

EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA: UNA ALTERNATIVA PARA LA PROPAGACIÓN, MEJORAMIENTO Y CONSERVACIÓN DE GERMOPLASMA EN CACAO

J.J. Silva Pupo¹, S. Montes Cruz², L. Acosta Pompa¹, E. Arias³, A. García⁴

1 CENTRO DE ESTUDIOS DE BIOTECNOLOGÍA VEGETAL, UNIVERSIDAD DE GRANMA, CUBA

2 INCA, CUBA

3 ESTACIÓN DE CUARENTENA DE CAFÉ Y CACAO, VELASCO, HOLGUÍN, CUBA

4 IIIA "J. DIMITROV", CUBA

INTRODUCCIÓN

En los últimos 40 años han ocurrido avances en el desarrollo de tecnologías para obtener embriones somáticos de un número cada vez mayor de especies. Tener embriones somáticos disponibles permite destinarlos a programas de mejoramiento o a la propagación a gran escala de genotipos superiores, especialmente en cultivos perennes de alto valor. El uso de la embriogénesis somática para la propagación seguirá aumentando según hayan protocolos más avanzados y refinados capaces de producir embriones morfológicamente normales, sin variación somaclonal y con capacidad para germinar y convertirse en plantas rápida y eficazmente (Parrot, 2002).

El cacao (*Theobroma cacao*) es un árbol que se introdujo de México y América Central en África en 1822 en Santo Tomé y en 1850 en Ghana. El pueblo precolombino de México utilizaba la harina de cacao en la preparación de salsas y los aztecas usaban las semillas como moneda. Después del café y del azúcar, el cacao es la tercera mercancía agrícola exportada en el mundo, representando en 1988 más de 2000 millones de dólares de intercambio comercial (Sasson, 1993).

La embriogénesis somática en cacao fue descrita inicialmente por Esan (1977) y luego por Pence *et al.* (1979). Sin embargo, al igual que en otras técnicas, este cultivo se ha comportado como recalcitrante por los bajos niveles de respuesta que se ha

logrado y por la variabilidad de la misma en cuanto a los diferentes genotipos.

DESARROLLO

Explantos, desinfección e inducción de callos

Según el concepto de la totipotencia celular cualquier tejido puede dar origen a una planta completa, si las condiciones ambientales pueden ser reguladas adecuadamente. En el cacao se han probado diferentes explantes para la inducción del proceso de la embriogénesis somática, de los cuales se ha obtenido la formación de embriones somáticos en cotiledones (Esan, 1977, Pence, 1979) y en hojas (Litz, 1986). Chatelet *et al.* (1992) demostraron las potencialidades embriogénicas de la nucela y el tegumento interno de las habas inmaduras en el medio MS modificado con combinaciones de 2,4-D y BAP. También con el empleo de las nucelas, Figueira y Janick (1993) y Sondahl *et al.* (1993) confirmaron las potencialidades de este explante en la formación de callos y embriones somáticos.

La desinfección de los explantes se ha logrado con el uso del hipoclorito de sodio al 2% durante 20 minutos cuando se ha trabajado con los cotiledones, e hipoclorito de sodio al 1% entre 15 y 20 minutos cuando se han utilizado como explantes pétalos y estaminoides. La inducción de callos se realizó en medio Murashige-Skoog (1962) suplementado con agua de coco, caseína hidrolizada, tiamina y ácido naftalenacético para el caso de los cotiledones, donde además se pudo observar la formación de embriones somáticos con características asincrónicas como se aprecia en la fotografía 1. También se ha obtenido la formación de callos a partir de pétalos y estaminoides en medio MS con combinaciones de ácido 2,4-diclorofenóxiacético y quinetina. Estos explantes son los que mayor importancia tienen para la propagación del cultivo, ya que el cacao por ser una planta alógama los cotiledones llevan implícita una variabilidad natural productora de su cruzamiento, aunque los mismos se pueden emplear cuando se parte de cruzamientos conoci-

dos. En el caso de los pétalos y estaminoides representan a la planta y pueden encontrarse durante casi todo el año en cantidades que oscilan entre 20 y 100 mil flores.

