

Rescate *in vitro* de Embriones Provenientes de Semillas Aplanadas de Cacao (*Theobroma cacao*)¹

T. Palma,* V.M. Villalobos**

ABSTRACT

The aim of this study was to develop a methodology for obtaining embryos from flat-shaped cacao seeds considered as haploids. The hybrids EET 62 x SCA 6 and Pound 7 x UF 613 were used. The behavior of the differentiated embryos allowed determination of an appropriate method for this purpose. Hybrid embryos were cultivated in a Murashige-Skoog medium supplemented with Thiamine-HCl 1 mg l⁻¹, piridoxine-HCl mg⁻¹, nicotinic acid 1 mg l⁻¹, glycine 4 mg l⁻¹, inositol 200 mg l, glutamin 200 mg l, casein hydrolyzate 200 mg l⁻¹, sucrose 4000 mg l⁻¹, and gel rite 1500 mg l⁻¹. The embryos were maintained at 27 ± 2°C with a 16 h photoperiod. The percentage of plantlets that developed varied from 16% to 87%, and plants obtained through this technique totalled 411. Of the developed plantlets, 2% were haploids. Ploidy levels were obtained through chromosome analysis. The growth medium used for embryo rescue was a factor in the morphogenetic capacity of the sexual embryos used in this study.

INTRODUCCION

Los programas de mejoramiento genético de cacao se basan en la producción de híbridos entre los grupos criollo, forastero y trinitario (8). Los híbridos son altamente heterocigotos debido al origen de sus progenitores. Esta heterogeneidad aunada a la incompatibilidad y a un ciclo de reproducción largo, han justificado la búsqueda de plantas homocigotas autocompatibles y vigorosas (6). La identificación y estudio de plantas haploides de cacao y la subsecuente duplicación de su genoma representa la mejor alternativa para la obtención rápida de líneas o genotipos isogénicos, permitiendo acortar el ciclo de selección y obtención de individuos homocigotos.

El interés por los haploides espontáneos en cacao, se inició con Duvlin (4) quien publicó la existencia y las posibilidades de uso de estas plantas con fines de

COMPENDIO

El presente estudio tuvo como objetivo definir la metodología para rescatar embriones provenientes de semillas aplanadas de cacao consideradas como haploides. Para esta investigación se utilizaron los híbridos EET 62 x SCA 6 y POUND-7 x UF-613. El comportamiento de los embriones diferenciados permitió determinar un medio apropiado para el rescate *in vitro* de embriones provenientes de semillas aplanadas. El medio consistió de las sales MS suplementado en mg/l con: tiamina-HCl 1, piridoxina - HCl 1, ácido nicotínico 1, glicina 4, inositol 200, glutamina 200, caseína hidrolizada 200, sacarosa 4 000 y gel rite 1 500. Los embriones fueron incubados a una temperatura de 27 ± 3°C y un fotoperíodo de 16 horas. El porcentaje de plántulas desarrolladas fue muy variable fluctuando de 16 a 87% y el total de plantas obtenidas por esta técnica fue de 411. Los embriones y plántulas desarrolladas mostraron evidencias morfológicas características de plantas haploides existentes en cacao. Posteriormente se verificó el nivel de ploidía en las plantas obtenidas mediante el conteo de cromosomas en hojas jóvenes. El resultado mostró un 2% de plantas haploides. El medio de cultivo empleado para el rescate de embriones influyó en diferentes respuestas mortogénicas, observándose organogénesis y embriogénesis somática en los embriones sexuales cultivados, provenientes de los híbridos estudiados.

mejoramiento. Duvlin (5) trató de establecer una relación entre el porcentaje de haploidía y el carácter aplanado de semillas de cacao, carácter de baja frecuencia entre las semillas normales. Lanaud (8) realizó un análisis enzimático permitiendo demostrar que la mayoría de los haploides de cacao tienen por origen la autofecundación del progenitor hembra. No existen antecedentes sobre la obtención de plantas haploides de cacao aún cuando Adu-Ampomah *et al.* (1) cultivaron anteras para este fin. Más aún la regeneración de plantas de cacao ha sido muy limitada. La presente investigación pretendió estudiar las mejores condiciones *in vitro* que permitieran el rescate eficiente de embriones haploides y el crecimiento *in vitro* de estas plántulas hasta llevarlas a condiciones de suelo.

