

EFFECTO DEL pH, LA LUZ Y LA CONCENTRACIÓN DE SACAROSA EN LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA DE CACAO (*Theobroma cacao L.*)

Lisette Valverde Cerdas

INISEFOR, Universidad Nacional, Heredia, Costa Rica

Víctor Ml. Villalobos

CINVESTAV, Unidad de Irapuato, México

RESUMEN

Se llevó a cabo una investigación con el fin de establecer la metodología adecuada para inducir embriogénesis somática en cacao, a partir de semillas maduras. Se estudió el efecto del pH, la luz y la concentración de sacarosa sobre la respuesta embriogénica. Los dos cultivares mostraron diferente respuesta morfológica y en ambos, estuvo influenciada por el pH, la luz y la concentración de sacarosa. La mejor respuesta embriogénica se obtuvo con un pH de 6,7. El número de embriones producidos fue mayor bajo condiciones de oscuridad que en presencia de luz. La formación de callo y la diferenciación de embriones somáticos estuvo directamente influenciada por la concentración de azúcar en el medio de cultivo. La mayor cantidad de embriones se obtuvo con niveles de sacarosa entre 4% y 6% para el híbrido UF-613xIMC-67 y niveles entre 2% y 4% de sacarosa para el cultivar CATIE-1000. Se presentó una embriogénesis somática directa. Los resultados obtenidos sugieren la necesidad de continuar realizando estudios con esta especie.

ABSTRACT

These responses were influenced by pH, light and sucrose. Gain in fresh weight was optimum at pH 6.7, after which a decrease was evident. The effect of light was different for both cultivars with the number of embryos being higher under dark

conditions. Formation of callus and differentiation of somatic embryos were directly influenced by the concentration of sucrose. The greatest amount of embryos was obtained with 6% sucrose for cultivar UF-613xIMC-67 and 4% sucrose for cultivar CATIE-1000. Direct somatic embryogenesis was observed. The present work suggests that modifications are required when tissue culture protocols for somatic embryos are applied to tropical crops like cacao.

INTRODUCCION

Los componentes del medio de cultivo, los factores físicos y sus interacciones con los tejidos cultivados, influyen sobre la capacidad de los explantes para disparar las rutas morfológicas (VILLALOBOS *et al.* 1985). Aunque existe mucha literatura al respecto, la mayoría de los estudios se han hecho con especies de clima templado y de ciclo de vida corto. Como consecuencia, cuando se aplican estos protocolos de cultivo de tejidos a las especies tropicales, se obtienen resultados inesperados (VILLALOBOS 1989). Un buen ejemplo son las experiencias que se han tenido con la embriogénesis somática de cacao (*Theobroma cacao L.*).

Varios investigadores, han usado el medio de cultivo y las condiciones físicas desarrolladas para especies de clima templado con el fin de inducir

embriogénesis somática en cacao (ADU-AMPO-MAH *et al.* 1988, KONOCOWICZ *et al.* 1983, NOVAK *et al.* 1985, PENCE *et al.* 1980). La mayoría obtuvo embriogénesis somática pero el número de embrioides fue limitado y no tuvieron un desarrollo completo. Los avances más recientes en este campo fueron desarrollados por SÖNDAHL *et al.* (1994).

El objetivo de esta investigación fue estudiar el efecto del pH, la luz y la concentración de sacarosa en la embriogénesis somática de cacao a partir de semillas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material experimental y medio de cultivo.

Se utilizaron como explantes semillas de cacao de cinco a seis meses después de la polinización. Se usó el híbrido UF-613xIMC-67 y el cultivar CATIE-1000. Las semillas se lavaron con agua y jabón y se flamearon por 3 min en la campana de flujo laminar. Una vez eliminada la testa de las semillas, éstas se seccionaron en segmentos de aproximadamente 1 cm y se cultivaron en tubos de ensayo conteniendo un medio de cultivo. Se utilizó el medio MS (MURASHIGE y SKOOG 1962) suplementado con 100 mg/L de myo-inositol, 0,5 mg/L de niacina, 3 mg/L de BA, 1 mg/L de ANA, 30 g/L de sacarosa y 7 g/L de agar. Se ajustó el pH con NaOH y HCl antes de la esterilización a 121 °C por min. Los explantes se mantuvieron a 27 ± 1 °C con un fotoperíodo de 16 horas luz y una intensidad lumínica de 3000 lux.