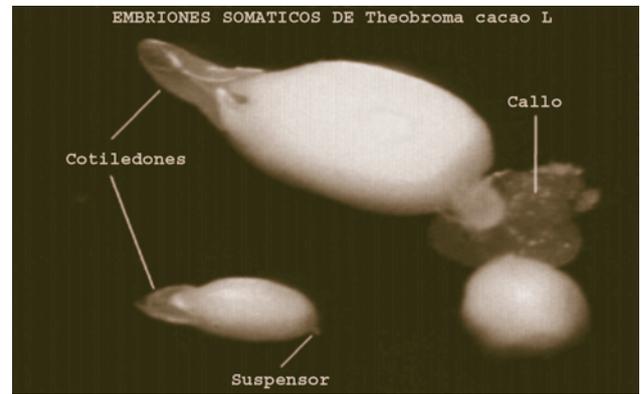


Imagen de un embrión somático de cacao.

Diferenciación de embriones somáticos

Si bien se pueden obtener embriones a partir de cotiledones por vía directa, su cuantía es muy baja, estando en presencia de una embriogénesis de baja frecuencia. Los callos obtenidos de estaminoides han resultado ser los de mayor potencial para la formación de embriones somáticos en medios con las sales MS diluidas a la mitad, suplementada con sacarosa, ácido giberélico, quinetina, ácido naftalenacético y vitaminas en el clon UF-613, como se puede observar en las fotografías 2 y 3. Estos resultados nos indican la posibilidad de obtener embriones somáticos a partir de callos formados de estaminoides en una frecuencia más elevada. Los embriones se encontraban en estados globular, acorazonado y torpedo, lo cual indica un alto grado de asincronía, característica del proceso embriogénico en medio sólido.

Resultados muy importantes en este sentido han sido obtenidos por Li *et al.* (1998) con la utilización del medio Driver Kuniyuki, tidiazurón y glucosa como fuente de sacarosa en la primera parte del proceso. Esos resultados constituyen una de las principales tendencias en las investigaciones de la embriogénesis en cacao en este momento en el mundo.



Foto: Juan J. Silva

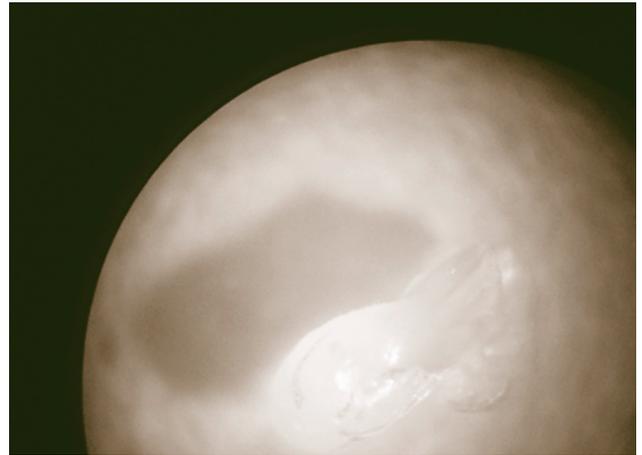


Foto: Juan J. Silva

Embriones somáticos de cacao formados a partir de callo de estaminoides.

Maduración y Conversión en plantas de los embriones somáticos

Una de las cuestiones más importantes en la embriogénesis somática es lograr que los embriones alcancen el grado de madurez necesaria para luego convertirse en plantas. Embriones en estado de torpedo fueron transferidos a medios de maduración que contenían las sales DKW suplementadas con ácido abscísico, sacarosa 6% y la combinación de ambos. Con el tratamiento con sacarosa al 6% se obtuvo un mayor porcentaje de respuesta en el aumento de tamaño de los embriones, cambio de coloración de los cotiledones de blancos a violáceos, lo que indica la acumulación o síntesis de reserva por parte de los embriones, ya que un color similar, primero violáceo y luego púrpura toman los cotiledones de los embriones cigóticos en el proceso de maduración de los frutos. Los embriones somáticos también manifestaron la elongación del hipocotilo, lo cual indica el inicio de la germinación y conversión de los embriones. Luego de transferir los embriones en germinación hasta medios para tal fin se obtuvo la conversión de una parte de ellos hasta un 20%. Sin dudas es esta parte donde se presentan mayores dificultades para completar del método de propagación.



