

LA CASEINA HIDROLIZADA INHIBE EL DESARROLLO DE CALLOS PROVENIENTES DE ANTERAS DE CACAO CULTIVADAS *in vitro*

Efraín Salazar*, Darío Torrealba*, Luis Castro*
y María Torrealba*

RESUMEN

Con la finalidad de inducir respuestas morfogénicas en callos de cacao, *Theobroma cacao* L. cv 'OC 61', provenientes de anteras cultivadas *in vitro*, se sembraron los callos en medios de cultivo con las sales MS, suplementados con 45 g l⁻¹ de Sacarosa, Tiamina-HCl (1 mg l⁻¹), Acido Nicotínico (1 mg l⁻¹), Piridoxina HCl (1 mg l⁻¹), mio-inositol (1 g l⁻¹), agua de coco (10%) y solidificados con agar Sigma (6 g l⁻¹). Fueron probados tratamientos con caseína hidrolizada (0, 1, 3 y 5 g l⁻¹). El crecimiento de los callos se redujo con el aumento de las concentraciones de caseína hidrolizada. La presencia de agua de coco en el medio de cultivo resultó beneficiosa para el crecimiento de los callos. Ni la caseína hidrolizada, ni el agua de coco indujeron la formación de órganos o embriones somáticos en los callos. El aumento de la concentración de caseína hidrolizada aceleró el proceso de oscurecimiento de los tejidos.

Palabras Clave: Cacao; *Theobroma cacao* L.; cultivo de anteras; caseína hidrolizada; callogénesis.

INTRODUCCIÓN

El cacao, *Theobroma cacao* L., es un cultivo de origen americano, principalmente de la cuenca amazónica, extendiéndose hacia mesoamérica (Enríquez, 1985), siendo los cacao tipo criollo los primeros en domesticarse (Lanaud *et al.*, 1999). En Venezuela, el cacao criollo producido es reconocido internacionalmente como un cacao de alta calidad, razón

* Investigadores. INIA. Centro Nacional de Investigaciones Agrícolas (CENIAP). Zona Universitaria. Av. Universidad, vía El Limón. Apdo. 4653. Maracay 2101, estado Aragua. Venezuela.
RECIBIDO: agosto 20, 2004.

por la cual se cotiza a precios elevados en el mercado internacional, siendo uno de los pocos sitios donde todavía se encuentran algunos de los legítimos cacaos tipo criollo que alcanzaron la fama mundial (Cartay, 1998).

La selección, preservación y futuro mejoramiento genético del cacao tipo criollo es un objetivo importante para desarrollar la producción comercial de esta especie, aprovechando las ventajas que ofrece el cultivo del cacao en las condiciones venezolanas. En este sentido, las técnicas biotecnológicas ofrecen una alternativa eficiente, tanto para la propagación masiva asexual, como para el mejoramiento genético de la especie.

Dentro de las alternativas que la Biotecnología ofrece, el cultivo de anteras ha sido una herramienta ampliamente utilizada en la propagación de distintas especies vegetales desde 1964 (Guha y Maheshwari, 1964a y 1964b). La técnica ha sido utilizada exitosamente en girasol (Saji y Sujatha, 1998), Lino (Chen *et al.*, 1998), cítricas (Cheng, 1992) y avena (Cistue *et al.*, 1994) entre otras especies.

Así mismo, el cultivo de anteras es una herramienta útil para la producción de plantas haploides, las cuales son herramientas importantes en la obtención de dobles haploides homocigotos (Walter y Aycock, 1994), inducción de mutaciones, transformación genética e hibridación somática, probando ser una técnica útil para acoplarse a programas de mejoramiento genético (Brown y Thorpe, 1995).

En el caso de cacao, la Biotecnología ha tenido resultados exitosos en la regeneración de plantas mediante embriogénesis somática (Wen y Kinsella, 1993; Söndhal *et al.*, 1993), desarrollo de embriones somáticos nucleares (Figueira y Janick, 1993), el rescate de embriones procedentes de semillas aplanadas de cacao (Palma y Villalobos, 1989) y en la transformación genética de células de mesófilo de cacao usando *Agrobacterium tumefaciens* (Sain *et al.*, 1994).

No hay trabajos sobre el uso del cultivo de anteras en la especie, salvo las experiencias previas de este equipo de trabajo en la inducción de la formación de callos a partir del cultivo *in vitro* de anteras de cacao criollo sin la formación de ningún tipo de estructuras a partir de los callos regenerados, donde la presencia de agua de coco 10% en el medio de cultivo se encontró necesaria para el desarrollo de callos (Salazar *et al.*, datos no publicados).

