

EFFECTO DEL TAMAÑO DEL BOTÓN FLORAL SOBRE LA INDUCCIÓN DE EMBRIONES SOMÁTICOS EN CACAO¹

EFFECT OF THE FLOWER BUD LENGTH ON COCOA SOMATIC EMBRYOGENESIS¹

Andy A. Díaz-López*, Rosalía Velásquez Salazar* y Marilú Chirinos*

¹ Trabajo financiado por FUNDACITE-Aragua.

* Profesores. Universidad Central de Venezuela. Facultad de Agronomía (UCV-FAGRO). Instituto de Genética. Apto. 4579. Maracay 2103, estado Aragua. Venezuela. E-mail: andiaz@gmail.com, urdanet2@telcel.net

RESUMEN

Los métodos de propagación tradicionales (sexual y asexual) en el cultivo de cacao, *Theobroma cacao* L., no resultaron ser los más convenientes debido a que se producen plantas con características agronómicas indeseables para los productores. Actualmente, el proceso de embriogénesis somática (ES) pareciera ser la vía más idónea para la regeneración de plantas de cacao de importancia económica, sin embargo, la obtención de ES no es posible para muchos genotipos porque es un cultivo recalcitrante y la inducción está influenciada por muchos factores. En la investigación, se buscó determinar el efecto que tiene la longitud del botón floral (BF) sobre el proceso de inducción de embriones somáticos (IES) a partir de estructuras florales de cacao para los genotipos Ocumare-61, Ocumare-67, Choroní-42 y Choroní-163. Para la inducción de callos (IC) se utilizó el medio de DKW suplementado con TDZ y 2,4-D y 80 g l⁻¹ de sacarosa. Las masas proembriogénicas fueron transferidas a un medio DKW suplementado con diferentes aminoácidos y KNO₃, bajo condiciones de oscuridad y a una temperatura de 27±2 °C a objeto de permitir el desarrollo de los ES y disminuir la necrosis del tejido por efecto de productos fenólicos. Al mes de iniciado el cultivo, se observó una respuesta genotípica sobre la IC, donde la mejor respuesta fue observada en el genotipo OC-61, seguida por OC-67, CHO-42 y CHO-163, siendo este último el que mostró el menor porcentaje de formación de callos (FC) por unidad experimental. Así mismo, se notó una respuesta organogénica, formación de raíces, en todos los genotipos evaluados; no obstante, el porcentaje y número promedio de raíces por explante varió con el genotipo.

Palabras Clave: embriogénesis somática; estaminoides; organogénesis; cacao; *Theobroma cacao* L.

SUMMARY

The traditional propagation methods (sexual and asexual) in the cultivation of Cocoa, *Theobroma cacao* L., have not been the most convenient because plants grow up with undesirable agronomic characteristic by the producers. At present, the somatic embryogenesis seemed to be the most suitable way to produce cocoa plants of economic importance. However, obtaining ES is not possible for many genotypes because it is a recalcitrant crop and induction is influenced by a lot of factors. The objective of this study was determined the effect of the length of the flower bud (BF) has on the induction of cocoa somatic embryos (IES) from floral structure of the genotypes Ocumare-61, Ocumare-67, Choroní-42 and Choroní-163. The callus induction (IC) was achieved by staminodes explants growing in DKW medium supplemented with TDZ, 2,4-D and 80 g l⁻¹ of saccharose. The proembryogenic structures were transferred to DKW medium supplemented with amino acids and KNO₃, under conditions of darkness and 27±2 °C to object of induce the development of somatic embryos and to diminish the necrosis of the tissue by effect of phenolics products. After a month of culture a genotypic response was observed on the induction of callus, the best answer was observed in the genotype OC-61, continued by OC-67, CHO-43 and CHO-163. The last one showed the smallest percentage of formation of callus per experimental unit. An organogenic response was observed, roots formation, in all genotypes evaluated; when these callus were cultivated in a medium for embryos development, the percentage and average number of roots for explante varied with the genotype.

Key Words: organogenesis; somatic embryogenesis; staminodes; *Theobroma cacao* L.

