

Revista Electrónica Nova Scientia

Embriogénesis somática secundaria en el genotipo de cacao (*Theobroma cacao* L.) inifap 1 y su descripción histológica Somatic secondary embryogenesis in the genotype of cocoa (*Theobroma cocoa* L.) inifap 1 and his histological description

**A. Alejandro-Lázaro¹, A. Azpeitia-Morales², L. Sáenz-
Carbonell³ y F. Mirafuentes Hernández²**

¹Universidad Popular de la Chontalpa, H. Cárdenas, Tabasco

²Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias,
Huimanguillo, Tabasco

³Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C., Mérida, Yucatán

México

Alfonso Azpeitia Morales. E-mail: azpeitia.alfonso@inifap.gob.mx

Resumen

La embriogénesis somática aplicada para la propagación clonal de plantas de cacao, aun es de baja eficiencia, por lo que el objetivo de esta investigación fue evaluar la respuesta de los cotiledones procedentes de embriones somáticos primarios como fuente de explante para inducir embriogénesis somática secundaria (ESS) en presencia de fitohormonas y sin estas en el genotipo de cacao inifap 1, así como describir los eventos de la ESS desde los 30 hasta los 240 días de cultivo. El uso de las fitohormonas ácido 2,4-Diclorofenoxiácetico (2,4-D) y thidiazuron (TDZ) son importantes para inducir la embriogénesis somática (ES) primaria en cacao. Adicionalmente para generar la ESS se han utilizado fitohormonas. En la presente investigación, fueron establecidos cuatro tratamientos con fragmentos de cotiledón, con 2,4-D y TDZ en forma combinada e independiente, incluyendo un testigo sin fitohormonas. Los resultados mostraron, que los fragmentos de cotiledón cultivados sin fitohormonas favorece la ESS, obteniendo un promedio de seis embriones somáticos secundarios (ESs) a los 210 días de cultivo contra uno para el tratamiento suplementado con TDZ. El meristemo apical y radicular se presentó en un periodo de 240 días, se observaron embriones somáticos con estructuras externas como: cotiledones, ápices y raíces. Los resultados mostraron que la exclusión del 2,4-D y el thidiazuron no son importantes para inducir la ESS. El mayor número de ESs se encontró en un medio desprovisto de fitohormonas por lo que esta información es relevante, debido a que los explantes de cotiledones procedentes de embriones somáticos primarios, generan mayor número de ESs en esta especie. Estos resultados constituyen el primer reporte de la inducción de la ESs sin fitohormonas.

Palabras Clave: *Theobroma cacao* L., cacao, embriogénesis somática secundaria, histología

Recepción: 04-09-2014

Aceptación: 04-05-2015

Abstract

Somatic embryogenesis applied for clonal propagation of cocoa plants efficiency is still low, so that the objective of this investigation was to assess the response of the cotyledons from primary somatic embryos as explant source to induce somatic embryogenesis secondary (ESS) in presence of phytohormones and without these, in the cocoa genotype INIFAP 1 as well as describe the events of the ESS from 30 to 240 days of culture. Use of the phytohormones 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and thidiazuron (TDZ), are important for primary somatic embryogenesis in cocoa. In the present investigation four treatments were established with fregment cotyledon, with phytohormones 2,4-D and TDZ in combination and independently, including a control without phytohormones. The results shown indicate that cotyledon fragments cultured without phytohormones favors ESS, obtaining an average of six secondary somatic embryos (ESs) at 210 days of culture against one for the treatment supplemented with TDZ. The apical meristem and radicular appeared in a period of 240 days, somatic embryos were observed by external structures as: cotyledons, apexes and roots. The apical meristem and radicular appeared in a period of 240 days, somatic embryos were observed by external structures as: cotyledons, apexes and roots. The results showed that the exclusion of 2,4-D and the thidiazuron they are not important to induce the ESS. The major number of ESs was found in a medium devoid of fitohormones so this information is relevant, because the cotyledon explants from primary somatic embryos, generate greater number of ESs in this species. These results constitute the first report of the induction of ESs without phytohormones.

Keywords: *Theobroma cacao* L., cocoa, secondary somatic embryogenesis, histology.

Introducción

El cacao es un árbol tropical originario de América y se cultiva en los trópicos húmedos (Lanaud *et al.*, 2009, 361). El fruto es la base para la elaboración del chocolate y sus derivados (Borrone *et al.*, 2007, 236). La propagación del cacao se realiza generalmente por semillas, acodo e injertación (Minyaka *et al.*, 2008, 853). En la actualidad, el desarrollo de un protocolo eficiente por embriogénesis somática (ES) para la propagación clonal de plantas de cacao sería de gran importancia. La ES es el desarrollo de procesos por el cual las células somáticas se reestructuran para generar células embriogénicas (Yang y Zhang, 2010, 36). Las células atraviesan por cambios morfológicos y bioquímicos que dan como resultado la formación de embriones somáticos (ESo) y regeneración de plantas (Komamine *et al.*, 2005, 6).

Los ESo son parecidos a los embriones cigóticos y tienen los mismos estados del desarrollo, sin embargo los ESo no son producto de la fecundación sino de una respuesta de los tejidos de una planta a la inducción de la ES (Yang y Zhang, 2010, 36). Alternativamente, los ESo pueden ser utilizados como explantes para producir ESo adicionales a través de la embriogénesis somática secundaria (ESS) (Vasic *et al.*, 2001, 121). La ESS puede ser repetida varias veces y contribuye a incrementar el rendimiento de la formación del ESo, especialmente en las plantas de baja capacidad embriogénica, por ejemplo, la estimación de la producción de ESo en *Cocos nucifera* L., se puede incrementar en 50 mil veces al utilizar como explantes ESo primarios que generaron callos embriogénicos y que a su vez producen ES secundarios en comparación con la embriogénesis somática primaria (Pérez-Núñez *et al.*, 2006, 37). La ESS también ha sido reportado para ayudar a retener la competencia embriogénica durante prolongados tiempos de cultivo, de hasta 10 años (Martinelli *et al.*, 2001, 279). Por otra parte, los embriones obtenidos a través de la ESS suelen ser más desarrollados que los obtenidos a través de la ES primaria (Pérez-Núñez *et al.*, 2006, 37).