MATERIALES Y METODOS

El trabajo se realizó en la Unidad de Biotecnología del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza, CATIE, Turrialba, Costa Rica.

¹ Recibido para publicación el 6 de febrero 1990

* Instituto Tecnológico de Cartago

** Programa Mejoramiento de Cultivos Tropicales. CATIE, Turrialba

Medios de cultivo para el rescate de embriones

Se estudió la respuesta en el crecimiento de los ejes embrionales de los híbridos 'EET 62 x SCA-6' y 'POUND-7 x UF-613', utilizando el medio básico de Murashige y Skoog (MS, 1962). Los medios se solidificaron con el gel rite. Se estudiaron siete tratamientos, cinco de los cuales estuvieron constituidos con diferentes concentraciones de caseína hidrolizada y en todos los casos con 200 mg l⁻¹ de glutamina (Cuadro 1). En un segundo experimento se analizaron cuatro tratamientos de glutamina (en mg l⁻¹): 0, 200, 400 y 600 y se mantuvo una concentración constante de 200 mg l⁻¹ de caseína hidrolizada. En forma adicional se probaron tres variantes al medio de cultivo: 1) Sales completas MS; 2) Sales completas MS más agua de coco al 10% y 3) Sales completas MS más 200 mg l⁻¹ de glutamina y 1 000 mg l⁻¹ de caseína hidrolizada.

Previa remoción de la sarcotesta, las semillas se sumergieron en blanqueador comercial al 2.5% de hipoclorito de sodio. A esta solución se le adicionó una o dos gotas de Tween-20 y se agitó durante 15 minutos, luego en una cámara de flujo laminar, las semillas se lavaron tres veces con agua destilada estéril. Posteriormente se aislaron los ejes embrionarios de los cotiledones y se sembraron en los diferentes medios. Los embriones se colocaron en una cámara de crecimiento con un fotoperíodo de 16 horas, una temperatura de 27 ± 2°C durante el día y 23 ± 2°C por la noche. La intensidad lumínica se ajustó a 2 000 lux.

Cuadro 1. Composición de los medios de cultivo utilizados para el primer experimento de rescate de ejes embrionarios en cacao con diferentes concentraciones de caseína hidrolizada.

Medio de cultivo	Caseína hidrolizada mg L ⁻¹ **
1 MS	0
2 MS*	0 + 200 mg/l de glutamina
3 MS	200 + 200 mg/l de glutamina
4 MS	400 + 200 mg/l de glutamina
5 MS	600 + 200 mg/l de glutamina
6 MS	
+ 1 000 mg l ⁻¹ inositol	1 000 + 200 mg/l de glutamina
7 MS	
+ agua de coco al 10%	0

* Los tratamientos 2, 3, 4 y 5 contenían (en mg l⁻¹): 1 de tiamina HCl; 1 de piridoxina; 1 de ácido nicotínico; 4 de glicina y 200 de inositol.

** Todos los medios fueron suplementados con 200 mg/l⁻¹ de glutamina.

El medio que fue seleccionado para el rescate de embriones de semillas aplanadas fue el tratamiento 3 (Cuadro 1). Se emplearon 15 ml de medio de cultivo en tubos de ensayo de 15 cm y 2.5 cm y se mantuvieron en las condiciones descritas anteriormente.

Cuando las plántulas desarrollaron el segundo par de hojas, generalmente después de alcanzar una longitud de 3 a 4 cm de lámina foliar, se transfirieron a un medio MS diluido al 50% donde se mantuvieron durante 15 días. Luego se trasladaron al invernadero bajo riego con nebulizaciones a intervalos de 12 segundos por hora.