Tratamientos. Para medir el efecto del pH, el medio se ajustó a 4,7 5,7 6,7 7,7 y 8,7. Los explantes se mantuvieron en incubación por 30 días después de los cuales se evaluó la respuesta embriogénica y los cultivos se transfirieron a un medio fresco.

El efecto de la luz se ensayó cultivando 40 explantes de cada cultivar en condiciones de oscuridad por un período de 40 días para el cultivar CATIE-1000 y 70 días para el híbrido UF-613xIMC-67. Después de este período de incubación, los explantes se transfirieron a un medio fresco que contenía duplicada la cantidad de vitaminas, 40 g/L de sacarosa, 2 g/L de caseína hidrolizada y 2 g/L de

glutamina. Para evaluar el efecto de la sacarosa, se estudiaron cinco concentraciones a saber: 2, 4, 6, 8 y 10 %.

Análisis de los datos. Todos los experimentos fueron independientes y se empleó un diseño irrestricto al azar con 20 repeticiones por tratamiento. Se hicieron análisis de varianza y pruebas Tukey para la comparación de medias. Las variables evaluadas fueron: el número total de embriones somáticos, el número promedio de embriones somáticos por explante, el porcentaje de explantes con embriones, la ganancia de peso fresco de los explantes y la ganancia de peso fresco y seco de los callos. Los datos se recolectaron a los 40 días para el genotipo CATIE-1000 y a los 70 días para el híbrido UF-613xIMC-67. La ganancia de peso fresco se expresó en porcentaje.

Estudio histológico. Con el fin de conocer el origen de los embriones somáticos, muestras de explantes con embriones fueron fijadas en una solución de F.A.A. (formalina, ácido acético glacial, etanol y agua destilada) durante la noche. Seguidamente, se deshidrataron a través de una serie de alcohol tert-butílico (T.B.A), se infiltraron en parafina líquida Paraplast-plus por 48 horas y se embecieron en parafina a 54 °C. Los cortes se hicieron con un micrótopo a 8 mm de grosor y se tiñeron usando la técnica de safranina-verde rápido (JOHANSEN 1940).

RESULTADOS

Embriogénesis somática. La diferenciación morfológica presentó diferencias en los dos genotipos de cacao. En el cultivar CATIE-1000, los embriones diferenciados se produjeron después de un período de 24 a 30 días en cultivo. Los embriones se iniciaron como protuberancias que emergieron del tejido que bordeaba las superficies lesionadas y sobre las nervaduras del explante. Fueron primero estructuras esféricas que continuaron creciendo hasta diferenciarse en estructuras alargadas. En muchos casos, estas estructuras permanecieron unidas en la base. Cuando estas estructuras se separaron del tejido y se subcultivaron, se necrosaron. En muy pocos embriones somáticos fue posible observar la presencia de cotiledones, después de los 35 días de cultivo.

Otro tipo de diferenciación se observó con el genotipo UF-613XIMC-67. Después de 70 días de cultivo, se observaron estructuras globulares pequeñas que se diferenciaron en embriones completos cuando se transfirieron a un medio fresco para su crecimiento. Aún cuando éstos lograron crecer y formar un tallo bien definido con cotiledones bien desarrollados, no se logró la formación de raíces ni el desarrollo del primordio foliar. Se observaron algunas anomalías morfológicas como un crecimiento del hipocotilo con cotiledones atrofiados, desarrollo incompleto del embrión y la fusión de embriones. Fue frecuente observar la pigmentación antocianica en los cotiledones y una embriogénesis secundaria en los cotiledones, el primordio foliar y el hipocotilo. La eliminación de los cotiledones del embrión somático indujo en algunos de ellos la formación de hojas.