Diversos estudios para el desarrollo de protocolos para la propagación clonal de cacao han sido reportados desde las pasadas seis décadas, pero los resultados más relevantes se han obtenido a través de la ES utilizando diversas fuentes de explante como embriones cigóticos, estaminoides y pétalos, pero aun con baja eficiencia (López-Báez *et al.*, 1993.; Alemanno *et al.*, 1996, Li *et al.*, 1998). A principios de 1990, fue reportada la embriogénesis somática a partir de tejido asexual (de estructuras florales) y la conversión de embriones somáticos a plantas (Lopez-Báez *et al.*, 1993; Sôndahl *et al.*, 1993).

La ES podría representar un método alternativo para la producción de clones de cacao y su inducción es obtenida de tejidos iniciales, principalmente de pétalos y estaminoides. Estos explantes son los que mayor importancia tienen en la actualidad para la propagación *in vitro* del cultivo. Actualmente no se cuenta con un protocolo eficiente para la propagación de cacao por ES, sin embargo, su desarrollo permitirá una rápida multiplicación vegetativa de los genotipos de élite (Minyaka *et al.*, 2004, 853). Los resultados indican que muchos genotipos de cacao son recalcitrantes (Minyaka *et al.*, 2008, 306), mientras que la respuesta a la ES se ve afectado por los genotipos y el medio de cultivo (Tan y Furtek, 2003, 407).

La ES es utilizada para una rápida propagación de plantas, sin embargo, es necesario conocer los aspectos de diferenciación celular y la histogénesis para poder entender mejor la morfogénesis (Yeung, 1999, 137). Los estudios histológicos han auxiliado para mejorar parámetros prácticos como la eficiencia (Saénz *et al.*, 2006, 19). La histogénesis facilita la descripción de procesos que conducen a un tejido a readquirir sus potencialidades embriogénicas y esto puede ser determinado para diferentes tejidos y especies de plantas (González *et al.*, 2005, 37). Por ejemplo, en *Hevea brasiliensis* el tiempo adecuado para el subcultivo fue determinado por procedimientos histológicos (Michaux-Ferriere y Philippe-Carron, 1989, 243). En palma de aceite la formación de ESo a partir de células perivasculares de la hoja ha sido bien documentada (Schwendiman *et al.*, 1988, 43). Así mismo, en palma de coco se han descrito los cambios morfológicos e histológicos de la ES originada a partir de plúmula (Saénz *et al.*, 2006, 19). Pinto *et al.* (2010, 763) analizaron muestras histológicas de *Eucalyptus globulus* procedentes de embriones cigóticos, de embriones somáticos tipo globular y cotiledonar para determinar la acumulación de reservas y su relación con su conversión a plantas.

Para el caso del cacao (*Theobroma cacao* L.) Alemanno *et al.* (1996, 187) realizaron una comparación entre embriones cigóticos de cacao y ESo procedentes de botones florales, ellos encontraron que los ESo carecen de almidón y proteínas de reservas en comparación a los embriones cigóticos. Posteriormente Máximova *et al.* (2002, 252) reportaron cambios morfológicos que ocurren durante la ES primaria y secundaria. Los embriones primarios se presentaron en racimos de células que forman nódulos embrionarios, mientras que los embriones secundarios se formaron de la división de una célula, similar a la embriogénesis cigótica. En cuanto a información sobre la conversión y aclimatación de plantas de cacao, estos son escasos, recientemente Urrea *et al.* (2011, 39) reportan la regeneración del genotipo de cacao Biob,

obtuvieron la conversión a plántula en 68% y 66% de plantas aclimatadas, sin embargo, no menciona el tiempo requerido ni el número de plantas regeneradas en relación a los explantes iniciales.

En los estudios realizados en ESS a partir de explantes de fragmentos de cotiledones, está se ha generado a partir de la inclusión de fitohormonas al medio de cultivo, por lo que en este trabajo el objetivo fue evaluar la respuesta de los cotiledones en presencia de fitohormonas y sin estas con el genotipo inifap 1, así como describir los eventos de la embriogénesis somática secundaria que se presentaron desde los 30 días hasta los 240 de cultivo.

Método

Material vegetativo e inducción de la embriogénesis somática primaria

Fueron colectados botones florales del genotipo inifap1 del banco de germoplasma del inifap en Huimanguillo, Tabasco y trasladados al laboratorio. Estos, fueron desinfectados, con hipoclorito de sodio al 1% por 20 minutos. Adicionalmente, se realizaron tres lavados con agua destilada estéril y al final fueron cultivadas las bases de los pétalos en cajas petri para inducir la ES primaria. El medio de cultivo utilizado fue el PCG (Primary Callus Growth) de acuerdo a Driver y Kuniyuki (1984, 507) suplementado con $5 \mu\text{gL}^{-1}$ de thidiazuron (TDZ) y de 2mgL^{-1} del ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D). Los cultivos se mantuvieron en oscuridad por 14 días a una temperatura de $25 \pm 1^\circ \text{C}$. Después de esta etapa de cultivo, los explantes fueron transferidos a un medio para crecimiento de callos secundarios (SCG), posteriormente continuaron con la formación de callo embriogénico (medio para el desarrollo de embriones [ED4]) (Li *et al.* 1998, 293), desarrollo de embriones somáticos primarios (medio EDL) y de regeneración de plantas (medio PR) (Li *et al.* 1998, 293). Los cultivos se mantuvieron en oscuridad y a una temperatura de $26 \pm 1^\circ \text{C}$, renovando el medio cada 14 días. En la fig. 1 se describen los diferentes medios de cultivo para la formación de la embriogénesis somática primaria y secundaria.