RECIBIDO: marzo 05, 2009

ACEPTADO: agosto 18, 2009

INTRODUCCIÓN

El cacao, *Theobroma cacao* L., es una especie originaria de las regiones tropicales del norte de Sur América, que se cultiva en Venezuela desde la época de la colonia, estimándose que fue en el año 1525 cuando se inició el desarrollo del cultivo. Uno de los principales problemas que presenta, es la alta variabilidad observada en las plantaciones obtenidas por semilla, lo que ha llevado a considerar a la propagación asexual (estacas e injertación) como una vía para mantener la uniformidad de los materiales; no obstante, estos métodos no han resultado ser los más eficientes debido al dimorfismo vegetativo presente en la planta (Cope, 1976; Dublín, 1991; Li *et al.*, 1998; Motamayor *et al.*, 2002).

El cultivo *in vitro* o cultivo de tejidos pudiera representar una alternativa ante esta problemática, es posible lograr plantas completas a partir de pequeñas porciones de tejido vegetal o células, conservándose además las características deseadas. La embriogénesis somática (ES) es un proceso que permite obtener estructuras similares a embriones cigóticos a partir de tejido somático, garantizando una arquitectura dimórfica normal y un sistema radical profundo (Emons, 1994; Maximova *et al.*, 2000). Este proceso está siendo ampliamente utilizado en la propagación de plantas de cacao en el ámbito mundial, logrando la inducción de embriones somáticos (IES) sólo para algunos genotipos a partir de diferentes tipos de explantes como son: pétalos, estaminoides y cotiledones (Salazar *et al.*, 1995; López-Baez *et al.*, 2000; Maximova *et al.*, 2002; Alemanno *et al.*, 2003; Traore *et al.*, 2003).

En Venezuela, Velásquez *et al.* (2006) evaluaron el protocolo de Maximova *et al.* (2002) para conseguir ES en genotipos de importancia económica para el país, para ello, modificaron la cantidad de sucrosa y 2,4-D en el medio de cultivo, reportando que la IES a partir de explantes florales está influenciada por las condiciones del medio de cultivo, el genotipo y el tamaño del botón floral (BF).

En este sentido, la ES en cacao pudiera ser una herramienta para los investigadores del país que buscan el desarrollo de variedades de mejor calidad y mayor resistencia a condiciones ambientales adversas; y una respuesta a la necesidad de los productores que poseen plantaciones con alto número de árboles de avanzada edad, requiriendo de plantas jóvenes y uniformes, con características agronómicas deseables, de buena calidad y que contribuyan a la obtención de mayores rendimientos, los cuales se traduzcan en mejores ingresos y por ende, en una óptima calidad de vida.

MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos del Centro de Investigaciones en Biotecnología Agrícola (CIBA) ubicado en el Instituto de Genética de la Facultad de Agronomía de la Universidad Central de Venezuela. El material vegetal estuvo conformado por botones florales (BF) cerrados de diferentes longitudes (<3 mm, 3-5 mm, 5-6 mm y >6 mm), los cuales fueron tomados de plantas adultas de cacao de 4 genotipos promisorios, a saber: Ocumare-61, Ocumare-67, Choróni-42 y Choróni-163, los cuales se encuentran establecidos en la Estación Experimental del Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA) ubicada en Ocumare de la Costa, estado Aragua.

Los BF se recolectaron en horas de la mañana e inmediatamente se introdujeron en frascos de vidrio con agua fría, luego se colocaron en una cava con hielo para su posterior transporte hasta el laboratorio en donde se sometieron a un shock térmico por 30 min a 5 °C. La desinfección se realizó con una solución de cloro al 20% por 10 min con agitación constante, el exceso de cloro fue eliminado con 3 lavados con agua destilada estéril cada 5 min.