Efecto del pH. La ganancia de peso fresco de los explantes en el cultivar CATIE-1000 tendió a aumentar con el pH, alcanzándose el máximo de 6,7, después del cual se observó una disminución. Todos los tratamientos evidenciaron la formación de callo. Los explantes que fueron mantenidos en un medio con pH de 5,7 6,7 y 7,7 mostraron la formación de callo, a los 10 días de cultivo, mientras que los niveles extremos de pH mostraron la formación de callo a los 15 días de cultivo. Después de 20 días en cultivo, se observaron masas de callo blanco bien diferenciadas principalmente sobre las superficies de las nervaduras y el hipocotilo. Los explantes

cultivados a bajo pH mostraron la formación de callo sobre el lado del cotiledón en contacto con el medio. Este callo fue blanco-compacto y originó masas de callo más pequeñas claramente visibles. Los explantes cultivados a un pH de 7,7 desarrollaron un callo similar pero que pareció subdividirse en grupos pequeños de masas compactas de forma globular. El pH de 8,7 evidenció un desarrollo menor del callo.

La formación de embriones somáticos se dio en ambos cultivares en todos los niveles de pH, para ambos cultivares. Fue evidente que el híbrido UF-613xIMC-67 mostró una mayor respuesta embriogénica (cuadro 1). A pH de 4,7 7,7 y 8,7, los embriones tendieron a ser más individualizados mientras que a pH de 5,7 y 6,7, éstos tendieron a formarse en grupos.

Efecto de la luz. En ambos cultivares la respuesta embriogénica fue mejor en la oscuridad que en presencia de luz. Según los resultados presentados en el cuadro 2, hubo un mayor número de embriones somáticos que se formaron bajo condiciones de oscuridad (170 embriones en el genotipo híbrido y 18 embriones en el cultivar CATIE-1000). El número promedio de embriones por explante y el número total de explantes con embriones somáticos mostraron diferencias significativas en el genotipo híbrido, siendo mayor en oscuridad que en luz. Aunque no hubo diferencia estadística para el número promedio de embriones por explante en el

Cuadro 1.

Efecto de diferentes niveles de pH sobre explantes cotiledonares de cacao de los genotipos CATIE-1000 y UF-613xIMC-67.

Variable	CATIE-1000					UF-613xIMC-67				
	pH									
	4,7	5,7	6,7	7,7	8,7	4,7	5,7	6,7	7,7	8,7
Porcentaje de explantes con embriones somáticos	34	45	65*	10	10	20	24	28	20	10
Número total de embriones somáticos	11	25*	25*	6,0	3,0	39	48	46	17	2*
Promedio de embriones por explante	1,5	2,7	2,0	3,0	1,5	11	10	8	4	1*

Los datos son de 20 observaciones por tratamiento, después de 40 días en cultivo para el cultivar CATIE-1000 y 70 días para el genotipo híbrido. *Diferencia significativa al 5%.

Cuadro 2.

Efecto de la oscuridad sobre la embriogénesis somática de explantes cotiledonares de cacao de los genotipos CATIE-1000 y UF-613xIMC-67.

Variable	UF-613xIMC-67		CATIE-1000	
	Luz	Oscuridad	Luz	Oscuridad
Número total de explantes con embriones somáticos	5a	44b	25a	20a
Número total de embriones somáticos	15a	170b	10a	18
Número promedio de embriones por explante	7,5a	15,5b	2,0a	4,5a

Los datos son de 40 observaciones por tratamiento después de 40 días de cultivo para el cultivar CATIE 1000 y 70 días para el genotipo híbrido UF-613xIMC-67.

Medias con igual letra en las filas no difieren significativamente entre sí al 5%, según el análisis de varianza y la prueba Tukey.

cultivar CATIE-1000, fue mayor en oscuridad. El desarrollo del embrión fue más lento en condiciones de luz. El cuadro también evidencia la gran respuesta morfogénica del genotipo UF-613xIMC-67 en comparación con el cultivar CATIE-1000. El callo producido en condiciones de oscuridad fue de mayor tamaño y más blanco y compacto que el originado en presencia de luz. Este último, gradualmente fue perdiendo su forma granular hasta necrosar. No obstante, el análisis estadístico de peso fresco y seco del callo, no mostró diferencias significativas ($p > 0,05$) entre los dos tipos de callo.