Para el conteo de cromosomas se estudiaron ápices del vástago de dos meses de edad, empleando el método de aplastado y usando acetocarmín como colorante, se hicieron análisis citogenéticos de todos los individuos regenerados y al contar los cromosomas en las células de las hojas jóvenes.

Para determinar el medio de cultivo que permitiera el rescate y desarrollo de los embriones provenientes de semillas planas, se utilizó un diseño completamente aleatorio con cuatro repeticiones y 10 embriones por unidad experimental. Las variables medidas en cada embrión fueron las siguientes: porcentaje de sobrevivencia, número de hojas, longitud de la lámina foliar más pecíolo (mm), longitud del epicotilo (mm), longitud del eje hipocotilo-radicular (mm) y número de raíces laterales. Estas variables se cuantificaron cada siete días durante los 35 días que permanecieron en cultivo.

RESULTADOS

Los ejes embrionarios desprovistos de los cotiledones mostraron el mayor crecimiento en un medio MS enriquecido con caseína hidrolizada y glutamina. En los Cuadros 2 y 3 se señalan los parámetros evaluados y la respuesta a los diferentes medios del cultivo. Los resultados obtenidos en los embriones cultivados provenientes de semillas aplanadas de cacao indican que el porcentaje de plántulas desarrolladas fue variable y los valores fluctuaron de 16 a 87%.

Las plántulas haploides se identificaron por características morfológicas y mediante el conteo de cromosomas en hojas jóvenes. Esto permitió identificar nueve plantas haploides equivalente al 2% (Fig. 1B).

Fue evidente la organogénesis y embriogénesis somática en los dos híbridos estudiados en esta investigación. El paso de las plantas al invernadero se realizó a los seis meses posteriores a su germinación, dos meses después se determinó un 7% de pérdidas de

estas plantas por problemas de adaptación a las condiciones de invernadero. El total de plantas transferidas a condiciones de invernadero fue de 411 provenientes, todas ellas, de ejes embrionarios rescatados por la técnica *in vitro* (Fig 1A).

Morfología de los individuos rescatados *in vitro*

Las 411 plantas obtenidas a partir de ejes embrionarios rescatados *in vitro*, fueron analizadas morfológicamente, las características más sobresalientes se destacan a continuación:

Los epicotilos fueron en general desde conspicuos y bien formados hasta ausentes en algunos casos, otros fueron anómalos, curvados, cortos y gruesos, con ramificación simpodial y brinsal y dorsiventrales. El hipocotilo fue normal, aunque algunos presentaban formas anómalas, comprimidos, dorsiventrales, rudimentarios y engrosados. Las radículas evidencia-

ron una variada morfología destacando las delgadas y elongadas, inconspicuas, vestigiales atrofiadas y no visibles; los cotiledones aún cuando estuvieron presentes en la mayoría de los casos, éstos fueron anómalos, peciolados, con folíolos mostrando cinco nervaduras mayores longitudinales, estriadas o acródomas, algunos fueron carnosos, los nudos cotiledonares sin desarrollo. Los protofilos mostraron formas escuamiformes, basales irregulares, asimétricos y aserrados. Las hojas superiores con lámina de borde sinrado lobado, normalizándose después del tercer nudo en dirección acrópeta. Algunas semillas mostraron dos embriones fusionados ontogénicamente en el cuello de la raíz. Otros fueron mal formados, espatulados y amorfos. La mayoría de éstas características fueron cambiando en la medida que las plantas crecían en el invernadero, hasta mostrar, en términos generales tallos y hojas relativamente normales, aún cuando fueron pequeños

DISCUSION

En el presente estudio fue evidente que los embriones provenientes de semillas aplanadas de cacao presentan deformaciones principalmente en los cotiledones, limitando su germinación en condiciones de invernadero. El medio básico (MS) modificado y enriquecido con glutamina (200 mg l^{-1}) y caseína hidrolizada (200 mg l^{-1}) permitió el desarrollo de estos embriones y permitió la obtención de individuos que en condiciones normales difícilmente lograrían desarrollar hasta plantas completas (Figs. 1A y B).