Para la inducción de callos (IC), los estaminoides extraídos de los diferentes botones fueron implantados en un medio de cultivo constituido por las sales DKW (Driver y Kuniyuki, 1984) y suplementado con 22,7 nM TDZ (Thidiazuron), 4 mg l⁻¹ 2,4-D (Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético) y 80 g l⁻¹ de sacarosa, pH ajustado a 5,7 y 2 g l⁻¹ phytigel. En esta fase se utilizó un diseño de bloques al azar con arreglo de tratamiento factorial 4 x 4 (4 genotipos y 4 tamaños de botón), en donde los bloques estuvieron representados por las repeticiones de cada uno de los tratamientos. Por tanto, se utilizaron 40 cápsulas de Petri por tratamiento, para un total de 160 cápsulas para los 4 genotipos (Cuadro 1).

Las condiciones de crecimiento de los explantes fueron de total oscuridad y una temperatura de 27±2 °C. En esta primera fase se realizó evaluaciones de tipo descriptivo de las masas de formación callos (FC; apariencia y color), así como también el porcentaje de explantes de los mismos.

Una vez FC, estos se transfirieron al medio de inducción de embriones de Lloyd y McCown suplementado con 2 mg l⁻¹ 2,4-D, 2,5 mg l⁻¹ kinetina, 50 ml de agua de coco y 80 mg l⁻¹ de sacarosa, manteniendo las mismas condiciones de crecimiento.

CUADRO 1. Diseño de los tratamientos de longitud de los botones florales por genotipo utilizados en la etapa de inducción de callos y formación de raíces partir de los estaminoides.

Tratamientos	Longitud del botón floral (mm)	Genotipo
T1	< 3	Ocumare-61
T2	3 - 5	Ocumare-61
T3	5 - 6	Ocumare-61
T4	> 6	Ocumare-61
T5	< 3	Ocumare-67
T6	3 - 5	Ocumare-67
T7	5 - 6	Ocumare-67
T8	> 6	Ocumare-67
T9	< 3	Choroní-42
T10	3 - 5	Choroní-42
T11	5 - 6	Choroní-42
T12	> 6	Choroní-42
T13	< 3	Choroní-163
T14	3 - 5	Choroní-163
T15	5 - 6	Choroní-163
T16	> 6	Choroní-163

En esta fase, se evaluó la anatomía de los callos para determinar el estado de desarrollo de las masas proembriónicas. Éstas se transfieren a un medio de cultivo constituido por las sales de DKW suplementado con 80 g l⁻¹ de sacarosa, 0,3 g l⁻¹ de KNO₃ y aminoácidos: arginina 0,044 mg l⁻¹, glicina 0,019 mg l⁻¹, leucina 0,033 mg l⁻¹, lisina 0,046 mg l⁻¹ y triptófano 0,051 mg l⁻¹, manteniendo las mismas condiciones de temperatura. Después de 2 semanas en el medio los callos embriónicos (CE) son transferidos a un medio básico de DKW y 80 g l⁻¹ de sacarosa, con una exposición progresiva de luz, hasta llegar a un fotoperíodo 12/12 h luz/oscuridad.

Para el análisis estadístico de todas las variables, se realizó mediante una Prueba de Medias de Duncan, utilizando el programa Statistical Analysis System (SAS) siguiendo la metodología de Santos *et al.* (2005) y una Prueba de Correlación de Spearman, para determinar la asociación entre las variables porcentaje de FC y raíces,

y la longitud del BF utilizando el programa Statistix versión 8.0.

Con el objeto de inducir la diferenciación de los ES a partir de los CE, se le agregó al medio de cultivo 0,5 mg l⁻¹ de BAP y la misma concentración de sacarosa.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Una semana después, los estaminoides fueron implantados en el medio de cultivo, observándose en la gran mayoría de ellos un incremento en el volumen, lo que representa un indicio de respuesta callogénica (Figura 1A). Así mismo, se apreció una incipiente formación de callos (FC) en algunos explantes dependiendo del tamaño del botón floral (BF). Se evidenció callos de color amarillo crema en aquellos estaminodios de mayor tamaño (5-6 mm y >6 mm) y cristalinos en los estaminodios de menor tamaño (<3 mm y 3-5 mm), que presenta además, una apariencia no compacta. (Figuras 1B y 1C).

