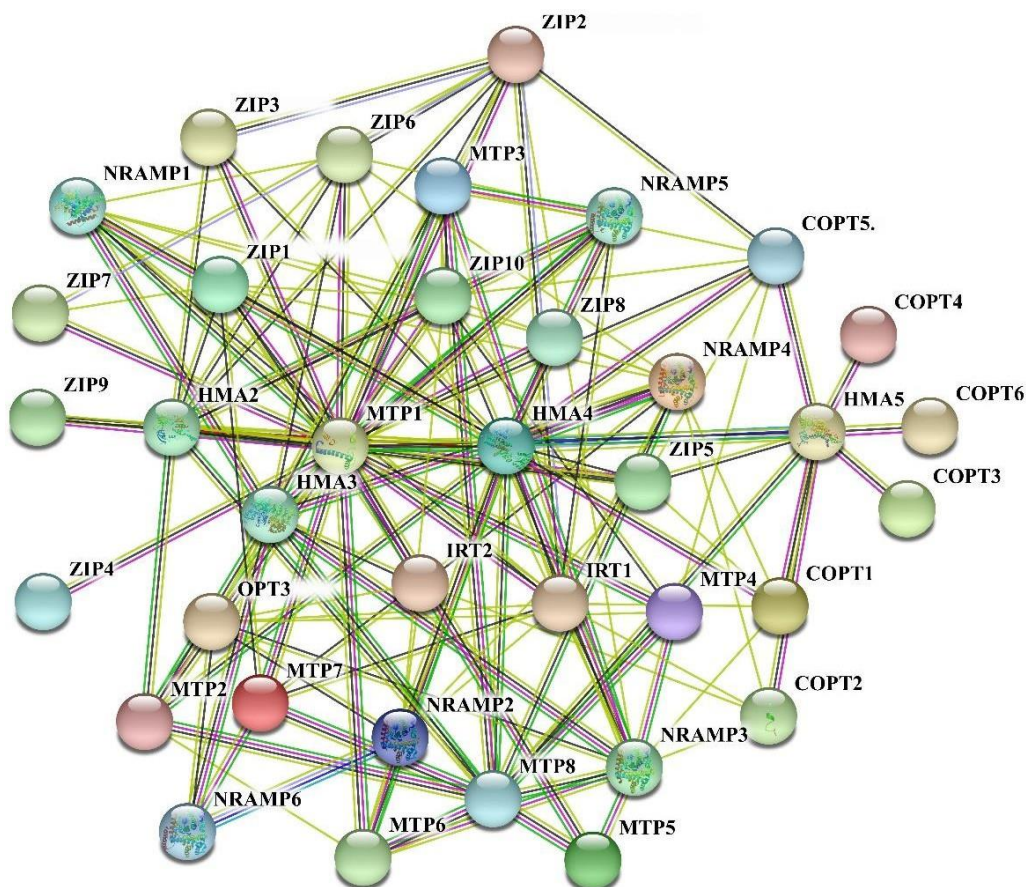


Tabla S2. Resultados principales de trabajos de investigación relacionados con cultivo in vitro de tejidos para *T. cacao*.

Referencia	Objetivo/Explante	Resultado
[79]	Propagación (Yemas axilares)	<ul style="list-style-type: none"> • Contaminación < 5%. • Hinchamiento y rotura de yemas entre 5 y 8 días después del primer cultivo. • Desarrollo de yemas y producción de hojas en más del 85% de explantes entre 9 y 12 días del segundo cultivo. • Expansión, elongación de yemas y desarrollo de hojas a los 13 días. • La rizogénesis ocurrió en medio de inducción de raíces entre 12 y 14 días después en el 90% de los explantes. • Transferencia a tierra. Esta fase se logró entre 12 y 15 días. Aproximadamente el 10% de las plantas se perdieron a causa de los hongos.
[80]	Embriogénesis somática (Estaminodios)	<ul style="list-style-type: none"> • Explantes aumentaron de 2 a 3 veces su tamaño después de una semana de cultivo. • Posterior a la expansión, los estaminodios generaron callos compactos a los 14 días.