La mayor respuesta de los ejes embrionarios se logró en el medio MS enriquecido con glutamina y caseína hidrolizada (tratamiento 3). En apariencia, se presentó un efecto sinérgico entre estos componentes, ya que cuando se adicionaron en forma separada al medio, la respuesta de los ejes embrionarios fue inferior. La glutamina, por ser una fuente de nitrógeno reducido, parece que funciona como agente de transporte y almacenamiento del nitrógeno (10). Estudios comparativos realizados sobre la utilización de glutamina y aspargina en embriones en forma de torpedo, de 12 especies de plantas, demostró sin excepción el gran efecto promotor que ejerce la glutamina que mostró ser superior en respuesta que la aspargina. La caseína hidrolizada, utilizada para proporcionar al medio una mezcla natural de aminoácidos, para la nutrición nitrogenada tiene además un aparente efecto promotor debido a su alta presión osmótica (13).

El desarrollo de embriones provenientes de semillas planas de cacao, permitió caracterizar diferentes tipos morfológicos que eventualmente podrían correlacionarse con los tipos de haploides existentes en

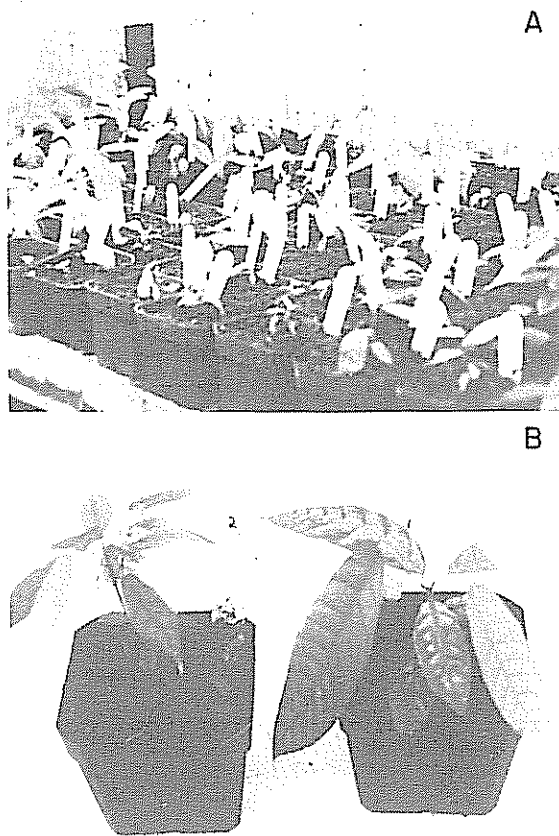


Fig 1. Plantas de cacao obtenidas a partir de embriones rescatados de semillas aplanadas. A. Muestra de las 411 plantas obtenidas de ejes embrionarios germinados *in vitro* y transferidos a suelo seis meses después de la germinación. B. Características morfológicas de una planta haploide (izquierda), comportamiento con una planta diploide normal (derecha)

Cuadro 2. Promedio de las variables: porcentaje de sobrevivencia, longitud del epicotilo, número y longitud de hojas y número de raíces en ejes embrionales de cacao del híbrido EEI-62 X SCA-6 cultivados *in vitro* durante 35 días, en 7 medios de cultivo.

Medio de cultivo	Porcentaje de sobrevivencia	D	Longitud hipoc-raíz (cm) ¹	D	Longitud epicotilo (cm)	D	Número de hoja	D	Longitud hoja (cm) ²	D	Número raíces laterales	D
1 MS	85.0	a	3.9	c	0.2	b	0.5	c	0.6	c	4.4	ab
2 Sales MS ³	75.0	a	4.8	ab	1.3	a	2.6	ab	2.3	b	7.2	ab
3 MS + 200	77.5	a	5.1	a	1.6	a	3.2	a	2.8	a	9.7	a
4 MS + 400	77.5	a	5.0	a	1.3	a	2.2	b	1.9	b	7.8	ab
5 MS + 600	67.5	a	5.0	a	1.5	a	2.5	ab	2.1	b	8.2	ab
6 MX ⁴	77.5	a	5.0	a	0.2	b	0.8	c	0.5	c	6.7	ab
7 MS + AC	77.5	a	4.0	b	0.3	b	0.8	c	0.6	c	4.1	b

