

EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN CULTIVARES DE CACAO VENEZOLANOS¹

Rosalía Velásquez Salazar*, Yanet Sandra*,
Carmen Betancourt*, Jonás Mata* y Félix García*

RESUMEN

Los métodos tradicionales de propagación del cacao, *Theobroma cacao* L. (vegetativa y sexual) han sido las técnicas mayormente utilizadas por los productores venezolanos; sin embargo, estas no han sido las más favorables, porque se producen plantas con características agronómicas indeseables. Actualmente, dentro de las técnicas de cultivo de tejidos, la embriogénesis somática parece ser el método más eficiente de regeneración y multiplicación de clones de cacao. Para ello, se ajustó un protocolo donde se utilizaron como explantes órganos florales (estaminoidios, pétalos y anteras) y cotiledones inmaduros de los genotipos Choróni-42, Ocumare-77, Ocumare-61 y Porcelana, induciendo la formación de callo con Thidiazuron (TDZ), altas concentraciones de sacarosa y 2,4-D (2,4 diclorofenoxiacético); se indujo la formación de proembriones con cinetina y agua de coco. Los embriones fueron transferidos a un medio con aminoácidos y KNO₃, bajo condiciones de oscuridad y temperatura entre 26 – 29 °C. Los embriones cotiledonares se subcultivaron bajo condiciones de fotoperíodo 16/8 horas luz-oscuridad para la posterior formación de plantas.

Palabras Clave: Callos; embriones somáticos; *Theobroma cacao* L.; estaminoidios; cotiledones.

¹ Trabajo financiado por Fonacit

* Investigadores. Universidad Central de Venezuela. Facultad de Agronomía (UCV- FAGRO). Instituto de Genética. Apto. 4579. Maracay, estado Aragua. Venezuela.
E-mail: urdanet2@telcel.net.ve

RECIBIDO: octubre 04, 2004.

SOMATIC EMBRYOGENESIS IN VENEZUELAN COCOA CULTIVARS

Rosalía Velásquez Salazar*, Yanet Sandra*,
Carmen Betancourt*, Jonás Mata* y Félix García*

SUMMARY

The traditional sexual and asexual methods of cocoa propagation have been widely used in Venezuela and worldwide, however, they have not been successful since plants with undesirable agronomic characteristics are produced. At present, plant regeneration via somatic embryogenesis provides an alternative method for clonally propagating cocoa. Therefore, a protocol was developed in order to use staminode, petal, anther and immature cotyledon explants of genotypes Chroní-42, Ocumare-77, Ocumare-61 and Porcelana. Callus formation was induced with Thidiazuron (TDZ), high sucrose concentration and 2,4-D. Somatic embryos were induced with kinetin and coconut water. Embryos were transferred to a medium containing amino acids and KNO₃ and placed under dark conditions and 26-29 °C. Cotyledonary embryos were subcultivated under photoperiodic conditions of 16/8 hours light-dark for posterior formation of plants.

Key Words: Somatic embryogenesis; cocoa; *Theobroma cacao* L.; staminodes; cotyledon; callus.

¹ Trabajo financiado por Fonacit.

* Investigadores. Universidad Central de Venezuela. Facultad de Agronomía (UCV- FAGRO). Instituto de Genética. Apto. 4579. Maracay, estado Aragua. Venezuela.
E-mail: urdanet2@telcel.net.ve

RECIBIDO: octubre 04, 2004.

INTRODUCCIÓN

El cacao, *Theobroma cacao* L., es un árbol tropical originario del Amazonas y cultivado ampliamente a escala mundial. La alta variabilidad genética observada en las plantas propagadas sexualmente, el alto costo y baja eficiencia de la propagación asexual, han obligado a los mejoradores y agricultores buscar otras alternativas de multiplicación de esta especie, además que permita mantener la estabilidad genética del cultivo y la calidad de su fruto.