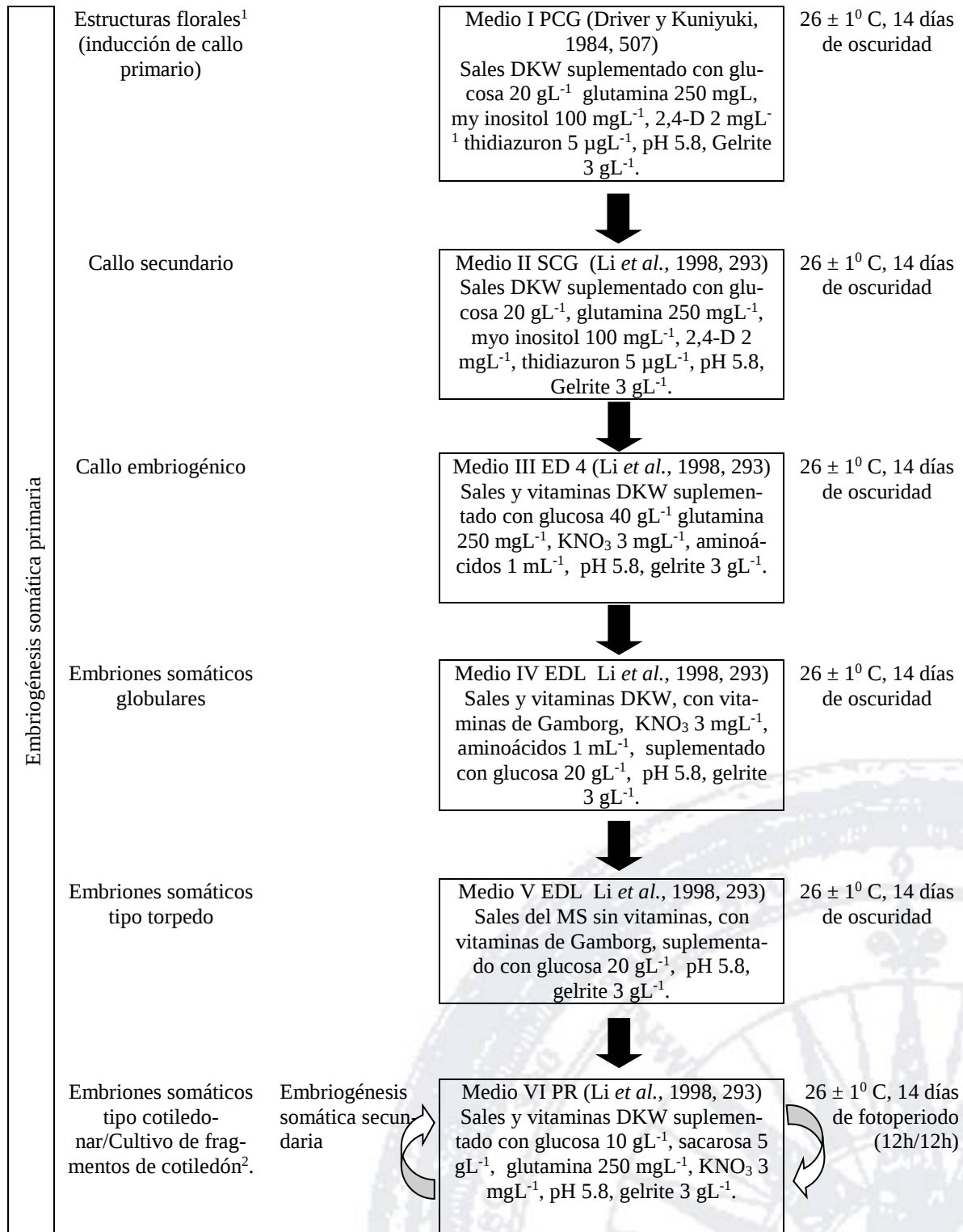


Figura 1. Medios de cultivos utilizados y condiciones de incubación en la ES primaria y secundaria en cacao. En la ESS corresponde a la fase experimental que es presentada en este trabajo. ¹Explantado utilizado para ES primaria y ²secundaria.

Establecimiento de experimento

Los ESo primarios en condiciones *in vitro* formaron cotiledones y a partir de estos, fueron utilizados fragmentos de cotiledones de 5 mm² aproximadamente, procedentes del híbrido inifap 1 generados después de cuatro meses de cultivo. Los fragmentos se cultivaron en un medio básico denominado medio de regeneración de plantas (PR, fig. 1), de acuerdo a Li *et al.*, 1998, 293). Este medio de cultivo fue suplementado con 30 gL⁻¹ de sacarosa, glucosa 5 gL⁻¹, 0.2 gL⁻¹ de nitrato de potasio y 3 gL⁻¹ de Gelrite. Los cultivos procedentes de fragmentos de cotiledón incluyendo fitohormonas, fueron cultivados durante dos semanas en un medio básico PR, después cambiados a medio PR sin fitohormonas. Se establecieron cuatro tratamientos, los cuales se presentan en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Tratamientos realizados con fragmentos de cotiledón procedentes de embriones somáticos primarios generados a partir de pétalos florales.

Tratamiento	Fitohormona	
	Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D, mgL ⁻¹)	Tidiazuron (TDZ, µgL ⁻¹)
1. Testigo	-	-
2.	2	5
3.	2	-
4.	-	5

Estos tratamientos fueron establecidos en un diseño completamente al azar con 20 repeticiones y cada uno establecido en frascos tipo Gerber con cinco fragmentos de cotiledón. Las variables a medir fueron: a) Número de embriones somáticos formados y b) Porcentaje de oxidación. Los resultados se examinaron por medio de un análisis de varianza y prueba de comparación de medias de Tukey (0.05). Solamente se analizaron los valores máximos entre tratamientos durante el periodo de cultivo.

Descripción del proceso histológico

El proceso histológico realizado, fue de acuerdo a Buffard-Morel *et al.* (1992, 735). Para llevar a cabo los cortes histológicos (de 3 micras) se utilizaron muestras con fragmentos de cotiledón cultivados a los 30, 60, 90, 120, 150, 180, 200, 210 y 240 días, procedentes de un medio de cultivo sin fitohormonas. Se utilizaron 10 fragmentos de cotiledón para cada periodo, haciendo

un total de 90 muestras procesadas. Las secciones fueron observadas y fotografiadas en un microscopio Carl Zeiss (Alemania) con cámara digital acoplada.

Resultados y discusión

Número de embriones somáticos secundarios

El mayor número de embriones somáticos generados fue alcanzado a los 210 días en el tratamiento testigo formado por el medio de cultivo desprovisto de fitohormonas, éste fue superior estadísticamente con seis ESs al tratamiento con fitohormonas (2,4-D y thidiazuron) el cual solamente presentó dos ESs a los 120 días (fig. 2).