El uso de caseína hidrolizada ha sido presentado como efectivo en la inducción de embriogénesis somática, especialmente en el cultivo de embriones inmaduros de cacao, por lo que el trabajo expuesto tuvo como finalidad principal estudiar el efecto de la caseína hidrolizada en el desarrollo *in vitro* de callos de cacao, regenerados a partir del cultivo *in vitro* de anteras, a fin de evaluar la posibilidad de inducción de morfogénesis.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se extrajeron anteras de cacao del cultivar OC 61 pertenecientes a la colección de germoplasma de 1945 de la estación del INIA en Ocumare de la Costa, estado Aragua, Venezuela. Se seleccionaron botones florales de 2-3 mm de longitud, los cuales fueron desinfectados 2 min en alcohol etílico 70%, sumergiéndose posteriormente en una solución de hipoclorito de sodio 50% de una solución comercial (5,25% i.a) durante 10 min.

El exceso de desinfectante se eliminó con tres lavados sucesivos en agua destilada esterilizada (ADE) y las anteras se sembraron en tubos de ensayo 25x150 mm conteniendo 10 ml de medio de cultivo provisto con las sales MS (Murashige y Skoog, 1962), suplementado con 45g l⁻¹ sacarosa, Tiamina-HCl (1 mg l⁻¹), Ácido Nicotínico (1 mg l⁻¹), Piridoxina HCl (1 mg l⁻¹), mio-inositol (1 g l⁻¹), 2,4-D (3 mg l⁻¹) y solidificados con agar Sigma (6 g l⁻¹). El pH se ajustó a 5,8±0,02 y el medio se esterilizó en autoclave a 121 °C y 15 psi de presión durante 20 min. Las anteras fueron dispuestas a crecer en la oscuridad durante 15 días a 25±1 °C, y posteriormente se colocaron a la misma temperatura bajo luz fluorescente con irradiancia de 16,95W m⁻² y un fotoperíodo de 16 horas.

Los callos generados se dividieron en secciones de 1 cm² aproximadamente, sembrándose en el mismo medio de cultivo descrito para las anteras, desprovisto del 2,4-D y suplementado con agua de coco al 10% (Salazar *et al.*, 1993) y caseína hidrolizada (0,1, 3 ó 5) g l⁻¹. Las condiciones de acidez y esterilización de los medios fueron idénticas a las descritas para las anteras. Los callos se colocaron a crecer bajo las mismas condiciones de luz fluorescente y temperatura que las anteras. Se sembraron 20 tubos por cada tratamiento, los cuales se arreglaron bajo un diseño completamente aleatorizado, midiendo el crecimiento del callo y la formación de estructuras cada 3 d, por un período de 8 semanas. El crecimiento del callo se midió mediante la fórmula $(D1 \times D2)/4$ donde D1 es el diámetro mayor y D2 es el diámetro menor del callo.

RESULTADO Y DISCUSIÓN

Los callos se formaron desde el interior de las anteras en el 100% de los explantes cultivados, apareciendo dos semanas posteriores a la siembra *in vitro* (Figura 1). Los resultados obtenidos con el uso de la caseína hidrolizada en el cultivo de los callos se resumen en el Cuadro. Todas las experiencias se repitieron por triplicado obteniéndose siempre resultados idénticos en cada tratamiento.

Los datos obtenidos se distribuyeron normalmente, según los resultados de la prueba de Wilk-Shapiro la cual arrojó un índice de 0,9737 para los valores de crecimiento de callo. Los datos fueron transformados mediante la expresión $\sqrt{\text{crecimiento} + 1,00}$, con la finalidad de reducir el coeficiente de variación, el cual al final de la transformación presentó un valor de 12,25%.

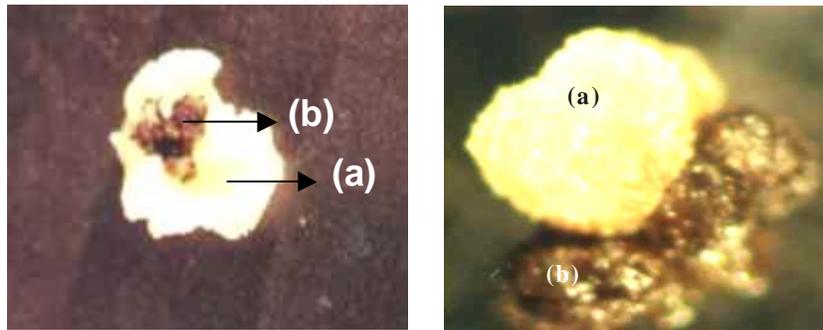


FIGURA 1. Callos desarrollados a partir de anteras de cacao, *Theobroma cacao* L., **a)** masas de células recién formadas, **b)** tejido original de la antera.