Las técnicas de cultivo de tejidos contribuyen a mejorar el sistema de multiplicación de la especie, ya que es capaz de mantener la uniformidad genética de genotipos deseables. La embriogénesis somática (ES) es un sistema que permite obtener clones con una arquitectura dimorfica normal y un sistema radical de gran anclaje, además de los otros potenciales que esta técnica presenta para el mejoramiento genético, intercambio y conservación de material (Maximova *et al.*, 2002)

La ES en cacao ha sido trabajada desde la década de los 70; sin embargo, los resultados no fueron muy satisfactorios. Se han utilizados diferentes tipos de explantes (florales y foliares), genotipos y mezclas de medios de cultivo a fin de lograr regenerar clones que mantuvieran sus características genéticas en el tiempo (Esan, 1977; Aguilar *et al.*, 1992; López-Báez *et al.*, 1993; Alemanno *et al.*, 1997; López-Báez *et al.*, 2000).

Recientemente, Li *et al.* (1998) desarrollaron un método eficiente de producción de ES a partir de explantes florales y combinaciones de Thidiazuron (TDZ) y 2,4-D (ácido diclorofenoxiacético).

Tomando en cuenta las necesidades que presentan los productores cacaoteros en Venezuela, el interés de renovar las viejas plantaciones y la demanda que actualmente tiene el producto, la investigación se orientó hacia la obtención de ES a partir de genotipos de importancia nacional por su calidad chocolatera y mediante la evaluación de diferentes explantes: cotiledones, estaminoidios y anteras.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las actividades fueron realizadas en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos del Centro de Investigaciones en Biotecnología Agrícola (CIBA), Universidad Central de Venezuela (UCV), Facultad de Agronomía. El material

vegetal utilizado fue tomado de plantas de cacao adultas, establecidas en el campo de la Estación Experimental del INIA, ubicada en Ocumare de la Costa, estado Aragua y en el campo del Instituto de Genética de la Facultad de Agronomía de la UCV.

Se tomaron explantes florales y cotiledones inmaduros de los siguientes genotipos: Ocumare 61 (OC-61), Ocumare 77 (OC-77), Choróní 42 (CHO-42) y Porcelana UCV (Porc. - UCV), dividiéndose el experimento en dos ensayos de acuerdo al tipo de explante a utilizar.

1er. Ensayo. Explantes Florales

Botones florales sanos, totalmente cerrados, y longitud de 3,5 - 5 mm, se recolectaron en horas de la mañana, colocándolos en un envase de vidrio con agua destilada estéril fría y mantenidos en una cava con hielo hasta llegar al laboratorio. La desinfección de los botones florales se realizó con una solución de cloro al 5% por 10 minutos, el exceso de cloro fue eliminado con agua destilada estéril.

Para la inducción de callos, los explantes (estaminoidios, anteras y pétalos) fueron sembrados en el medio inicial que contenía las sales básicas de Driver y Kuniyuki (1984; DKW) tal como se observa en el Cuadro 1, suplementado con 22,7nM TDZ, dos concentraciones de sacarosa (40 y 80 g l⁻¹) y tres concentraciones de 2,4-D (4, 6 y 8 mg l⁻¹).

Una vez formados los callos fueron transferidos a un medio con las sales básicas de Lloyd y McCown (1981) presentado en el Cuadro 1, suplementado con 2,5 mg l⁻¹ cinetina, 50 ml l⁻¹ agua de coco y la concentración de sacarosa que mejor resultado dio en la fase anterior (80g l⁻¹).

Las masas pro embriogénicas se transfirieron a un medio de DKW rico en aminoácidos (0,044mg l⁻¹ arginina, 0,019 mg l⁻¹ glicina, 0,033 mg l⁻¹ leucina, 0,046 mg l⁻¹ lisina y 0,051 mg l⁻¹ triptofano) suplementado con 0,3 g l⁻¹ de KNO₃. Una vez iniciada la formación de embriones estos se subcultivaron en un medio con las sales básicas de DKW. Las condiciones de cultivo fueron de total oscuridad y temperatura de 26 – 29 °C.

