

## **EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA PRIMARIA EN TRES HÍBRIDOS PROMISORIOS DE CACAO (*Theobroma cacao* L.).**

**Azpeitia Morales, A.<sup>1\*</sup>, López Baéz, O<sup>2</sup>; López Andrade, P.A.<sup>1</sup> y Mirafuentes Hernández, F.<sup>1</sup>.**

1) Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Campo Experimental Huimanguillo, Km 1 Carretera Huimanguillo- Cárdenas, Tel. 01-91737-503-96. Correo Electrónico: [azpeitia.alfonso@inifap.gob.mx](mailto:azpeitia.alfonso@inifap.gob.mx), 2) Universidad Autónoma de Chiapas, división de agronomía, Huehuetan, Chiapas.

### **RESUMEN**

El presente trabajo reporta la embriogénesis somática primaria en tres híbridos promisorios de cacao a partir de piezas florales. Los resultados muestran que la formación de callos embriogénicos se presentó en un 6.25% y el número máximo de embriones somáticos observados fue de 20 en el híbrido H2 durante 10 semanas de observación.

### **INTRODUCCION**

La moniliasis y escoba de bruja son enfermedades que pueden disminuir la producción de cacao hasta en un 80 %. En la actualidad existe la presencia de la moniliasis en el estado de Chiapas y límites de Tabasco, por lo tanto es inminente su dispersión hacia las zonas cacaoteras de Tabasco en los próximos 3 años, por lo cual es necesario de contar con tecnología para la



propagación *in vitro* de cacao que permita disponer de genotipos mejorados en menor espacio de tiempo. La propagación del cacao se realiza generalmente por la vía sexual o por semillas y también por métodos de reproducción asexual o vegetativa la cual utiliza los métodos de estacas, injertos y acodos (Soto y Herrera, 1985), sin embargo estos métodos son lentos. Con la intención de obtener grandes cantidades de plantas de cualquier especie de alto rendimiento se han venido desarrollando múltiples estudios en cultivo de tejidos, entre ellos destacan los trabajos realizados por Archibald (1954) el cual obtuvo por primera vez la inducción de callos del tejido cambial de cacao usando el medio de White con agua de coco, sin embargo no fue posible obtener la organogénesis. A mediados de los 70's Hall y Collin cultivaron fragmentos de tallos jóvenes en diferentes medios a los que adicionaron substancias reguladoras del crecimiento como kinetina, agua de coco y extractos de jugo de cacao en presencia de diferentes combinaciones de temperatura y luz, sin obtener regeneración de brotes. Posteriormente Passey y Jones (1983) cultivaron ápices y nudos de 0.5 a 1 cm de largo, obtenidos de retoños jóvenes en pleno crecimiento, éstos fueron explantados en un medio de cultivo Murashige Skoog (1962), adicionado con diferentes combinaciones de citocinina y auxinas, obteniendo algunos brotes con hojas de escaso desarrollo. La investigación también se ha enfocado hacia la embriogénesis somática, la cual consiste en el desarrollo de embriones somáticos a partir de un tejido somático como hojas, partes florales o partes de cualquier tejido de la planta, estos embriones somáticos son capaces de crecer y formar plantas completas. Los estudios más relevantes han sido los aportados por López-Báez *et al.* (1993), el cual reporta un protocolo para la regeneración de plantas a partir de embriogénesis somática originada de piezas florales. Posteriormente, Alemanno *et al.* (1996) indica que cuando utilizó el protocolo modificado de López-Báez *et al.* (1993) sólo cinco de 25 genotipos de cacao estudiados produjeron embriones somáticos, mientras el resto no respondieron. Por otra parte, Li *et al.* (1998) generaron embriogénesis somática en 19 genotipos de cacao de los grupos forastero, trinitario y criollo. En la actualidad los resultados más sobresalientes sobre embriogénesis somática en cacao han sido los obtenidos en Brasil y en Francia. El grupo brasileño de investigación dirigido por la Dra. Regina Machado (comunicación personal), dentro de la empresa MARS localizada en Ileheus, Brasil; cuentan con un protocolo reproducible para la producción de plantas de cacao y se encuentran evaluando plantas en campo dentro de sus campos experimentales. Por otra parte, el grupo Francés dirigido por el Dr. Vicent Petiard (Comunicación personal) de la empresa NESTLE tienen hasta la fecha un protocolo para embriogénesis somática en cacao a partir de piezas florales. De acuerdo a los resultados del Dr. Petiard en sus evaluaciones de campo han demostrado que estas plantas poseen fidelidad genética así como mayor producción en comparación a plantas propagadas por métodos tradicionales. Con base a lo anterior, el objetivo de la presente investigación fue inducir la embriogénesis somática primaria en tres híbridos promisorios de cacao a partir de piezas florales.