A los 15 d, se descubren callos en un gran número de explantes, los cuales se mostraron de color blanco cristalino y amarillo crema, friables y de apariencia no compacta, creciendo generalmente en la parte basal del estaminoide (Figuras 1C, 1D y 1E).

La mejor respuesta callogénica para los genotipos y longitud de BF evaluados, la presentó un primer grupo formado por el tratamiento T₂ (OC-61/3-5 mm), observándose una FC en el 100% de los explantes, seguido por los tratamientos T₁, T₆ y T₈ con 92%, y en T₄, T₅, T₇, T₉ y T₁₁ con un 88-80% de FC, los cuales se agruparon en un segundo grupo, por no encontrar diferencias significativas entre ellos. Así mismo, se observó un bajo porcentaje de inducción de callos (IC) en el genotipo CHO-163 para los tratamientos T₁₆, T₁₅ y T₁₃ con 65%, 56% y 20%, respectivamente; formándose así un tercer grupo homogéneo.

De acuerdo con los resultados observados durante la IC, se puede inferir que existe una respuesta dependiente del genotipo y tamaño del BF, la que fue demostrada por la Prueba de Medias de Duncan y la Prueba de Correlación de Spearman, a través de las cuales fue posible determinar 7 grupos homogéneos con diferencias estadísticas marcadas entre ellos y el grado de asociación entre las variables porcentaje de FC y longitud del BF; respectivamente, a un nivel de significación del 5% (Cuadros 2 y 3).