2do. Ensayo. Explantes: Cotiledones inmaduros

Se recolectaron mazorcas de apariencia sana y en un estado de madurez intermedio, de aproximadamente 90 días, las mismas fueron desinfectadas con agua jabonosa y etanol al 70%. Una vez esterilizadas se

desprende el pericarpio, descubriendo las semillas, y sumergidas en una solución de cloro al 20% por 30 min, el exceso de cloro fue eliminado con agua destilada estéril. Las semillas inmaduras se cortaron transversalmente para descubrir el cotiledón y el embrión, sembrándolos individualmente en los medios de cultivo para inducir la formación de callos.

CUADRO 1. Composición de sales básicas usadas en la preparación de los medios de cultivo.

Sales Básicas	Murashige y Skoog	DKW	Loyd y McCown
Macros (mg l⁻¹)			
KNO ₃	1 900	---	---
NH ₄ NO ₃	1 650	1 416	400
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	---	1 969	556
CaCl ₂ ·2H ₂ O	440	149	96
MgSO ₄ ·7H ₂ O	370	740	370
K ₂ SO ₄	---	1 559	---
KH ₂ PO ₄	170	265	170
Micros (mg l⁻¹)			
KI	0,83	---	---
H ₃ BO ₃	0,62	0,48	6,2
MnSO ₄ ·4H ₂ O	155	---	29,43
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,86	---	8,6
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,25	0,39	0,25
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,025	0,025	0,25
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,025	---	---
Zn(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	---	17 000	---
MnSO ₄ ·H ₂ O	---	33 400	---
CaCl ₂	3	---	---
Ca(NO ₃) ₂	3	---	---

./... continúa

../... continuación CUADRO 1.

Sales Básicas	Murashige y Skoog	DKW	LLoyd y McCown
Solución de Hierro			
FeSO ₄ ·7H ₂ O	2 780	33 800	27,8
Na ₂ EDTA	3 730	45 400	37,3
Vitaminas			
Inositol	200	200	---
Glutamina	250	250	---
Ac. Nicotínico	1	1	---
Glicina	2	2	---
Tiamina	2	2	---
Vit. Gamborg	---	---	Si
TDZ	22,7nM	22,7nM	---
Phytigel (g l ⁻¹)	2	2	2,2
pH	5,8	5,8	5,7
Aminoácidos (mg l⁻¹)			
Arginina	-	0,04355	-
Glicina	-	0,01876	-
Leucina	-	0,03280	-
Lisina	-	0,04565	-
Triptofano	-	0,05105	-

Los medios a evaluar estaban compuestos por las sales básicas de Murashige y Skoog (1962; MS) y DKW (Cuadro 1) suplementado con tres concentraciones de sacarosa (40, 60 y 80 g l⁻¹) y tres de 2,4-D (4, 6 y 8 mg l⁻¹).

Con el objetivo de inducir la formación de estructuras embriogénicas, los callos formados fueron transferidos a un medio DKW suplementado con 0,4 mg l⁻¹ de Bencilaminopurina (BAP) y la concentración de sacarosa que arrojó los mejores resultados para la inducción de callos (60 g l⁻¹).

Los embriones fueron individualizados y transferidos al medio básico DKW suplementado con aminoácidos (0,044 mg l⁻¹ arginina, 0,019 mg l⁻¹ glicina, 0,033 mg l⁻¹ leucina, 0,046 mg l⁻¹ lisina y 0,051 mg l⁻¹ triptofano) y 0,3g l⁻¹ de KNO₃, bajo condiciones de oscuridad y temperatura entre 26-29 °C.

Para el estudio de los resultados se utilizaron métodos no paramétricos en el análisis de varianza con el objeto de ver si existen o no diferencias entre los tratamientos aplicados.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Ensayo I. Explantes Florales

Después de siete días de haber iniciado la implantación *in vitro*, se observó una duplicación del volumen de los explantes, indicio de respuesta callogénica; sin embargo, no se evidenció formación de callos, ni cambio de color de los explantes. Trece días más tarde, se observaron callos de color cristalino y apariencia higroscópica no compacta para los explantes pétalo y anteras; en contraste, los estaminoides fueron los que produjeron callos friables y de color cremoso, parámetros indicadores de la capacidad embriogénica del callo, siendo este el explante que mejor capacidad callogénica presentó.