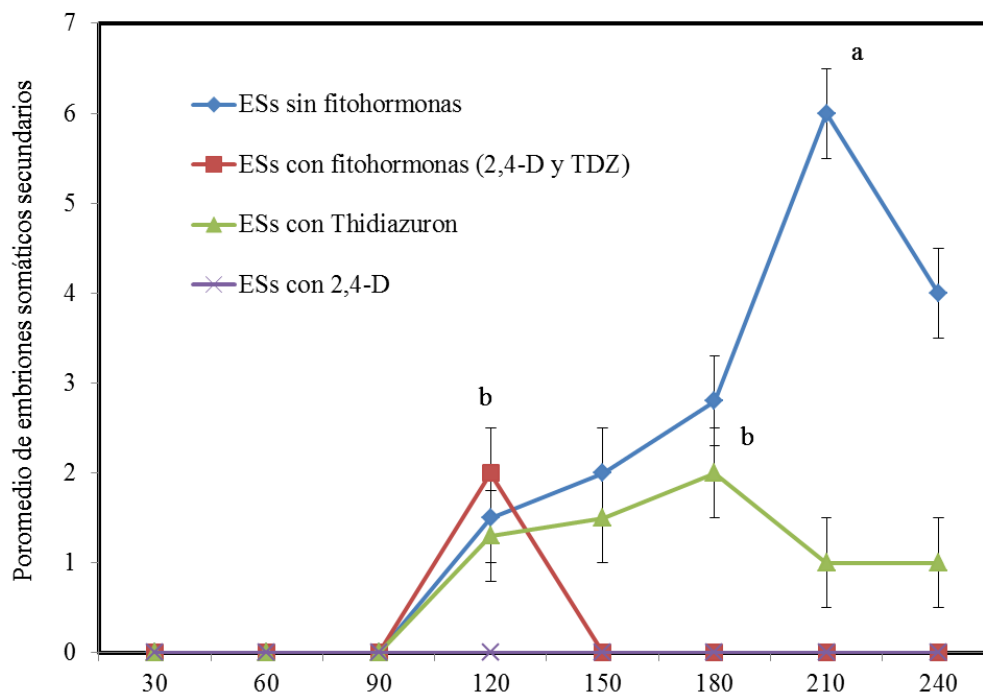


Figura 2. Número promedio de embriones somáticos secundarios que se observaron desde los 30 días hasta los 240 días en fragmentos de cotiledón (n= 20 donde cada repetición se formó con 5 fragmentos de cotiledón). Los valores con la misma letra son iguales estadísticamente (Tukey 0.05).

Para el tratamiento con Thidiazuron, el promedio de ESs fue de uno, mientras que con 2,4-D la formación de ESs fue nula. Las auxinas, son conocidas en mediar la transición de las células somáticas a embriogénicas, estas son los principales agentes para inducir la ES (Jiménez, 2001, 196). En cacao, se ha reportado la ESS pero con inclusión de fitohormonas (2,4-D y kinetina) en

un medio SCG (Young, *et al.*, 2003, 1) durante lapsos cortos de dos semanas. Por otra parte, Solano (2008, 1) reportó la ESS en un medio M21 con la fitohormona 2,4,5-triclorofenoxiacético (2,4,5-T) con cambios a medio fresco cada 30 días hasta la aparición de los embriones somáticos secundarios. En los resultados que se obtuvieron, la ESS fue generada en un medio PR sin fitohormonas. Es conocido que el proceso de la embriogénesis somática se inicia en un medio con altos niveles de auxina, especialmente el 2,4-D, pero los embriones no desarrollan hasta que la concentración de auxinas se reduce (George, 1993, 3). En cereales y palmas se utilizan niveles altos del 2,4-D en el crecimiento de callos (Krikorian, 1995, 774). En el caso de cacao, al cultivar los fragmentos de cotiledón en un medio de cultivo desprovisto de fitohormonas favoreció la formación de ESS. Las células que forman el tejido del cotiledón de un ESo primario son competentes porque continuarán formando ESS. Las células que representan un estado intermedio entre células somáticas y embriogénicas son llamado competente y la competencia celular se asocia con la desdiferenciación de las células somáticas que les permite responder a las nuevas señales de desarrollo (Fehér, 2005, 85). Estas señales son traducidas en una diferenciación del tejido que conduce a la formación de un ESs de cacao.

Porcentaje de oxidación. La oxidación en el tejido afectó a los ESo. En el tratamiento testigo sin fitohormonas fue del 15% a los 210 días de cultivo y de 20% a los 240 días, mientras que con fitohormonas fue del 100% en ambos periodos de cultivo. Con TDZ, el porcentaje fue del 80% al final del experimento, mientras que con 2,4-D, fue del 100% desde los 180 días de cultivo. El obscurecimiento de los tejidos cultivados *in vitro* se define como la oxidación por radicales libres, de diferentes componentes celulares, así como la oxidación de compuestos fenólicos catalizados por la enzima polifenol oxidasa que produce quinonas, las cuales generan daño y muerte celular (Bray *et al.*, 2000, 1158). En este trabajo, el tratamiento a base de fitohormonas, los explantes se oxidaron al 100% a los 210 días, al respecto se ha reportado que cuando se cultivan cotiledones inmaduros de *Arachis hypogaea*, en presencia del 2,4-D, los explantes se oxidan (Baker y Wetzstein, 1994, 361).

Iniciación de la formación de embriones somáticos secundarios. De acuerdo a Minyaka *et al.*, (2008, 853), la ES primaria en cacao comprende tres etapas principales: inducción de callo primario, inducción de callo secundario y desarrollo de embriones somáticos. Sin embargo, la

embriogénesis somática secundaria ha sido poco estudiada. En este estudio, se encontró a los 30 días el inicio del proceso de ESS (fig. 3).