El análisis de varianza arrojó diferencias significativas entre los tratamientos con caseína hidrolizada, y que el crecimiento de los callos tendía a disminuir al aumentar la dosis del compuesto. Este comportamiento fue sostenido a lo largo del experimento no observándose la formación de estructuras de ningún tipo a partir de los callos. Los callos se mostraron como estructuras friables, blanquecinas o cremosas (Figura 2); sin embargo, la coloración del mismo tiende a oscurecerse más rápidamente al aumentar la dosis de caseína hidrolizada. Este efecto inhibitorio de la

caseína hidrolizada es contrario a lo observado en el cultivo de callos provenientes de embriones inmaduros, donde la presencia de este compuesto es un factor de importancia en la inducción de embriogénesis somática, datos observados por los autores, pero no publicados.

CUADRO. Efecto de la caseína hidrolizada y 10% de agua de coco en el crecimiento de callos provenientes de anteras de cacao, *Theobroma cacao* L., cultivadas *in vitro* a los 7 días posteriores a la siembra.

Caseína Hidrolizada (g l ⁻¹)	Agua de coco (%)	Crecimiento de callos (cm ²)
0	10	1,322±0,619 ^a
1	10	1,123±0,488 ^{ab}
3	10	1,159±0,554 ^{ab}
5	10	0,710±0,548 ^b

Letras iguales indican que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las medias de los tratamientos, analizadas según la Prueba de Tukey ($\alpha=0,01$).

La caseína hidrolizada, como fuente de nitrógeno orgánico, resultó poco beneficiosa para el proceso de morfogénesis o embriogénesis, ya que no indujo la formación de ningún tipo de brote o embrión somático, como era lo esperado. Del mismo modo, activa los mecanismos de oxidación de compuestos fenólicos, proceso generalmente responsable del oscurecimiento de los tejidos cultivados *in vitro*. Este oscurecimiento de los tejidos, una vez transcurrida más de ocho semanas en cultivo, se generaliza para todos los tratamientos. El cambio de los callos a medios de cultivo fresco no detiene el proceso, salvo en el tratamiento desprovisto de la caseína hidrolizada.

El cultivo de los callos en medios con caseína hidrolizada y desprovisto de agua de coco presentó resultados similares a los observados, con una disminución mayor en el tamaño de los callos, para un mismo período de tiempo. Por lo tanto, la presencia del agua de coco parece ser necesaria para favorecer una mayor tasa de crecimiento o de división celular. Sin embargo, tampoco permitió la formación de estructuras en los callos.

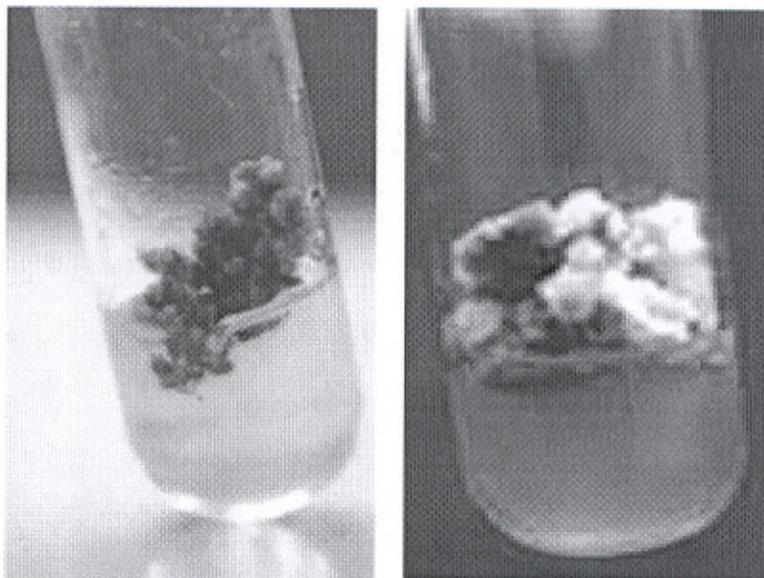


FIGURA 2. Masas celulares de cacao blanquecinas o cremosas desarrolladas a partir de anteras cultivadas *in vitro*.

Ensayos adicionales con la caseína y diferentes combinaciones de condiciones de luminosidad, tampoco indujeron la formación de estructuras, ni modificaron el tipo de respuesta observada en los callos de cacao. Al parecer, el suministro de nitrógeno orgánico no está relacionado con la inducción *in vitro* de morfogénesis en los callos provenientes de anteras de cacao.

CONCLUSIONES

- La suplementación del medio de cultivo con caseína hidrolizada reduce el crecimiento de los callos y no favorece la inducción de organogénesis o embriogénesis en el cultivo de callos regenerados *in vitro* a partir de anteras de cacao.
- Las dosis estudiadas de caseína hidrolizada aumentan el oscurecimiento de los tejidos del callo de cacao, razón por la cual se piensa inducen la oxidación de compuestos fenólicos.