Las concentraciones de sacarosa y 2,4-D que mejores resultados presentaron para el crecimiento y diferenciación de los estaminoides fueron las correspondientes al tratamiento T₄ (80g l⁻¹ sacarosa + 4 mg l⁻¹ 2,4-D), debido a la respuesta callogénica encontrada a los 15 d de implantado el explante para los genotipos evaluados (Cuadro 2). Se encontró un 100% de formación de callos para el genotipo CHO-42, seguido por 24% y 20% para los genotipos OC-61 y Porc.-UCV, respectivamente.

En líneas generales el explante que logró duplicar su volumen y formar callos a los 15 días de la implantación en el medio en los distintos tratamientos fueron los estaminoides; sin embargo, para los tratamientos T₂ y T₃ no se observó duplicación del volumen de los explantes, observándose el más bajo porcentaje de formación de callos para todos los genotipos evaluados. Estos resultados indican que los explantes florales de cacao no responden eficientemente a la concentración de 40 g l⁻¹ de sacarosa. Además se observó una marcada respuesta genotípica, asociado al tipo de explante utilizado.

CUADRO 2. Porcentaje de estaminoides que duplicaron su volumen y formaron callos después de la implantación de los explantes en el medio.

Trat.	7 días									15 días								
	CHO-42			OC-61			Porc.-UCV			CHO-42			OC-61			Porc.-UCV		
	E	P	A	E	P	A	E	P	A	E	P	A	E	P	A	E	P	A
T ₁	60	20	8	8	28	4	40	16	36	80	64	60	12	28	20	8	28	4
T ₂	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	4	NC	NC	NC	NC	8	NC	NC	NC
T ₃	NC	NC	NC	NC	NC	NC	12	NC	NC	12	8	20	NC	NC	NC	NC	NC	NC
T ₄	100	24	48	20	NC	NC	20	16	24	100	96	64	24	NC	4	20	NC	NC
T ₅	60	20	64	20	NC	NC	32	12	28	64	36	64	20	NC	NC	20	NC	NC
T ₆	76	4	4	40	NC	NC	24	4	36	84	44	60	44	20	8	40	NC	NC

NC: No hubo formación de callos

E: estaminoides; P: Pétalos; A: Anteras

Porc.- UCV fue el único genotipo que dio una respuesta embriogénica, observándose las distintas fases de desarrollo de los ES (Figura 1). Una vez desarrollados los embriones cotiledonares (Figura 1b y 1c), estos fueron individualizados y subcultivados cada 14 d, con un fotoperíodo de 16/8 h luz/oscuridad para su diferenciación (Figura 1d y 1e). Los genotipos OC-61 y CHO-42 indujeron formación de raíces, a pesar de que los callos tenían apariencia embriogénica.

Ensayo II. Explantes Cotiledones inmaduros

Los análisis estadísticos (Cuadro 3) demostraron diferencias entre los tratamientos, formándose tres grupos de medias. El grupo a fue el que presentó mejor respuesta callogénica y estuvo representado por las sales básicas de DKW suplementado con 80g l⁻¹ sacarosa y 4mg l⁻¹ 2,4-D, igualmente mostró el mayor número de ES formados por callo. Los tratamientos que presentaban una alta concentración de 2,4-D (8mg l⁻¹) no respondieron satisfactoriamente a la inducción de callo, observándose además una baja o nula formación de embriones (grupo b); sin embargo, se observaron diferencias genotípicas para algunos tratamientos. El tercer grupo (ab) agrupo a la mayoría de los tratamientos, esto parece indicar que no existe diferencias entre los medios de cultivo durante el proceso de inducción de callos pero sí sobre la formación de ES.