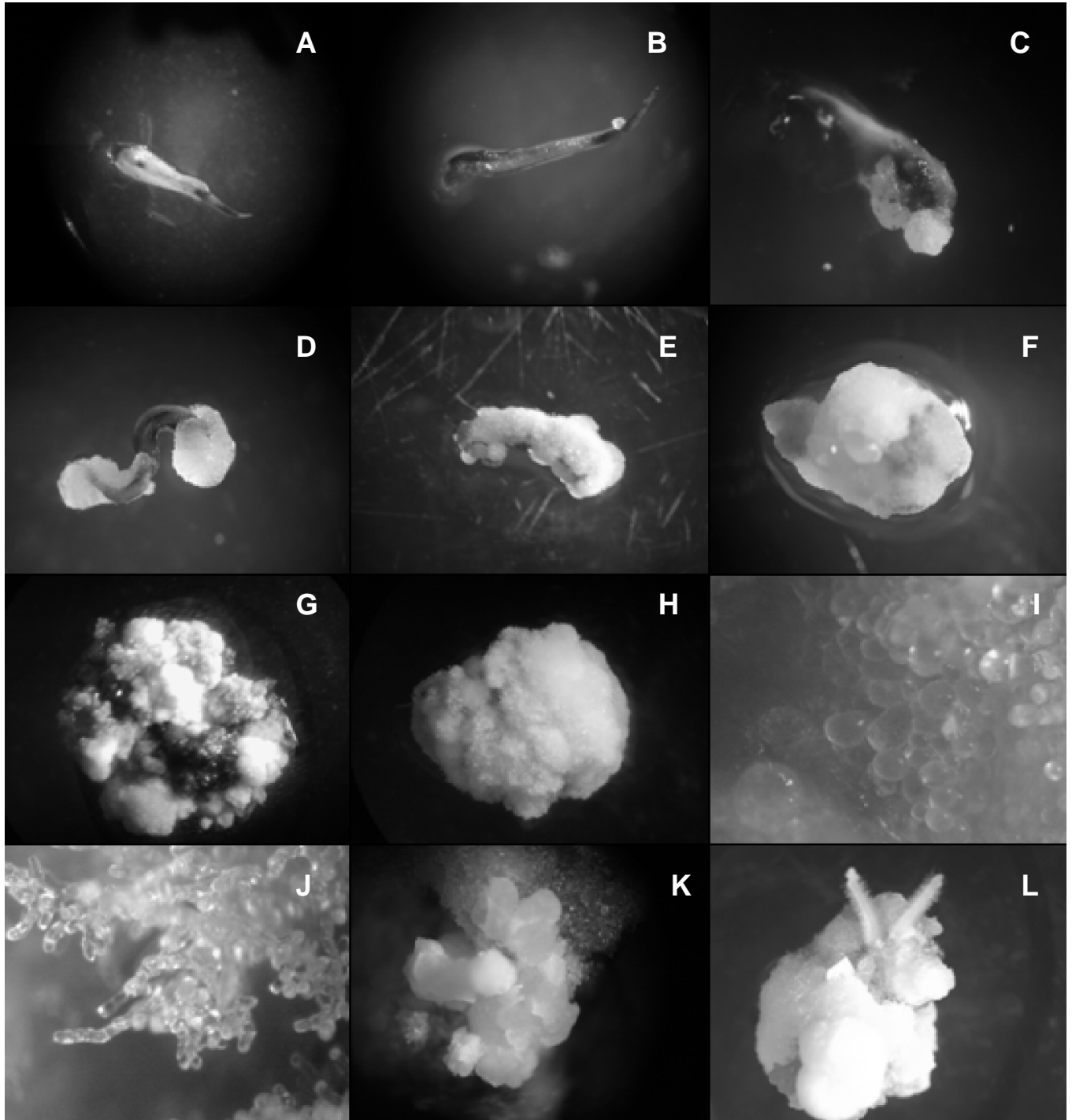


FIGURA 1. Secuencia en la formación de callos y raíces. **A:** Estaminoide a la semana de implantación en el medio de cultivo. **B:** Callos cristalino en estaminoide a los 15 d, botón de 3 - 5 mm de longitud. **C** y **D:** Callo amarillo crema a los 15 d, botón de 5 - 6 mm. **E:** Callo blanco, cristalino cubriendo parcialmente el explante. **F:** Callo amarillo crema, friable después de 15 d. **G:** Callo presentando necrosis no sincronizada. **H:** Callo blanco y compacto. **I:** Callo con formaciones globulares. **J:** Callo con formaciones alargadas. **K:** Callos con posible diferenciación de raíz. **L:** Callo Organogénico (presencia de raíces).

CUADRO 2. Porcentaje de explantes que formaron callos a los 15 y 22 días después de su implantación en el medio de cultivo.

GENOTIPO	15 días				22 días			
	<3mm	3-5mm	5-6mm	>6mm	<3mm	3-5mm	5-6mm	>6mm
OC-61	T ₁ 92ab	T ₂ 100a	T ₃ 56bcd	T ₄ 88ab	T ₁ 92ab	T ₂ 100a	T ₃ 68abc	T ₄ 88ab
OC-67	T ₅ 84ab	T ₆ 92ab	T ₇ 84ab	T ₈ 92ab	T ₅ 88ab	T ₆ 92ab	T ₇ 88ab	T ₈ 92ab
CHO-42	T ₉ 80ab	T ₁₀ 20cde	T ₁₁ 80ab	T ₁₂ 16de	T ₉ 92ab	T ₁₀ 20cd	T ₁₁ 80ab	T ₁₂ 32cd
CHO-163	T ₁₃ 20de	T ₁₄ NC e	T ₁₅ 56bcd	T ₁₆ 64abcd	T ₁₃ 40cd	T ₁₄ NC d	T ₁₅ 56bcd	T ₁₆ 68abc

NC = No hubo Formación de callos

Prueba de Duncan $\alpha = 0,05$ **CUADRO 3.** Porcentajes de Correlación de Spearman para determinar asociación entre las variables porcentaje de formación de callos y longitud del botón floral.