		<ul style="list-style-type: none"> • El tidiazurón (TDZ) propició una generación de 10 veces más callo compacto. • La producción de embriones somáticos a partir de callo embriogénico se evidenció con la formación de protuberancias emergiendo de la superficie del explante a las 2 semanas de la transfección del callo al medio para el desarrollo de embriones. • Se formaron estructuras globulares. • Aproximadamente 2 meses después de su cultivo, los explantes fueron cubiertos con embriones somáticos en forma de corazón • Entre el 98% y el 100% de los explantes formaron embriones somáticos, con un promedio de 40 embriones por estaminodio. • Embriones somáticos secundarios provenientes de embriones somáticos primarios fueron obtenidos cuando estos los últimos se mantuvieron por periodos de tiempo extendidos en medio para el desarrollo de embriones. • Después de 2 o 3 subcultivos los embriones alcanzaron la etapa de desarrollo torpedo, algunos desarrollaron hipocótilos y cotiledones bien definidos. • Embriones maduros aumentaron su tamaño al ser cultivados en medio para la regeneración de plantas. La elongación de los cotiledones y el crecimiento de raíz se evidenció después de una semana y pequeñas hojas verdes aparecieron después de un mes.
[81]	Formación de callos (Embriones inmaduros)	<ul style="list-style-type: none"> • Los primeros callos aparecieron después de 6 semanas de incubación. • Después de 8 semanas los callos fueron subcultivados cada 4 semanas para su mantenimiento y su peso pasó de estar entre 0,1g y 0,2g a estar entre 2g y 3g después del primer subcultivo.
[82]	Embriogénesis somática (Estaminodios)	<ul style="list-style-type: none"> • Flores de 2 a 3 semanas de producidas tienen mejor frecuencia de embriogénesis. • Se obtuvieron callos embriogénicos friables y compactos entre 3 y 4 semanas después del cultivo inicial. • Se observó un incremento de entre 6 y 7 veces en la producción de callo embriogénico cuando se usó TDZ. • Se obtuvieron embriones somáticos después de 3 o 4 semanas de cultivados en medio para la producción de embriones. • La mayoría de los embriones fueron normales (dos cotiledones y un hipocótilo) y sólo algunos fueron anormales (fusión de hipocótilos y múltiples cotiledones). • Los embriones de 8 a 12 semanas de edad fueron germinados y hojas expandidas se observaron después de 2 meses de cultivo.

[83]	Embriogénesis somática secundaria (Estaminodios)	<ul style="list-style-type: none"> • Los embriones aparecen a los 90 días desde la siembra de los estaminodios. • Los embriones en forma de torpedo se fragmentan y se ponen en medio de multiplicación y cada 45 días se subcultivan por un periodo de 8 meses para la formación de callo embriogénico. • Se usó medio líquido para la multiplicación de callo embriogénico. La etapa de maduración usa embriones en etapa de torpedo. • Apariencia del callo embriogénico es granular, friable y amarillo. • El callo secundario apareció del callo café no del callo primario.
[84]	Embriogénesis somática (estaminodios y pétalos)	<ul style="list-style-type: none"> • Después de 5 a 7 días se empieza a visualizar la formación de callo en los explantes. • Se empieza a reconocer 4 tipos de callo: TC: células traslucidas, WC: callo amarillo, WBC: callo café, FC: callo filamentos. • El porcentaje de conversión de embriones somáticos secundarios fue superior al 66%. • Plantas regeneradas vía embriogénesis somática fueron adaptadas exitosamente a condiciones <i>ex vitro</i>.
[85]	Embriogénesis somática (Estaminodios y pétalos)	<ul style="list-style-type: none"> • Se produjeron tres tipos de embriones: Normales, con cotiledones fusionados y anormales (Ausencia de meristemo apical y simetría lateral). • La totalidad de las estructuras de los embriones aparecieron entre 28 y 32 semanas después de la iniciación del cultivo de estaminodios. • La eficiencia de embriogénesis a partir de cotiledones es afectada por la edad del cultivo de estaminodios. • Desarrollaron un protocolo para embriogénesis somática secundaria a partir de tejidos de embriones somáticos y tiene como potencial incrementar 30 veces la producción de embriones.
[86]	Propagación (Plantas derivadas de embriogénesis somática – Tallos nodales y apicales, microesquejes)	<ul style="list-style-type: none"> • Los microesquejes se enraizaron de manera eficiente y se desarrollaron en plántulas. • Cuando se cultivaron explantes de tallos nodales en medio con TDZ, las yemas axilares proliferaron y se desarrollaron en brotes que fueron escindidos y enraizados. La eficiencia de este método es menor que el enraizamiento de microesquejes apicales recolectados directamente de plantas madre. • Lograron un éxito promedio del 87% de la aclimatación de la planta después del enraizamiento.
[87]	Embriogénesis somática (Estaminodios y pétalos)	<ul style="list-style-type: none"> • Optimización del protocolo (2002) de embriogénesis somática usando estaminodios y pétalos. • Se incorporaron tres pasos de propagación que aumentan la tasa de multiplicación.

		<ul style="list-style-type: none">• Un total de 800000 plantas pueden ser obtenidas de una sola flor en dos años.
--	--	---