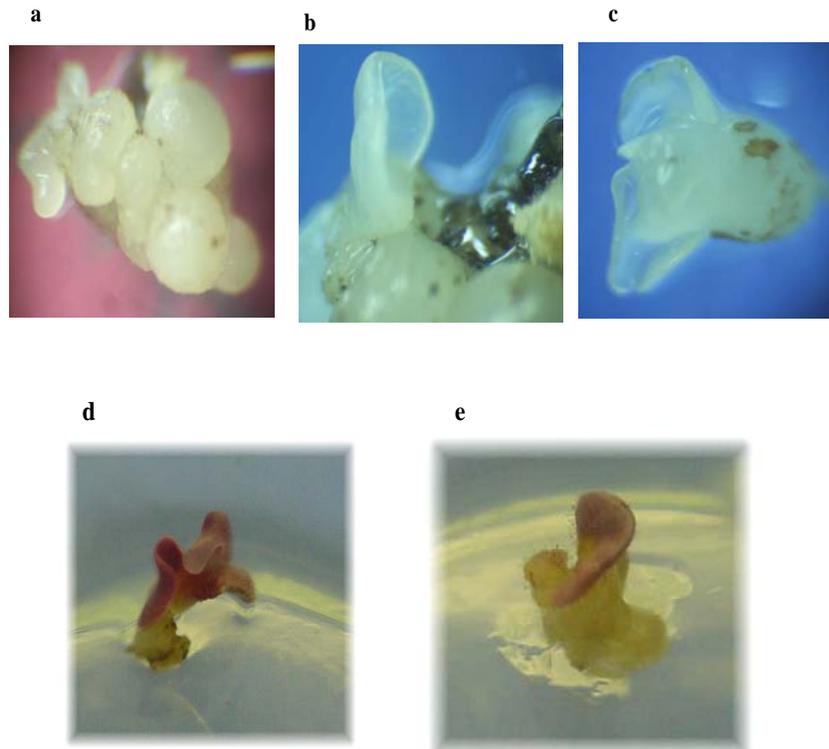


FIGURA 1. a) Embriones somáticos globulares; b y c) Embriones somáticos en fase cotiledonar; d y e) Embriones somáticos cotiledonares bajo condiciones de fotoperíodo 16/8 horas (luz /oscuridad); Provenientes de estaminoides del genotipo Porcelana (Porc.-UCV).

Se evidenciaron diferencias en la estructura y apariencia del callo. Se observaron callos de aspecto más uniforme en la concentración de 60 gr l⁻¹ de sacarosa, en comparación con las otras concentraciones donde los callos, para ambos genotipos, presentaban porciones hídricas y compactas. La mayoría de los callos fueron de apariencia friable y color crema; sin embargo, se pudo observar callos hiperhídricos en los tratamientos que contenían las sales básicas de MS y altas concentraciones de 2,4-D.

CUADRO 3. Porcentaje de inducción de callos y ES a partir de embriones cigóticos inmaduros en los genotipos OC-61 y OC-77.

Tratamiento	% Callos		% Embriones		N. ES/Cotiledón	
	OC-61	OC-77	OC-61	OC-77	OC-61	OC-77
T ₁	60 ab	60 ab	30	20	1,8	1,2
T ₂	70 ab	60 ab	20	30	1,4	1,8
T ₃	70 ab	80 ab	30	30	2,1	2,4
T ₄	70 ab	70 ab	ne	ne	0	0
MS T ₅	60 ab	40 ab	ne	ne	0	0
T ₆	60 ab	60 ab	ne	ne	0	0
T ₇	70 ab	70 ab	ne	ne	0	0
T ₈	10 b	10 b	ne	ne	0	0
T ₉	10 b	20 ab	ne	ne	0	0
T ₁₀	60 ab	50 ab	50	20	2,5	1
T ₁₁	70 ab	70 ab	50	30	3,5	2,1
T ₁₂	80 a	90 a	50	30	4	2,7
T ₁₃	50 ab	20 b	80	90	4	1,8
DKW T ₁₄	50 ab	30 ab	70	70	3,5	2,1
T ₁₅	50 ab	30 ab	60	50	3	1,5
T ₁₆	30 ab		30	20	0,9	0,4
T ₁₇	30 ab	20 b	30	20	0,9	0,4
T ₁₈	30 ab	30 ab	30	30	0,9	0,9

Después de 7 d de transferidos los callos de apariencia embriogénica al medio de inducción de embriones, se observaron ES en estado globular (Figuras 2a y 3a) para los dos genotipos evaluados. La diferenciación de los embriones en sus diferentes etapas de desarrollo (corazón, torpedo y cotiledonar) ocurrió a los 14 d después de transferidos al medio básico (Figuras 2b, 2c, 3b y 3c).