1. Prueba Duncan en donde los valores con la misma letra no difieren estadísticamente entre si (P = 0.05).
2. Longitud del peciolo más la lámina foliar
3. Las vitaminas, inositol y sacarosa modificados
4. Se adicionó 1 000 mg l⁻¹ de inositol.

cacao, mediante el conteo cromosómico o el uso de técnicas electroforéticas. Estas respuestas morfológicas posiblemente estaban predeterminadas genéticamente en los ejes embrionarios. Se considera que las condiciones *in vitro* definidas por este estudio no influyeron determinadamente en la expresión morfológica ni genética de los individuos regenerados. Importante es resaltar el hecho de que los medios de cultivo no incluyeron reguladores del crecimiento, evitando así posibles alteraciones genéticas y epigenéticas, principalmente las auxinas.

Lanaud (8) efectuó el rescate de embriones provenientes de semillas aplanadas de cacao en un medio con macroelementos MS diluido en un 50%, microelementos de Heller, Fe EDTA, vitaminas Morel, glu-

cosa al 2% y BA (10⁻⁷ mg l⁻¹); sin embargo el porcentaje de plántulas que sobrevivieron más de tres meses después de transferido al invernadero (67%) fue menor al obtenido en el presente estudio (93%).

Los resultados aquí presentados muestran una gran habilidad morfológica de los embriones inmaduros del cacao. Al respecto, Valverde y Villalobos (15) estudiando pH, luz y concentraciones de sacarosa, demostraron esta habilidad durante la embriogénesis somática del cacao.

El empleo del medio MS modificado y enriquecido con glutamina y caseína hidrolizada permitió la organogénesis en los híbridos estudiados. Esta regeneración de plantas se obtuvo en un medio carente de re-

Cuadro 3. Promedio de las variables: porcentaje de sobrevivencia, longitud hipocotilo-radicular, longitud del epicotilo, longitud y número de hojas y número de raíces en ejes embrionales de cacao del híbrido POUND-7 X UF 613 cultivados *in vitro* durante 35 días, en 7 medios de cultivo.

Medio de cultivo	Porcentaje de sobrevivencia	D	Longitud hipoc-raíz (cm) ¹	D	Longitud epicotilo (cm)	D	Número de hojas	D	Longitud hojas (cm) ²	D	Número raíces	D
1. MS	72.5	ab	5.2	c	0.6	c	1.3	d	0.6	c	6.6	ab
2. Sales MS ³	60.0	bc	5.6	bc	1.1	bc	2.8	c	2.3	b	11.5	a
3. MS + 200	60.0	bc	6.5	ab	1.2	bca	3.0	c	2.5	ab	8.3	ab
4. MS + 400	52.5	c	7.2	a	2.2	a	4.2	ab	3.1	a	5.6	b
5. MS + 600	55.0	c	6.5	ab	1.0	bc	3.3	bc	2.6	ab	6.0	ab
6. MS ⁴	80.0	a	6.0	bc	0.7	bc	2.8	c	0.7	c	4.1	b
7. MS + AC	82.5	a	5.9	bc	1.7	ab	4.5	a	1.3	c	7.6	ab

1. Prueba Duncan en donde los valores promedios con la misma letra no difieren estadísticamente entre si. (P = 0.05)
2. Longitud del peciolo más la lámina foliar
3. Las vitaminas, inositol y sacarosa modificados
4. Se adicionó 1 000 mg l⁻¹ de inositol

guladores de crecimiento, a diferencia de Lanaud (8) quien reportó la regeneración de embriones somáticos a partir de hipocotilo y cotiledones de semillas planas de cacao, en un medio MS modificado y suplementado con BA (10^{-7} mg l⁻¹).