Efecto de la concentración de sacarosa. En todas las concentraciones de sacarosa evaluadas se observó la formación de embriones somáticos aunque la formación de callo y la diferenciación de los embriones se vio influenciada por la concentración de sacarosa. En el cultivar CATIE-1000, los embriones somáticos diferenciados en un medio con 2%, 4% y 6% de sacarosa tendieron a formarse en grupos (figura 1), así el número total de embriones fue de 30, 34 y 24 respectivamente; mientras que los embriones somáticos formados a 8% y 10% (9 y 3 embriones respectivamente) de sacarosa fueron más individualizados. Estos últimos a su vez, adquirieron un mayor grosor y tamaño presentando una textura más dura y con formas menos definidas (figura 2). En el genotipo UF-613xIMC-67 la mejor respuesta se observó con 4% (81 embriones) y

6% (76 embriones) de sacarosa. En ambos genotipos, los niveles de sacarosa por encima de 6% disminuyeron la inducción de embriones somáticos (cuadro 3). No se observaron diferencias estadísticas significativas ($p > 0,05$) en el peso fresco y

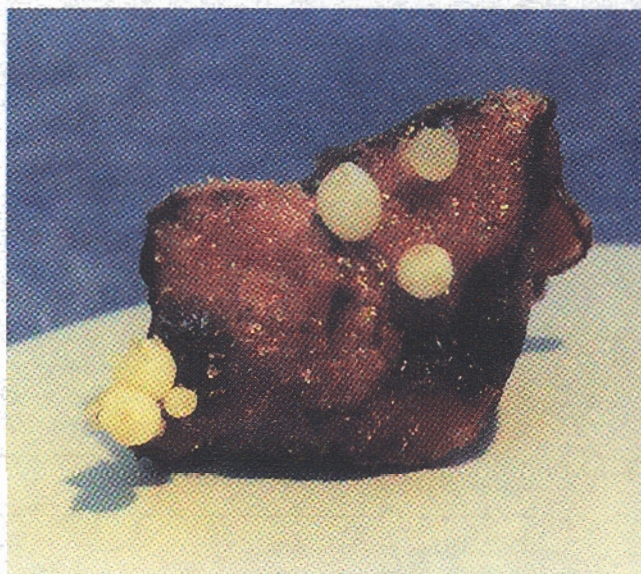


Figura 1. Embriones somáticos del genotipo híbrido UF-613xIMC-67, inducidos en un medio de cultivo MS (1962) con 3 mg/L de BA y 4% de sacarosa.

Cuadro 3.

Efecto de la concentración de sacarosa sobre la embriogénesis somática de explantes cotiledonares de cacao de los genotipos UF-613xIMC-67 y CATIE-1000.

Variable	UF-613xIMC-67					CATIE-1000				
	Concentración de sacarosa (%)									
	2	4	5	8	10	2	4	6	8	10
Porcentaje de explantes con embriones somáticos	22,5	36,5	55*	40	20	40	36,5	37,5	35	10*
Número total de embriones somáticos	23	81*	76*	41	9	30	34	24	9	3*
Número promedio de brotes por explante	5	11	7	5	2*	3,5	4,6	3,2	1,8	1,5

Datos de 20 observaciones por tratamiento, después de 70 días de cultivo para el genotipo híbrido UF-613xIMC-67 y 40 días para el cultivar CATIE-1000.

* Diferencia significativa al 5%.

seco del callo con diferentes concentraciones de sacarosa, excepto en el peso final de los explantes que aumentó hasta una concentración de sacarosa del 6% disminuyendo luego.

Estudio histológico. El estudio de los cortes histológicos mostró que las células epidérmicas o subepidérmicas se dividieron para formar centros de activa división celular. Estas células se caracterizaron por poseer un mayor contenido citoplasmático y núcleos muy visibles. Estos centros meristemáticos dieron origen a los embriones somáticos.