Foto: Juan J. Silva

Imagen de una plántula de cacao formada a partir de los embriones somáticos.



Perspectivas de la embriogénesis somática en el cacao

El principal campo de aplicación de la embriogénesis somática se encuentra en la propagación de genotipos elite seleccionados dentro de una población de árboles en zonas productoras, en la introducción de nuevos genotipos al país y por su elevado potencial de multiplicación en comparación con los métodos tradicionales como el injerto y las estacas enraizadas. Esto no quiere decir que no se utilice de forma combinada los diferentes métodos de propagación en la medida que se van completando los estudios de las diferentes etapas del proceso y en dependencia de los protocolos disponibles para los clones de cacao existente. Una de las particularidades de los resultados presentados aquí es que se trabajaron con los clones de tipo Trinitario, predominantes en Cuba, con respecto a los que se citan en la literatura científica de la temática los que corresponden en mayor grado a clones de tipo Forastero.

Cuando este proceso pueda ser manipulado sin muchas complicaciones favorecerá su aplicación en la selección de nuevos genotipos a través de la aplicación de las técnicas de transformación de plantas, la selección in vitro y el cultivo de anteras y óvulos. También se pudiera emplear este proceso en el estudio y la obtención de los metabolitos que produce el cacao de mucha relevancia para las industrias alimenticias y de cosméticos. Una de las principales aplicaciones está relacionada con el uso de la embriogénesis para el rescate de clones conservados por las técnicas de la crioconservación.

REFERENCIAS

- CHATELET, P., MICHAUW-FERRIERE, N. y DUBLIN, P. 1992. Potentialites embryogénes du nucelle et du tegument interne de graines immatures de cacaoyer (*Theobroma cacao* L.). C. R. Acad. Sci. Paris, t. 315, Serie III, pp. 55-62.
- ESAN, E.B. 1977. Tissue culture studies on cocoa (*Theobroma cacao* L.) A supplementation of current research. En: Proceeding, Fifth International Conference on Cocoa Research Ibadan, Nigeria, pp. 116-125.
- FIGUEIRA, A. y JANICK, J. 1993. Development of nucellar somatic embryo of *Theobroma cacao*. Acta Hort. 336: 231-236.
- LI, Z., TRAORE, A., MAXIMOVA, S. y GUILTINAN, M. 1998. Somatic embryogenesis and plant regeneration from floral explants of cacao (*Theobroma cacao*, L) using thidiazuron. In vitro Cell. Dev. Plant 34: 293-299.
- LITZ, R.E. 1986. Tissue culture studies with *Theobroma cacao*. En: Dimick, P. S. (ed) Cacao Biotechnology Symposium Proceedings. Pennsylvania State University, pp. 111-120.
- LÓPEZ-BAEZ, O., BOLLON, H. y ESQUES, A. 1993. Embryogénesis somática de cacaoyer *Theobroma cacao* L. A partir de piezas florales. C. R. Acad. Sci. París.
- MURASHIGE, T. y SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol. Plant. 15: 473-497.
- PARROT, W. 2002. La embriogénesis somática en las angiospermas. VI Simposio Internacional de Biotecnología Vegetal. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Villa Clara, Cuba. Junio 17-21.
- PENCE, V.C., HASEGAWA, P.M. y JANICK, J. 1979. Asexual embryogenesis in *Theobroma cacao* L. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 104: 145-148.
- SASSON, A. 1993. La Alimentación del Hombre del Mañana. Editorial Reverté, S.A., Barcelona, España.
- SONDAHL, M.R., LIU, S. y BELLATO, C. 1993. Cacao somatic embryogenesis. Acta Hort. 336: 245-248.