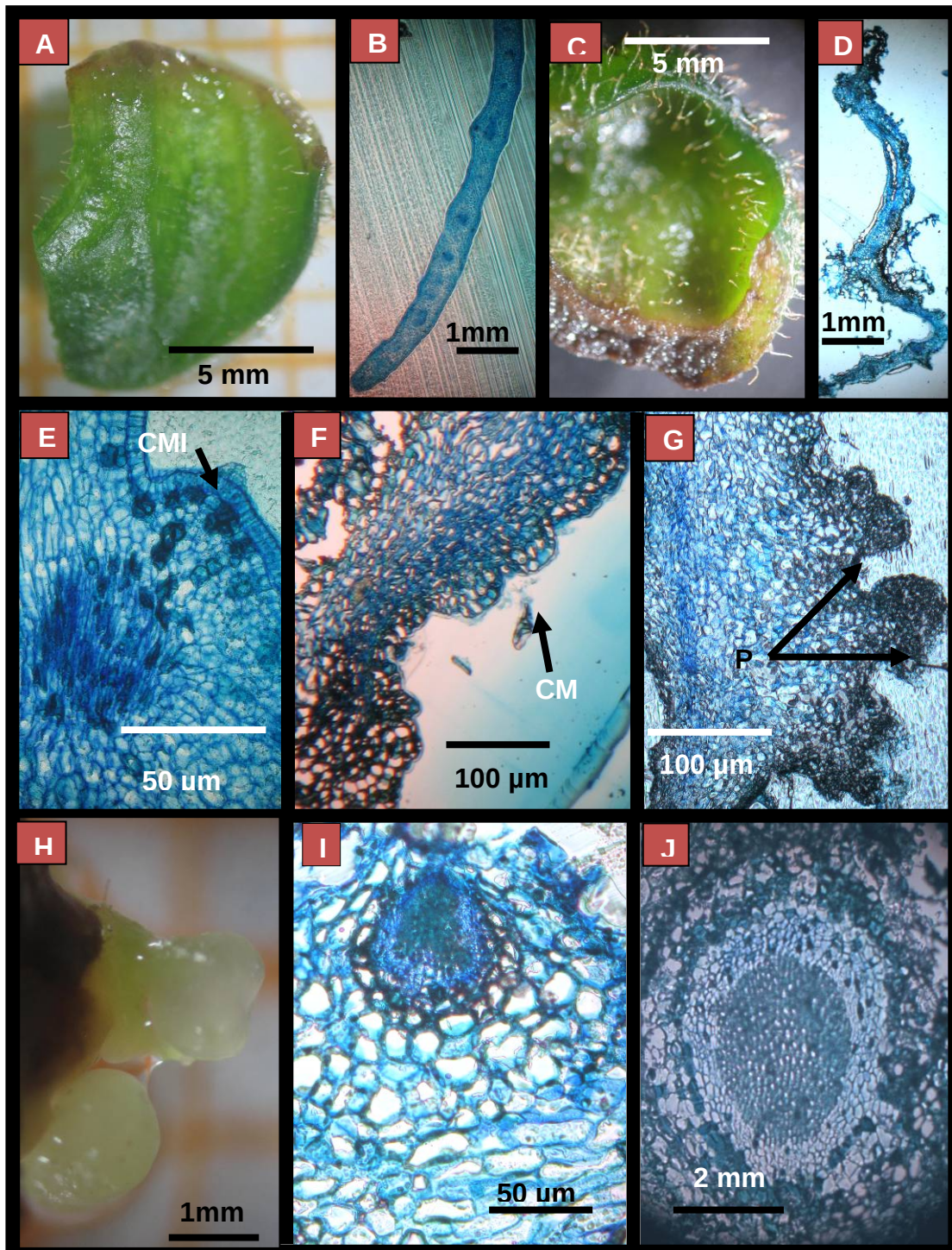


Figura 3. Fragmento de Cotiledón (A); Corte transversal de cotiledón cuando se inició el cultivo (B), Fragmento de cotiledón después de un mes (C), corte transversal de cotiledón después de un mes e inicio de la ES (D)

formación de centros meristemáticos iniciales (CMI [E]). Centros meristemáticos definidos en la periferia del cotiledón (F). Estructuras nodulares que formaron los proembriones (G). Primeros ESs (H) ESo globular definido (I y J).

Observaciones similares han sido realizados en *Solanum tuberosum* L., el cual menciona que la formación de ESo globulares ocurre de divisiones anticlinales (Sharma y Millam, 2004, 115). Los fragmentos de cotiledón cultivados *in vitro* sufrieron cambios en su superficie, engrosando su estructura. A partir de este momento la ESS se inicia con divisiones periclinales en la periferia del cotiledón.

Estas divisiones anticlinales y periclinales dan origen a grupos de células embriogénicas (centros meristemáticos iniciales). Estos centros meristemáticos iniciales (CMI) pueden ser observados a los 60 días (fig. 3E y F).

En el caso de cocotero y palma durazno durante la ES, se ha reportado la formación de nódulos o centros meristemáticos que están dispuestos en la forma de anillos concéntricos con células meristematicas (Sáenz et al., 2006, 19; Simone de Alencar et al., 2010, 263).

Formación de embriones somáticos secundarios

De los CMI se forman los proembriones a los 90 días aproximadamente (fig. 3G). Estos destacan de la periferia del cotiledón. No se observaron embriones somáticos secundarios en 30-90 días de cultivo, posteriormente se observaron estructuras nodulares que dan origen a los embriones globulares en un periodo aproximado de 120 días (fig. 3 H), los cuales muestran una estructura interna bien definida y delimitada con el resto de tejido del cotiledón sin observarse suspensor (fig. 3 I y J). Al respecto es indicado que el suspensor como estructuras ha sido poco reportada (Quiroz-Figueroa et al., 2002, 1141). Estos embriones en su fase inicial se muestran esféricos y conforme desarrollan adquieren una forma elíptica, similares a lo reportado en *Cleome rosea* Vahl (Simões et al., 2010, 679). Las formas elípticas de los embriones somáticos han sido reconocidos como una etapa de transición entre la forma corazón y torpedo (Simões et al., 2010, 679).

Estos embriones somáticos globulares se muestran de color blanco translúcido y en el corte transversal es posible observar sus haces vasculares y protoderma, sin observarse aún el meristemo apical (fig. 4A). Los embriones globulares presentaron un protoderma formado por células que se dividen en el plano anticlinal.