- Los callos de cacao regenerados a partir de anteras deben cultivarse en medios desprovisto de caseína hidrolizada y suplementados con agua de coco, la cual demostró ser beneficiosa para el crecimiento de los callos, no así para la formación de estructuras.

SUMMARY

In order to induce morphogenetic responses on cocoa, *Theobroma cacao* L. cv 'OC 61, anther-derived calluses were cultured on MS medium supplemented with 45 g l⁻¹ Sucrose, Thiamine-HCl (1 mg l⁻¹) Nicotinic acid (1 mg l⁻¹) Pyridoxine HCl (1 mg l⁻¹), myo-inositol (1 g l⁻¹) and coconut water (10%), solidified with Sigma agar (6 g l⁻¹). Different concentrations of hydrolyzed Casein (0, 1, 3 y 5 g l⁻¹) were tested. Callus growth was reduced with the increase of Casein concentration. Coconut water proved to be beneficial for callus growth. Neither hydrolyzed Casein nor coconut water induced organ or somatic embryo formation. The increase of hydrolyzed casein accelerated tissue darkening.

Key Words: Cocoa; anther culture; hydrolyzed casein; morphogenesis.

BIBLIOGRAFÍA

BROWN, D. C. W. and T. A. THORPE. 1995. Crop improvement through tissue culture. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 11(4):409-415.

CARTAY, R. 1998. Cacao venezolano con aroma de exportación. **In:** CONICIT en cuentas N° 26. ISSN:1.316-3.655.

CHEN, Y. R., E. O. KENASCHUK and J. D. PROCUNIER. 1998. Plant regeneration from anther culture in canadian cultivars of flax (*Linum usitatissimum* L.) *Euphytica* 102(2):183-189.

CHENG, L. G. 1992. Studies on increasing the induction frequency of embrioids in anther culture of citrus. *Scientia Agricultura Sinica* 25(1):90-91.

CISTUE, L., A. RAMOS, A. M. CASTILLO and I. ROMAGOSA. 1994. Production of a large number of doubled haploid plants from barley anthers pretreated with high concentrations of mannitol. *Plant Cell reports* 13(12):709-712.

FIGUEIRA, A. and J. JANICK. 1993. Development of nucellar somatic embryos of *Theobroma cacao* Acta Horticulturae 336:231-238.

GUHA, S. and S. C. MAHESHWARI. 1964 a. *In vitro* callus induction from anthers of *Datura innoxia* Indian Journal of Plant Physiology 20:163-167.

GUHA, S. and S. C. MAHESHWARI. 1964 b. *In vitro* production of embryos from anthers of *Datura* Nature (London)212:97-98.

LANAUD, C., J. C. MOTAMAYOR et O. SOUNIGO. 1999. Le cacaoyer. **In:** Diversité génétique des plantes tropicales cultivées. P. Harmon, M. Seguin, X. Perrier et J.C. Glazsman Editeurs scientifiques. CIRAD ISSN 1251-7224 ISBN 2-86614-334-8.

MURASHIGE, T and F. SKOOG. 1962. A revised medium for the rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Phys. Plant. 5:473-497.

PALMA, T. and V. M. VILLALOBOS. 1989. Rescate *in vitro* de embriones provenientes de semillas aplanadas de cacao (*Theobroma cacao* L.). Turrialba 39(4):525-529.

SAIN, S. L., K. K. ODURO and D. B. FURTEK. 1994. Genetic transformation of cocoa leaf cells using *A. tumefaciens*. Plant cell Tissue and organ culture 43(1):73-77.

SAJI, K. V. and M. SUJATHA. 1998. Embryogenesis and plant regeneration in anther culture of sunflower (*Helianthus annuus* L.) Euphytica 103(1):1-7.

SALAZAR, E., M. MATOS, D. TORREALBA and M. TORREALBA. 1993. Cultivo *in vitro* de embriones inmaduros de cacao (*Theobroma cacao* L.). **In:** Resúmenes de la XLIII Convención Anual de ASOVAC. Acta Científica Venezolana 44(suppl 1):35.

SÖNDHAL, M. R., S. LIU, C. BELLATO and A. BRAGIN. 1993. Cacao somatic embryogenesis. Acta Horticulturae 336:245-248.

WALKER, D. R. and M. K. AYCOCK Jr. 1994. Development of anther-derived dihaploids to combine disease resistance in Maryland tobacco. Crop Science (USA) 34(2):335-338.

WEN, M. C. and J. E. KINSELLA. 1993. Somatic embryogenesis and plantlet regeneration of *Theobroma cacao* L. Food Biotechnology 5(2):119-137.