Genotipo	Formación de callos-Long. Botón Floral r(P)*
OC-61	-0,0880 (0,7096)
OC-67	0,2275 (0,3309)
CHO-42	-0,3242 (0,1622)
CHO-163	0,6365 (0,0031)

r = Coeficiente de Correlación de Spearman

 $\alpha = 0,05$

* Valores entre paréntesis corresponden a la Probabilidad

En el Cuadro 3 se puede observar el coeficiente de correlación spearman y los valores de probabilidad de los mismos, para las variables porcentaje de FC y longitud del BF. Tenemos entonces, para los genotipos OC-61, OC-67 y CHO-42 que la probabilidad es menor que el valor de significación utilizado ($\alpha = 0,05$) no existiendo correlación lineal o asociación entre las variables FC y longitud del BF, por lo que la FC no depende del tamaño del botón utilizado. Así mismo, se evidencia que para el genotipo CHO-163 el valor de probabilidad fue menor que el nivel de significación, estableciéndose así, una correlación lineal entre las variables FC y longitud del BF; por tanto, la FC depende de la longitud del botón. Como el coeficiente de correlación es positivo, puede decirse que a medida que aumenta la longitud del BF, aumenta la FC.

Estos resultados determinan que existe una influencia del genotipo sobre la respuesta a las condiciones de cultivo, coincidiendo con lo reportado por Li *et al.* (1998), quienes obtuvieron una alta FC para los genotipos del tipo Forastero (85-100%), mientras que para los genotipos del tipo Criollo el porcentaje de IC estuvo entre 6-20%. Por su parte, Velásquez (2006) obtuvo un porcentaje de IC de 4-60% al trabajar con genotipos del tipo Criollo usando las mismas concentraciones de 2,4-D y Sacarosa utilizadas en este trabajo.

Cabe señalar, que en ambos trabajos, se menciona un incremento en el volumen de los explantes, una semana después de su implantación *in vitro*, coincidiendo con los resultados de este trabajo y evidenciando el efecto del Thidiazuron y el 2,4-D en la estimulación de la división celular.

Con relación al tipo de fuente de carbono utilizada, se encontró que la sacarosa (80 g l⁻¹) favoreció la FC, coincidiendo con los resultados reportados por López-Báez *et al.* (2000), quienes probaron la eficiencia de diferentes fuentes de carbono, obteniendo una alta proporción de FC al utilizar la misma concentración de sacarosa, lo que conduce a pensar que esta fuente de energía está disponible de manera inmediata para el explante durante los procesos de división y diferenciación celular.

A los 15 d de transferidos los callos al medio LLOYD y McCOWN para inducir el crecimiento de callo secundario, se observó que los mismos mostraron un incremento en su tamaño (Figura 1F). Encontrándose, a los 22 d de cultivo una diversidad en el diámetro del callo con relación al tamaño del BF, de esta manera las FC a

partir de estaminoides provenientes de BF menor a 3 mm, tuvieron un diámetro comprendido entre 1,1-2,11 mm, aquellos provenientes de BF de longitud entre 3-5 mm indicó que el diámetro del callo estuvo entre 1,62-2,62 mm, en los botones de 5-6 mm de longitud el diámetro del callo fue de 1,98-3,75 mm, para los botones >6 mm y los callos tuvieron un diámetro de 1,33-3,03 mm.

Este incremento en el tamaño de las masas callosas pudo deberse a la influencia de las citocininas BAP y Kinetina, así como a la concentración de Sacarosa y 2,4-D utilizadas. De este modo, Chanátasig (2004) menciona la influencia de las citocininas BAP y Kinetina sobre el desarrollo de los callos.

A los 22 d de iniciado el cultivo, se pudo observar un incremento en el porcentaje de FC, manteniéndose la mejor respuesta para el genotipo OC-61 y tamaño del BF de 3-5 mm, seguido por los tratamientos T₁, T₆, T₈, T₉, T₄, T₇, T₅, y T₁₁ con 92-80%, mientras que el genotipo CHO-163 mostró el menor porcentaje de explantes callogénicos con 40-46%. Desde el punto de vista estadístico, la Prueba de Medias de Duncan constató una disminución en una clases en comparación con la fase anterior a un nivel de significación del 5% (Cuadro 2).