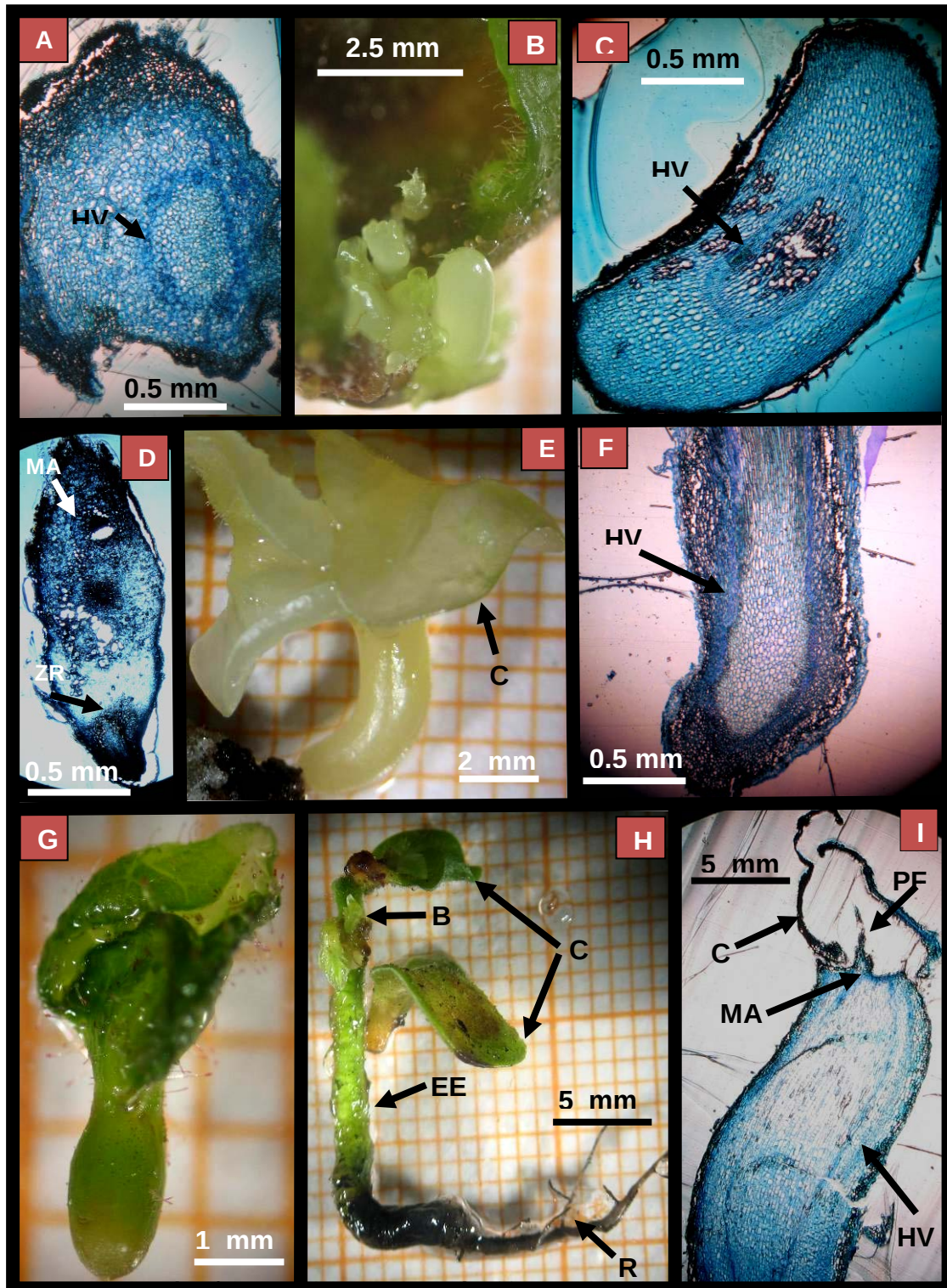


Figura 4. ESo globulares (A). En B se muestran Grupos de ESo bien definidos con haces vasculares (C), Zona de la raíz (ZR) y meristemo apical (MA) en D. (E) ESo con cotiledones (C) y sus haces vasculares se apreciaron bien conformados (HV). ESo verde (G) Planta completa (H), con sus cotiledones, (C) ápice (B) y sistema radicular (R). En el corte longitudinal (I) se muestran sus cotiledones (C) meristemo apical (MA), primordios foliares (PF) y haces vasculares (HV).

Esta observación ha sido reportada en *Solanum tuberosum*, donde el protoderma es considerado como una de las únicas características del desarrollo de los embriones somáticos y que regula los procesos embriogénicos (Sharma y Millam., 2004, 115). La formación de ESo globulares de cacao es de cuatro meses y no se observó el suspensor. En el caso de café, los embriones en la etapa globular fueron observados 7-9 días después de la transferencia a medio de cultivo con 2,4-D en concentración reducida y algunos de ellos presentaron una proliferación de células cerca del tejido de callo, parecida a un suspensor (Quiroz-Figueroa *et al.*, 2002, 1141).

Hasta los 150 días se observó un promedio de 2 embriones somáticos por fragmento de cotiledón (fig. 4) y se identificaron embriones que presentaron cotiledones con haces vasculares bien definidos (Figura 4 D y E), zona de la raíz (ZR) y meristemo apical (MA). Estos resultados coinciden a lo indicado en palma durazno (Simone de Alencar *et al.*, 2010), pero no mencionan el tiempo de cultivo hasta la formación de ESo. Durante este periodo, la formación de embriones somáticos son generados sin presentar sincronización, mostrando diferentes estados del desarrollo, desde globular, torpedo y cotiledonar (Figura 4 C).

A los 180 días (8F) se observaron ES con cotiledones (C) y sus haces vasculares se apreciaron bien conformados (HV). La formación de ESo se incrementó a un promedio de 2.8 ES por fragmento de cotiledón. Los embriones somáticos en condiciones de luminosidad adquieren su color verde a los 210 días de cultivo (fig. 4H) y se cuantificaron seis ES en promedio por fragmento de cotiledón y a los 240 días se desarrolló una planta completa (Figura 4I), con sus cotiledones (C) brote (B) y sistema radicular (R). En el corte longitudinal se muestran sus cotiledones (C) meristemo apical (MA), primordios foliares (PF) y haces vasculares (HV). En este periodo de cultivo se observó una disminución del promedio de ESo de cacao (cuatro ES/fragmento de cotiledón) ocasionado por un proceso de desdiferenciación que conduce a la formación de callo, este proceso ha sido reportado en forma similar en cocotero (Azpeitia *et al.*, 2003, 309).