## MATERIALES Y METODOS

El presente trabajo se desarrolló en los laboratorios de Biotecnología del INIFAP y de la Universidad Autónoma de Chiapas. El material vegetativo utilizado fue procedente de tres híbridos promisorios H1, H2, y H3, para lo cual se utilizó un diseño experimental completamente al azar con 4 repeticiones y cada repetición estuvo formada por 4 cajas petri conteniendo 3 flores (piezas florales disectadas). El medio de cultivo utilizado durante las tres primeras semanas fue el DKW suplementado con 2,4-D en dosis de 2 mgL<sup>-1</sup> y kinetina en 0.25 mgL<sup>-1</sup>. Así mismo se utilizó sacarosa 30 gL<sup>-1</sup> y Gelrite (3 gL<sup>-1</sup>) como agente gelificante. Después de las tres semanas de cultivo, los cultivos fueron cambiados al medio DKW sin fitohormonas. Las variables a medir fueron: a) Porcentaje de callos, b) Porcentaje de callos embriogénicos, y c) Número de embriones somáticos.

## RESULTADOS

(a) Porcentaje de callos (C). A las tres semanas de cultivo, solo muy pocos explantes iniciaron la formación de callo, mientras que después del subcultivo y a la cuarta semana empezó a incrementarse la formación de callos, destacando el híbrido H2 con 90% de formación de C, 85% de formación de C el híbrido H3 y por último el H1 con el 80% de C (Figura 1).

b) Porcentaje de callos embriogénicos. Después de la sexta semana hasta la décima semana de cultivo se empezaron a formar los callos embriogénicos (CE). En estos CE se empezaron a

observar estructuras verdes, diferenciándose de los demás callos, los cuales permanecieron de color café claro hasta café oscuro. El porcentaje total de los callos embriogénicos observados fue de 6.25% en estos tres híbridos de cacao (Figura 1)

c) Número de embriones somáticos. El número de embriones somáticos (ES) observado fue variable entre callos embriogénicos y entre híbridos, destacando el híbrido H2 con 20 ES, con 15 ES el H3 y el menos responsivo fue el H1 con solo 13.75 ES/CE (Figura 2)