Los callos provenientes de estaminoides de menor tamaño (<3 mm y 3-5 mm) presentaron inicialmente una apariencia cristalina y posteriormente a los 22 d de cultivo tomaron una coloración crema, conservando su apariencia no compacta. Las FC a partir de estaminoides de mayor tamaño (5-6 mm y >6 mm) mantuvieron sus características iniciales hasta los 28 d de cultivo, cuando algunos comenzaron a mostrar coloraciones castaño claras a oscuras, debido probablemente a la presencia de fenoles (Figura 1).

A los 35 d de cultivo se obtuvo una respuesta organogénica mediante la formación de raíces en callos de color blanco, cristalino y compacto (Figura 1H); notándose además, formaciones alargadas, ramificadas, traslúcidas y turgentes, así como redondeadas sobre la superficie del callo similares a embriones somáticos (ES) en estado globular; no obstante, estos no llegaron a desarrollarse como tal (Figuras 1I y 1J). Estos resultados contrastan con los obtenidos por Chanátasig (2004) quien logra la inducción de embriones somáticos (IES) a partir de callos con las características antes mencionadas y en proceso de necrosamiento.

Estos resultados de formación de raíces obtuvo en los genotipos evaluados (Figura 1K y 1L) contrastan con los señalados por Tan y Furtek (2003) y Alemanno *et al.* (1996) quienes observaron callos blancos, compactos y en una constante división celular sin lograr diferenciación alguna en órganos.

Una vez que los callos fueron transferidos a un medio con las sales de DKW suplementado con aminoácidos y KNO₃, la respuesta organogénica se incrementó en mayor número de explante, así como en el número de raíces (Figuras 2A, 2B y 2C).

Los datos mostrados en el Cuadro 4 señalan que existe también una respuesta genotípica dependiente del tamaño del BF durante la organogénesis, demostrándose 3 grupos con diferencias estadísticas como lo demuestra la Prueba de Medias de Tukey a un nivel de significación del 5%. En la Prueba de Correlación de Spearman, indica que no existe asociación o correlación lineal, entre las variables porcentaje de formación de raíces y la longitud del BF, debido a que en todos los genotipos evaluados, el valor de probabilidad fue mayor al nivel de significación utilizado, en pocas palabras ambas variables son independientes (Cuadro 5).

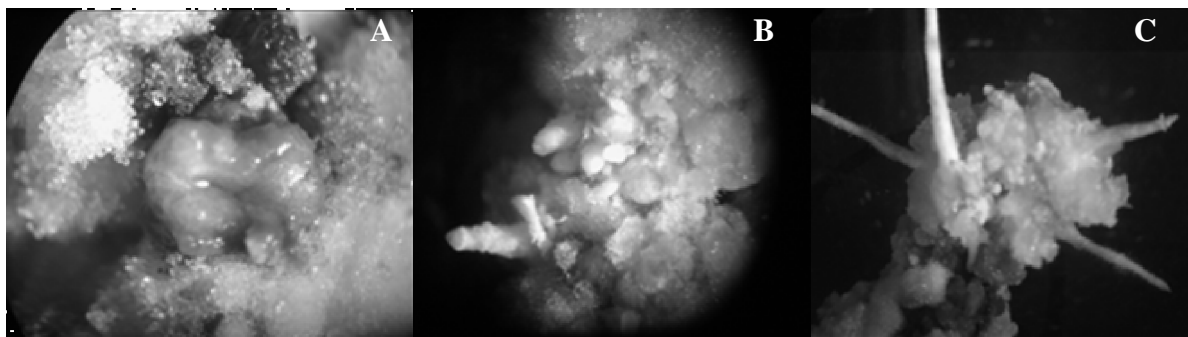


FIGURA 2. Secuencia del proceso de formación de raíces. **A:** Callo en proceso de diferenciación organogénica. **B:** Callo con varios brotes de raíz. **C:** Callo con raíces.

CUADRO 4. Porcentaje de callos organogénicos (presencia de raíces) después de 1 mes de iniciado el cultivo.

GENOTIPO	<3 mm	3-5 mm	5-6 mm	>6 mm
OC-61	12 bc	16 bc	0 c	48 a
OC-67	0 c	16 bc	4 bc	12 bc
CHO-42	8 bc	12 bc	36 ab	4 bc
CHO-163	0 c	0 c	0 c	12 bc

Prueba de Duncan; $\alpha=0,05$ **CUADRO 5.** Porcentajes de Correlación de Spearman para determinar asociación entre las variables porcentaje de formación de raíces y longitud del botón floral.