Después de 240 días de cultivo, se observaron ESo bien definidos con estructuras externas como cotiledones, brote y raíces. En cacao, la ES primaria ocurre de forma indirecta pasando por la formación previa de callo, callo embriogénico y formación de ESo. Sin embargo, la ESS a partir de cotiledones procedentes de embriones somáticos primarios fueron generados de forma directa. En este caso fue posible evidenciar la formación de células embriogénicas agrupadas en centros embriogénicos en medio libre de fitohormonas, muy parecidos a los observados en cocotero (Sáenz *et al.*, 2006, 19) y que posteriormente estos centros meristemáticos se replicaron y proliferaron de forma lenta e indiferenciada. Después, se produjeron divisiones celulares rápidas y sucesivas en distintas zonas del centro meristemático y se conformaron embriones globulares, que al crecer pasan por los estados de corazón y torpedo y tras una fase de maduración y germinación dan origen a plantas completas, resultados similares han sido reportados por Ammirato, (1983, 82).

Se ha reportado previamente la ESS, sin embargo, ha sido inducida por inclusión de fitohormonas al medio (Li, *et al.*, 1998, 293; Máximova *et al.*, 2002, 252). Los resultados mostraron que la exclusión del 2,4-D y el thidiazuron no son importantes para inducir la ESS. El mayor número de ESs se encontró en un medio desprovisto de fitohormonas por lo que esta información es relevante, debido a que los explantes de cotiledones procedentes de ES primarios, generan mayor número de embriones somáticos en esta especie.

Los resultados aquí mostrados, han sido repetidos en cuatro ciclos de ESS iniciando con fragmentos de cotiledon de ESo primario, de donde se han obtenido resultados similares a los reportados en este trabajo con el genotipo inifap 1. Actualmente en el laboratorio, los ESS obtenidos en medio semisólido han sido utilizando para el desarrollo de un sistema de multiplicación de ESS de cacao por inmersión temporal en medio líquido desprovisto de fitohormonas, con resultados alentadores (datos inéditos).

Conclusiones

El mayor número de embriones somáticos fue alcanzado a los 210 días en el tratamiento testigo formado por el medio de cultivo desprovisto de fitohormonas. El tratamiento con fitohormonas (2,4-D y TDZ) solamente presentó dos ESs a los 120 días, mientras que con TDZ mostró un

máximo de 2 ESo a los 180 días y con 2,4-D, la formación de ESs fue inhibida. La oxidación en el tratamiento testigo sin fitohormonas fue del 20% a los 240 días, mientras que el tratamiento con fitohormonas fue del 100% en ambos periodos de cultivo.

El proceso de embriogénesis somática secundaria se inició a los 30 días. A los 60 días se observaron CMI. De estos CMI se formaron los proembriones a los 90 días aproximadamente en la periferia del cotiledón. A los 120 días se observaron estructuras nodulares que dan origen a los embriones globulares. Estos embriones somáticos globulares se muestran de color blanco translúcido y en el corte transversal fue posible observar haces vasculares y protoderma, sin la presencia del meristemo apical. Hasta los 150 días se identificaron haces vasculares bien definidos, zona de la raíz y meristemo apical. A los 180 días se observó ES con cotiledones y con haces vasculares bien conformados. Los Eso en condiciones de luminosidad adquieren su color verde a los 210 días de cultivo. Durante este periodo se cuantificaron seis ES por fragmento de cotiledón y a los 240 días se desarrolló una planta completa.

Los resultados mostraron que la exclusión del 2,4-D y el thidiazuron no son importantes para inducir la ESS. El mayor número de ESs se encontró en un medio desprovisto de fitohormonas por lo que esta información es relevante, debido a que los explantes de cotiledones procedentes de embriones somáticos primarios, generan mayor número de embriones somáticos secundarios en esta especie.

Agradecimientos

Al INIFAP por su financiamiento a través del proyecto N° SIGI 183062116.

Referencias

Alemanno, L. Berthouly M., Michaux-Ferriere N. M. (1996). Histology of somatic embryogenesis from floral tissues cocoa. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 46: 187-194.

Ammirato, P. V. (1983). Embryogenesis. In: D A Evans, W R Sharp, P V Ammirato, Y Yamada (Eds.) Handbook of Plant Cell Culture, Techniques for propagation and breeding, McMillan Publishers Company, U.S.A. 1: 82-123.

Azpeitia, M. A., Sáenz Carbonell L., Chan J. L. y Oropeza Salin C. (2003). Inducción de embriones somáticos en explantes de plúmula de cocotero por ácido abscísico y polietilenglicol. Revista Fitotecnia Mexicana. 26: 309-318.

Baker, C., Wetzstein, H. (1994). Influence of auxin type and concentration on peanut somatic embryogenesis. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 36: 361-368.

Borrone, J. W., Brown S., Kuhn N. D., Motamayor J. R. Schnell. (2007). Microsatellite markers developed from *Theobroma cacao* L. expressed sequence tags. Molecular Ecology. Notes 7: 236–239.

Bray, E., Bailey-Serres J., Weretilnyk E. (2000). Responses to abiotic stresses. In: Buchanan, B; Gruissem, W; Jones, R. eds. Biochemistry and molecular biology of plants, 1158-1203. American Society of Plant Physiologists. Maryland, USA.

Buffard-Morel, J., Verdeil J. L., Pannetier C. (1992). Embryogenèse somatique du cocotier (*Cocos nucifera* L.) à partir d'explants foliaires: étude histologique. Canadian Journal of Botany 70:735-741.

Driver, J. A., Kuniyuki A. H. (1984). *In vitro* propagation of Paradox walnut rootstock. HortScience 19: 507–509.

Fehér, A. (2005). Why Somatic Plant Cells Start to form Embryos? In. Mujib A., Samaj J. (eds). Plant Cell Monographs (2). Somatic Embryogenesis, 85-101, Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

George, F.E. (1993). Plant tissue culture techniques. Edwin George F. (Ed) Plant Propagation by Tissue Culture (part 1) The Technology, 3-36, Exegetics Ltd, Edington, Wilts. BA13 4 QG, England.