Se observaron diferencias entre el porcentaje de ES formados y los medios de inducción; sin embargo, los callos embriogénicos subcultivados en los medios que contenían las sales básicas de MS tendían a necrosarse después de varios subcultivos y finalmente morían, por el contrario, en el medio de DKW y 60 g l⁻¹ de sacarosa, los callos embriogénicos permanecieron friables. Estos resultados coinciden con los encontrados por Li *et al.* (1998), al evaluar distintos tipos de explantes y dos medios de cultivo, señalando una rápida senescencia, necrosis de tejido y de ES formados.

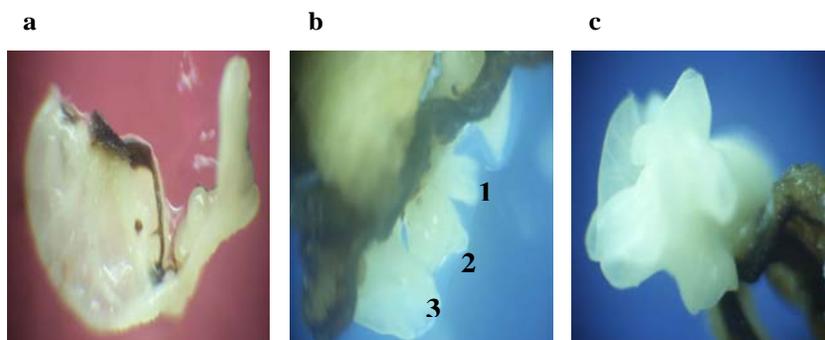


FIGURA 2. a) Embriones somáticos en fase globular; **b.1)** Embrión somático en fase de torpedo; **b.2-3)** Embrión somático en fase cotiledonar temprana y avanzada; **c)** Embriones cotiledonares, algunos con hojas expandidas; Provenientes de embriones cigóticos inmaduros del Genotipo Ocumare-77.

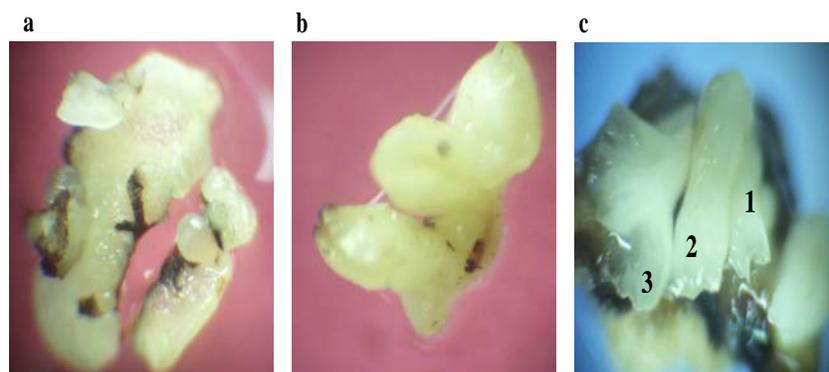


FIGURA 3. a) Embriones somáticos en fase globular; b) Embrión somático en fase acorazonada; c.1) Embrión somático en fase de torpedo temprano; c.2) Embrión somático en fase de torpedo tardío; c.3) Embrión somático en fase cotiledonar; Provenientes de embriones cigóticos inmaduros del genotipo Ocumare-61.

La concentración de calcio, azufre y magnesio aplicada al medio de DKW, juega un papel esencial en el proceso de diferenciación celular de tejidos recalcitrantes como son los de cacao (Pedroso *et al.*, 1996; Li *et al.*, 1998; Tan y Furtek, 2003).