DISCUSIÓN

El presente estudio muestra que la embriogénesis somática de cacao, así como el crecimiento del explante y la formación de callo fueron influenciados por el genotipo y los factores evaluados. Todos los tratamientos de pH permitieron la diferenciación de embriones somáticos. Sin embargo, el crecimiento fue limitado a pH de 4,7 7,7 y 8,7 y el número de embriones somáticos fue mayor a pH de 5,7 y 6,7. A diferentes niveles de pH, la disponibilidad de algunos componentes del medio puede variar y como consecuencia, afectar y limitar la formación de embriones y de callo. De acuerdo con GEORGE y SHERRINGTON (1984), la transferencia de los iones amonio y nitrato está definitivamente influenciada por el pH. Asimismo, la trans-

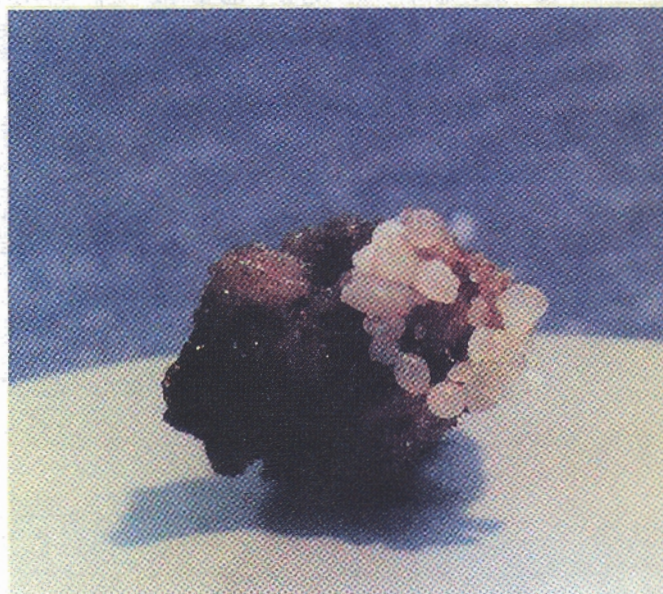


Figura. 2. Embriones somáticos del genotipo híbrido UF-613xIMC-67, inducidos en un medio de cultivo MS con 3 mg/L de BA y 8% de sacarosa.

ferencia y la disponibilidad de otros iones inorgánicos y moléculas orgánicas también pudieron ser afectadas.

Un factor importante en la proliferación de los embriones somáticos fue la presencia de callo

ya que en todos los casos la formación de callo limitó la inducción de embriones. Este problema también fue observado por ADU-AMPOMAH *et al.* (1991), quienes consideraron que una de las mayores limitaciones para producir plantas de cacao usando la embriogénesis somática pudiera ser una fitohormona natural, que promueve una formación excesiva de callo.

Las anormalidades observadas en algunos embriones somáticos, son un patrón común con la embriogénesis somática de otros cultivos. Pueden generarse además embriones de apariencia normal pero incapaces de producir un brote con hojas y tallos. AMMIRATO (1987), menciona que este comportamiento puede obedecer a inconsistencias en la secuencia normal de los eventos que dan origen a la embriogénesis somática como: la división celular, el alargamiento y la diferenciación.

Aunque el número de los embriones somáticos formados en el genotipo CATIE-1000 fue relativamente mayor cuando se cultivaron en oscuridad comparado con el cultivo en luz, su comportamiento fue muy similar en ambas condiciones. Por el contrario, la embriogénesis somática observada en el híbrido UF-613XIMC-67 requirió una incubación de al menos 70 días en oscuridad. En este híbrido, la embriogénesis somática aparentemente se vio inhibida por la presencia de luz. Otras especies también han mostrado la necesidad de un período de oscuridad para inducir los procesos morfológicos (CHANG 1983, CHATUVERDI y MITRA 1974, GLEDDIE *et al.* 1983).

La inducción de embriones somáticos se obtuvo con todas las concentraciones de sacarosa evaluadas. Sin embargo, las concentraciones de 2, 4, y 6% de sacarosa fueron las más favorables para la morfogénesis de cacao, evidenciando un balance adecuado de nutrientes entre el explante y su medio. Esto parece indicar que la concentración de sacarosa es un factor importante en la embriogénesis somática de cacao. La necesidad de una fuente continua de sacarosa para inducir la morfogénesis fue mencionada por TAKAYAMA y MISAWA (1979) y BROWN *et al.* (1979), quienes no observaron diferenciación cuando no se adicionaba sacarosa al medio de cultivo. La embriogénesis somática observada en ambos genotipos fue directa,

sin previa formación de callo y se originó en las células epidérmicas y subepidérmicas.