González, O. S, Sam O., Hernández M. M., Coronado M. J., Silva J. J. (2005). Caracterización Histológica de la embriogénesis somática a partir de limbos foliares e boniato (*Ipomoea batatas* L. Lam.). Cultivos Tropicales 26: 37-41.

Jiménez V. 2001. Regulation of *in vitro* somatic embryogenesis with emphasis on the role of endogenous hormones. R. Bras. Fisiol. Veg., 13(2):196-223.

Komamine, A., Murata N., Nomura K. (2005). Mechanisms of somatic embryogenesis in carrot suspension cultures-morphology, physiology, biochemistry, and molecular biology. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 41: 6–10.

Krikorian, D. A. 1995. Hormones in tissue culture and micropropagation. In: Peter J. Davis (Ed.) *Plant Hormones. Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*, 774-796 Kluwer Academic Publishers.

Lanaud, C., Fouet O., Clément D., Boccara M., A Risterucci, Surujdeo-Maharaj M. S., Legavre T., Argout X. (2009). A meta-QTL analysis of disease resistance traits of *Theobroma cacao* L. *Mol Breeding* 24:361–374.

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). Embryogénèse Somatique de cacaoyer (*Theobroma cacao* L.) à partir de Pièces Florales. *Compte-Rendus de L'Académie de Sciences* 316:579-584.

Martinelli, L., Candioli E., Costa D., Poletti V., Rascio N. (2001). Morphogenic competence of *Vitis rupestris* S. secondary somatic embryos with a long culture history. *Plant Cell Rep* 20:279–284.

Maximova, S., Alemanno L., Young A., Ferriere N., Traore A., Guiltinan M. (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.

Michaux-Ferrière, N., Marc-Philippe C. (1989). Histology of early somatic embryogenesis in *Hevea brasiliensis*: The importance of the timing of subculturing. *Plant cell, tissue and organ culture* 19: 243-256.

Minyaka, E., Niemenak N., Nankeu D. J., Boudjeko T., Omokolo N. D. (2004). Glutamate dehydrogenase and glutamine synthase activities during somatic embryogenesis in *Theobroma cacao* L. *J Cam Acad Sci* 4:306–313.

Minyaka, E., Niemenak N., Sangare A., Omokolo F. N. D. (2008). Characterization of leafy cotyledon1-like during embryogenesis in *Theobroma cacao* L. *Planta* 227:853–866.

Pérez-Nuñez, M. T., Chan J. L., Sáenz L., Gonzáles T., Verdeil J. L., and Oropeza C. (2006). Improved somatic embryogenesis from *Cocos nucifera* (L) plumule explants. In *Vitro Cell Dev Biol—Plant* 42:37–43.

Pinto, G., Silva S., Neves L., Araujo C., Santos C. (2010). Histocytological changes and reserve accumulation during somatic embryogenesis in *Eucalyptus globules*. *Trees* 24:763–769.

Quiroz-Figueroa, F., C. F. Fuentes-Cerda, Rojas-Herrera R., Loyola-Vargas V. M. (2002). Histological studies on the developmental stages and differentiation of two different somatic embryogenesis systems of *Coffea arabica*. *Plant Cell Rep* 20:1141–1149.

Sáenz, L., Azpeitia A., Chuc-Armendariz B., Verdeil J. L., Hoher V., Oropeza C. (2006). Morphological and Histological Changes during somatic embryo formation from coconut plumule explants. In *vitro Cell Dev Biol-Plant* 42:19-25.

Schwendiman, J., Pannetier C., Michaux-Ferriere N. (1988). Histology of somatic embryogenesis from leaf explants of the oil palm *Elaeis guineensis*. *Ann. Bot.* 62: 43-52.

Sharma, S. K., Millam S. (2004). Somatic embryogenesis in *Solanum tuberosum* L.: a histological examination of key developmental stages. *Plant Cell Rep* 23: 115-119.

Simões, C., Albarello N., Callado C. H., Carvalho de Castro T., Mansur E. (2010). Somatic embryogenesis and plant regeneration from callus Cultures of *Cleome rosea* Vahl. *Braz Arch Biol Technol* 53: 679-686.

Simone de Alencar, M., P. Fermino J. C. P., da Silva R. A., Scherwinski-Pereira J. E. (2010). Morpho-anatomical characterization of embryogenic calluses from immature zygotic embryo of peach palm during somatic embryogenesis. *Acta Scientiarum Agronomy*. 32: 263-267.

Solano, Sánchez, W. (2008). Embriogénesis somática en clones superiores de cacao (*Theobroma cacao* L.) obtenidos en el Programa de Mejoramiento Genético del CATIE. Tesis Mag. Sc. Turrialba, Costa Rica, CATIE.

Sôndahl, M., Liu S., Bellato C., Bragin A. (1993). Cacao Somatic Embryogenesis. *Acta Horticulturae* 336: 245- 248.

Tan, C. L., Furtek D. B. (2003). Development of an in vitro regeneration system for *Theobroma cacao* from mature tissues. *Plant Sci* 164:407–412.

Urrea, A. I. T., Garcés L. A., y Rúa G. A. M. (2011). Regeneración vía embriogénesis somática de una variedad colombiana élite de *Theobroma cacao* L. *Rev. Col. Biotecnol.* XIII: 39-50.

Vasic, D., Alibert G., Skoric D. (2001). Protocols for efficient repetitive and secondary somatic embryogenesis in *Helianthus maximiliani* (Schrader). Plant Cell Rep 20:121–125.

Yang, X., Zhang X. (2010). Regulation of somatic embryogenesis in higher plants. Critical Reviews in Plant Science 29:36–57.

Yeung, E. (1999). The use of histology in the study of plant tissue culture systems some practical comments. In vitro Cell Dev Biol Plant Society for in Vitro Biology 35: 137- 143.

Young, Ann., Miller C., Antunez de Mayolo G., Swanson J.D., Pishak S., S. Maximova and Guiltinan M. (2003). Cacao tissue culture protocol book, 1-32, The Pennsylvania State University.