Aún cuando los genotipos estudiados fueron diferentes, posiblemente la presencia de la BA influyó en la sobrevivencia de los embriones

El presente estudio complementa y extiende los resultados obtenidos por Duvlin (5) y Lanaud (8) ya

que ha sido posible definir un medio de cultivo sin reguladores del crecimiento y ha permitido el rescate de embriones de semillas aplanadas las cuales en condiciones normales difícilmente podrían lograr la formación de plantas completas. La relevancia de este estudio radica en dos aspectos fundamentales, el primero está relacionado con el aumento de la base genética del género *Theobroma*, por lo antes referido, y segundo por permitir el rescate de plantas haploides, las cuales aún cuando se encontraron en baja frecuencia (2%) serán de gran utilidad para subsecuentes estudios de cultivo de tejidos y genética molecular.

LITERATURA CITADA

1. ADU-AMPOMAH, F.; NOVAK, J.F.; VAN DURREN, A. 1987. Embrioid and plant production from cultural cocoa explants. In International Cocoa Research Conference (1987, Santo Domingo, R.D.) Proceedings, p 129-136
2. ADU-AMPOMAH, F. 1987. Determination of methodology to obtain shoot tip culture of cocoa. In International Cocoa Research Conference (1987, Santo Domingo, R.D.) Proceedings p 136-142
3. ARCHIBALD, J.F. 1954. Culture *in vitro* of cambial tissue of cocoa. Nature 173:351-352.
4. DUVLIN, P. 1972. Polyembryonic et haploïdie chez *Theobroma cacao* L. Café, Cacao, Thé 16:231-295.
5. DUVLIN, P. 1973. Les "fèves plates" une nouvelle source d'haploïdie chez le cacaoyer (*Theobroma cacao* L.). Café, Cacao, Thé 17:25-36.
6. DUVILIN, P. 1984. Cacao. In Handbook of Plant Cell Culture: Crop Science. Ed. by P.V. Ammirato; D.A. Tuans, W.R. Sharp, Y. Yamada. v.3, p. 541-563.
7. HALL, T.R.H.; COLLINS, H.A. 1975. Initiation and growth of tissue cultures of *Theobroma cacao* L. Annals of Botany 39:555-570.
8. LANAUD, D.L. 1987. Nouvelles données sur la biologie du cacaoyer (*Theobroma cacao* L.) Thèse Docteur d'Etat Paris, France Université de Paris Sud p irr
9. LANAUD, D.L. 1987. Origine génétique des plantes à phénotype maternel issues de croisement intra ou interspécifiques de fèves plates ou de graines polyembryonnées. Chez *Theobroma cacao* L. Café, Cacao, Thé 31:3-14.
10. MULLER, L.; KRIKORIAN, A.D. 1985. Glosario de los términos más frecuentemente empleados en el cultivo de tejidos vegetales. Turrialba, C.R., CATIE. s.p.
11. ORCHARD, J.E.; COLLINS, N.A.; HARDWICK, K. 1979. Culture of shoot apices of *Theobroma cacao* L. Physiologia Plantarum (Denmark) 42:207-210.
12. PASSEY, A.J.; JONES, O.P. 1983. Shoot proliferation and rooting *in vitro* of *Theobroma cacao* L. Type amelonado. Hortscience 58:589-592
13. RAGAAVAN, V.; SRIVASTAVA. 1982. Embryos culture. In Experimental embryology of vascular plants. Ed. by B.M. Johri. New York, Springer Verlag. p 195-320
14. THOMPSON, W.; COLLINGS, G.B.; ISSAC, H.S.; HARDWICK, K. 1987. Isolation of protoplast from *Theobroma cacao* L. In International Cocoa Research Conference (1987, Santo Domingo, R.D.) Proceedings p 623-626
15. VALVERDE, L.; VILLALOBOS, V. 1990. Effect of pH, light and sucrose concentrations for *in vitro* somatic embryogenesis of cocoa (*Theobroma cacao* L.). Turrialba, C.R. (in press).
16. WANG, Y.G.; YANICK, J. 1984. Inducing precocious germination in asexual embryos of cocoa. Hortscience 19(6):839-841.