Finalmente, debemos mencionar que al igual que en otros trabajos, no fue posible desarrollar los embriones somáticos en plantas completas. Esto nos muestra una vez más que el cacao no es una especie fácil de trabajar *in vitro* y que se observan grandes diferencias en la respuesta morfológica aún entre genotipos de la misma especie. Esto claramente indica la necesidad de realizar grandes esfuerzos de investigación en esta especie, incluyendo estudios por genotipos para poder establecer los requerimientos particulares en cada uno de ellos.

REFERENCIAS

- Adu-Ampomah, Y., F.J. Novak, R. Afza, M. Van Duren y M. Perea-Dallos. 1988. Initiation and growth somatic embryos of Cocoa (*Theobroma cacao* L.). *Café Cacao Tea* 32:186-200
- Ammirato, P.V. 1987. Organizational events during somatic embryogenesis. In C.E. Green, D.A. Somers, W.P. Hackett, D.D. Biesboer (Eds.) *Plant tissue and Cell Culture*. Plant Biology vol. 3. Alan R. Liss, Inc., New York. p. 57-81.
- Brown, C.W., W.M. Leung y T.A. Thorpe. 1979. Osmotic requirement for shoot formation in tobacco callus. *Physiol. Plant.* 46:36-41
- Chang, F. 1983. Plant regeneration from *in vitro* from leaf tissue derived from cultured immature embryos of *Zea mays* L. *Plant Cell Rep.* 2:183-185
- Chatuverdi, H.C. y G.C. Mitra. 1974. Clonal propagation by tissue culture. *Exegetics, England*, 707 p.
- George, F.G. y D.P. Sherrington. 1984. *Plant propagation by tissue culture: Handbook and directory of commercial laboratories*. Inglaterra, Exegetics. 177 p.
- Gleddie, S., W. Keller y G. Setterfield. 1983. Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf explants and cell suspension of *Solanum melongena* (eggplant). *Can. J. Bot.* 61:656-666
- Johansen, D.A. 1940. *Plant microtechnique*. Mc Graw-Hill, New York. 523 p.
- Kononowicz, H. y J. Janick. 1983. Response of embryogenesis callus of *Theobroma cacao* L. to gibberelic acid synthesis. *Z. Pflanzenphysiologie* 113:359-366
- Murashige, T. y F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:473-497

- Novak, F.J., B. Donini y G. Owusu. 1985. Somatic embryogenesis and in vitro plant development of cocoa (*Theobroma cacao*). p. 5. In International Symposium on Nuclear Techniques and In Vitro Culture for Plant Improvement. Viena.
- Pence, V.C., P.M. Hasegawa y J. Janick. 1980. Initiation and development of asexual embryos of *Theobroma cacao* in vitro. Z Pflanzenphysiologie 98:1-14
- Sondahl, M.R., Si-Jui LU, C. Bellato, A. Bragin, G. Patterson y D. Stuart. 1994. Recent advances in cacao micropropagation through the production of somatic embryos from non-sexual tissues. p. 79-92. In Advances in Tissue Culture Technology for Improved Planting Material. Proceedings of Biotechnology Conference. Kingston.
- Takayama, S. y M. Misawa. 1979. Differentiation of *Lilium bulboscapes* grown in vitro. Effect of various cultural conditions. Physiol. Plant. 46:184-190
- Villalobos, V.M., M.J. Oliver, T.A. Thorpe y E.C. Yeung. 1985. Cytokinin-induced switch in development in excised cotyledons of *Pinus radiata* cultured in vitro. Physiol. Plant. 61:483-389
- Villalobos, V.M. 1989. Advances in the contribution of tissue culture applied to coffee and cocoa. p. 26-30. In Symposium on Plant Biotechnologies for developing countries. CTA-FAO, Luxembourg.