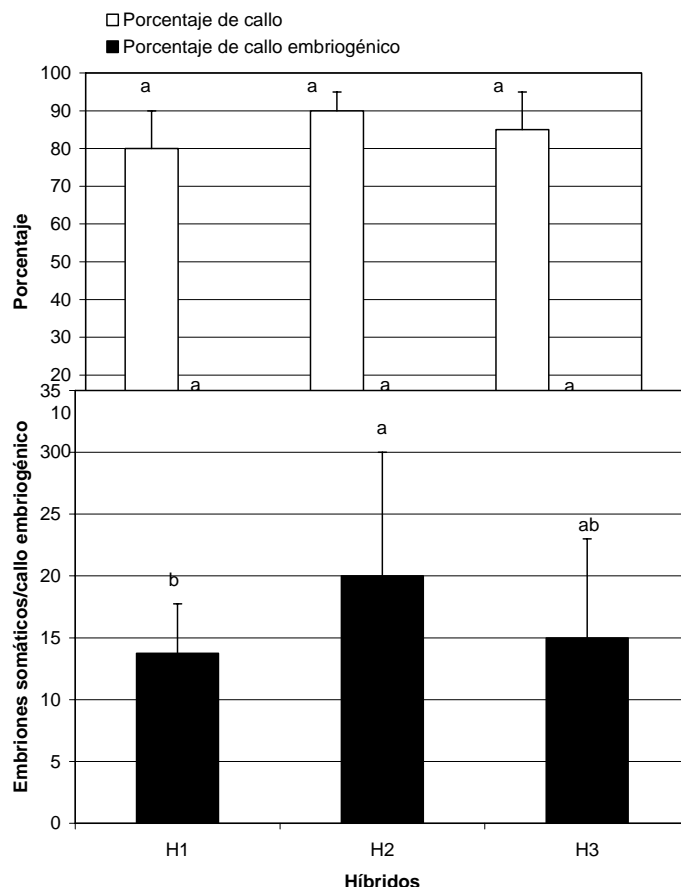
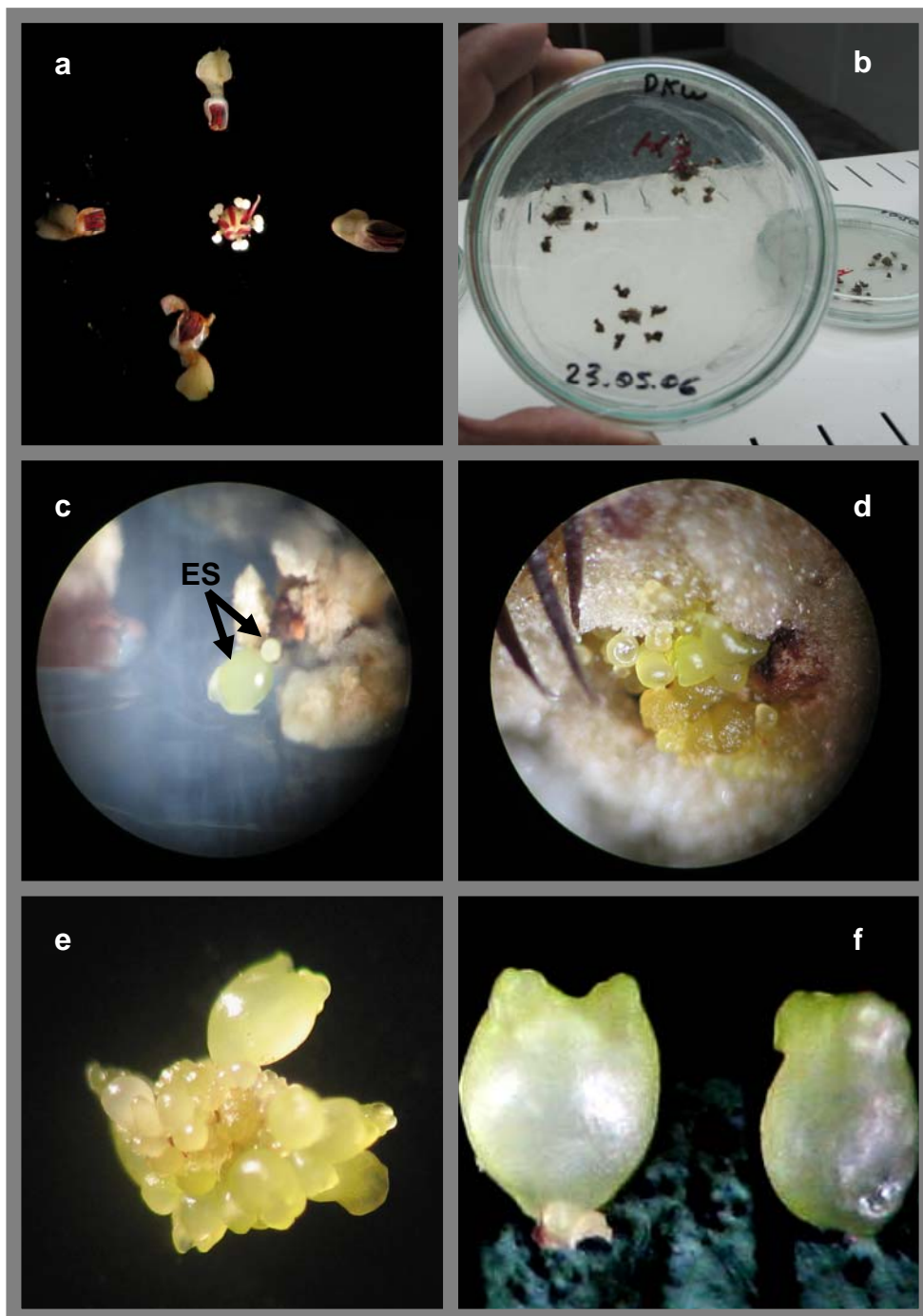