CONCLUSIONES

- Los estaminoides son los explantes que mejores resultados dieron para la inducción de callos embriogénicos en los distintos genotipos, al utilizar una concentración de 80g l⁻¹ sacarosa y 4 mg l⁻¹ 2,4-D. Sin embargo, el genotipo Porc.-UCV fue el único que formó ES en las distintas fases de desarrollo, demostrándose así diferencias entre los genotipos evaluados.
- La concentración de sacarosa (80g l⁻¹) y 2,4-D (4 mg l⁻¹) fue la que indujo una mayor cantidad de callos embriogénicos a partir de cotiledones inmaduros, para los genotipos OC-61 y OC-77. Los genotipos Porc-UCV y CHO-42 no formaron callos.

- Las sales básicas de DKW inducen de manera más eficiente la formación de callos embriogénicos en comparación con el medio que posee las sales básicas de MS.
- No se observó diferencias genotípicas para los cultivares OC-61 y OC-77 en relación con la formación de ES a partir de cotiledones inmaduros.

BIBLIOGRAFÍA

AGUILAR, M. E., V. VILLALOBOS and N. VÁSQUEZ. 1992. Production of cocoa plants (*Theobroma cacao* L.) via micrografting of somatic embryos. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 28:15-19.

ALEMANNI, L., M. BERTHOULY and N. MICHAUX-FERRIÈRE. 1997. A comparison between *Theobroma cacao* L. zygotic embryogenesis and somatic embryogenesis from floral explants. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 33:163-172.

DRIVER, J. A. and A. H. KUNIYUKI. 1984. *In vitro* propagation of paradox walnut rootstock. *Hortsci.* 19:507-509.

ESAN, E. B. 1977. Tissue culture studies on cacao (*Theobroma cacao* L.) A supplementation of current research. **In:** Proc. 5th Int. Cacao Res. Conf. 1975. Ibadan. Cacao Res. Inst. Nigeria: 116-125.

LI, Z., A. TRAORE, S. MAXIMOVA and M. GUILTINAN. 1998. Somatic embryogenesis and plant regeneration from floral explants of cacao (*Theobroma cacao* L.) using Thidiazuron. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 34: 293-299.

LÓPEZ-BAEZ, O., H. BOLLÓN and A. ESKES. 1993. Embriogénese somatique de cacaoyer *Theobroma cacao* L., a partir de pièces florales. *C.R. Acad. Sci. Paris* 316:579-584.

LÓPEZ-BAEZ, O., J. MORENO-MARTÍNEZ y S. PACHECO-RODAS. 2000. Avances en propagación de cacao *Theobroma cacao* L. por embriogénesis somática en México. International Workshop on New Technologies and Cocoa Breeding. Kota Kinabalu, Sabah, Malasia. 163-177 pp.

LOYD, G. and B. McCOWN. 1981. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel *Kalmia latifolia* by use of shoot tip culture. Proc. Int. Plant Prop. Soc. 30:421-427.

MAXIMOVA, S., L. ALEMANO, A. YOUNG, N. FERRIERE, A. TRAORE and M. GUILTINAN. 2002. Efficiency, genotypic variability, and cellular origin of primary and secondary somatic embryogenesis of *Theobroma cacao* L. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 38:252-259.

MURASHIGE, T. and F. A. SKOOG. 1962. Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:473-497.

MURCH, S. J., J. M. VICTOR, S. KRISHNARAJ and P. K. SAXENA. 1999. The role of proline in thidiazuron induce somatic embryogenesis of peanut. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 35:102-105.

PEDROSO, M., R. TAVRES and T. LINO-NETO. 1996. Early events in somatic embryogenesis induction. **In:** Somatic Cell Genetics and Molecular Genetics of Trees. The Netherlands. Kluwer Acad. Publishers. 17-22 pp.

TAN, C. and D. B. FURTEK. 2003. Development of an *in vitro* regeneration system for *Theobroma cacao* L. from mature tissue. *Plant Sci.* 164: 407-412.