Figura 2. Número de embriones somáticos / callos embriogénico después de la decima semana de cultivo observados en tres híbridos promisorios de cacao (los valores con la misma letra son iguales estadísticamente, Tukey 0.05)

## DISCUSION

En este estudio fue evidente el potencial embriogénico de las piezas florales, tal como ha sido reportado previamente (Sondahl et al. 1992, López-Báez et al. 1993), ya que en los tres híbridos evaluados fue posible observar la formación de callos embriogénicos y embriones somáticos (Figura 3). López-Báez et al. (1993) menciona que es variable la respuesta embriogénica entre genotipos pudiendo ser de 1% hasta 18.7%, en este estudio el porcentaje de callos embriogénicos obtenido en estos híbridos fue del orden del 6%, que aunque es baja, es factible incrementar este porcentaje ya que se utilizó solamente un nivel constante de las fitohormonas. Actualmente se tienen experimentos para incrementar los porcentajes de callos embriogénicos e inducir embriogénesis somática secundaria para que permita incrementar la producción de embriones somáticos y por consiguiente obtener un mayor número de plantas regeneradas por esta vía para hacer posible la propagación de híbridos o variedades mexicanas altamente productivas.



**Figura 3.** Embriogénesis somática primaria en cacao. (a) Explantes obtenidos de una pieza floral de cacao cultivados *in vitro*. (b) Iniciación de callos en explantes florales de cacao. (c) Embriones somáticos (ES) desarrollados después de 5 semanas de cultivo bajo condiciones *in vitro*. (d) Grupo de ES originados en un callo. (e) Grupo de ES separados del callo. (f) ES individualizados.



XIX REUNIÓN CIENTÍFICA-TECNOLÓGICA FORESTAL Y AGROPECUARIA TABASCO'2006  
16 y 17 de noviembre del 2006, Villahermosa, Tab.

---

---

### CONCLUSIONES

Los híbridos de cacao H1, H2, y H3 responden positivamente a la inducción de embriogénesis somática primaria a partir de piezas florales. Sin embargo, existen diferencias genotípicas que se manifiestan en el número de embriones somáticos producidos, sobresaliendo el híbrido H2 con 20 embriones somáticos por callo embriogénico.

### AGRADECIMIENTOS.

Los autores agradecen el financiamiento parcial a la Fundación Produce Tabasco A.C. para la realización de este trabajo a través del proyecto: Adopción de tecnología para el desarrollo de un protocolo para la propagación *in vitro* de genotipos de cacao tolerantes a moniliasis y escoba de bruja.

### LITERATURA CITADA

- Alemanno, L., M. Berthouly and N. M. Michaux-Ferriere. 1996.** Histology of somatic embryogenesis from floral tissues cocoa. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 46: 187-194.
- Archivald, J.F. 1954.** Culture in vitro of cambial tissue of cacao. *Nature*, 173: 351-352.
- Hall, T.R. and Collin H.A. 1975.** Initiation and growth of tissue cultures of *Theobroma cacao* L. *Annals of botany* 39: 555-570.
- Murashige, T; Skoog, F. 1962.** A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiol. Plant.* 15:473-497.
- Li, Z ; Abdoulaye, T ; Maximova, S ; Guiltinan, M. 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-Báez, O; Bollon, H; Eskes, A; Pétiard, V. 1993.** Embryogénese Somatique de cacaoyer (*Theobroma cacao* L.) à partir de Pièces Florales. *Compte-Rendus de L'Académie de Sciences* 316:579-584.
- Passey, A; Jones, O. 1983.** Shoot Proliferation and Rooting in vitro of *Theobroma cacao* L. Type Amelonado. *Journal of Horticultural Science.* 58(4): 589-592.
- Sondahl, M. R., Liu S., Bellato C. M., Bragin A. 1992.** Caçõ somatic embryogenesis from non-sexual tissue. In *Biotechnology for crop improvement in Latin America.* Caracas; Venezuela. Abstract Book CTR 37.
- Soto, J; Herrera, S. 1985.** Propagación. In SARH. Manual sobre el Cultivo del Cacao. Tapachula, Chiapas, México. P 38-49.