Genotipo	Formación de Raíces-Long. Botón Floral r (P)*
OC-61	0,4219 (0,0648)
OC-67	0,2453 (0,2932)
CHO-42	-0,0264 (0,9114)
CHO-163	0,3078 (0,1857)

 r = Coeficiente de Correlación de Spearman $\alpha = 0,05$

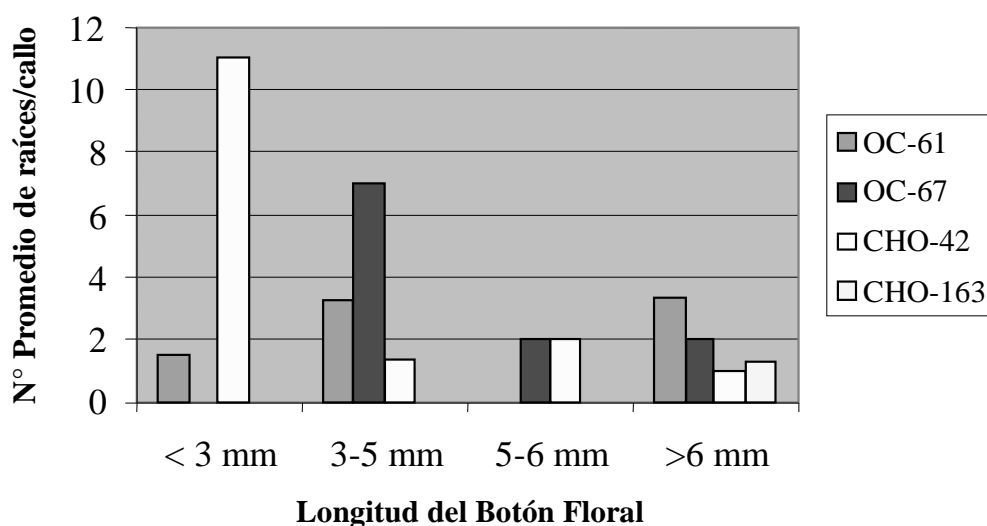
* Valores entre paréntesis corresponden a la Probabilidad.

Así mismo, se aprecia una tendencia a la formación de raíces en CI a partir de los estaminodios provenientes de los BF de mayor tamaño (>6mm). No obstante, en aquellos tratamientos en donde el porcentaje de explantes organogénicos fue menor, el número promedio de raíces por explante resultó ser mayor. El genotipo CHO-42 tuvo un mayor número promedio de raíces por explante para el menor tamaño de BF (<3 mm), tendencia que se observa de igual manera en el genotipo OC-67, pero para la longitud de botón de 3-5 mm (Figura 3).

Todos estos resultados indican que existe una respuesta *in vitro* dependiente del genotipo, cálculos similares son presentados por varios autores (Li *et al.*, 1998; López-Baez *et al.*, 2000; Chantásig, 2004; Velásquez, 2006).

Luego de permanecer más de un mes en el medio de DKW suplementados con aminoácidos, KNO_3 y $0,5 \text{ mg l}^{-1}$ de BAP, las raíces formadas mostraron un incremento en su volumen y continuaron con la FC o en su defecto se necrosaron.

Antes estos resultados, se puede concluir que el 2,4-D y la fuente de carbono utilizada tuvieron un efecto sobre la respuesta organogénica del explante mediante la formación de raíces. Por su parte, Segura (1993) afirma que existen ciertos carbohidratos que regulan la respuesta morfológica de los explantes cultivados *in vitro* como las oligosacarinas, las cuales ejercen efectos biológicos sobre las células no atribuibles a su papel como fuente de carbono y energía.

**FIGURA 3.** Número Promedio de raíces/explante después de 1 mes de la implantación en el medio de cultivo.

Del mismo modo, menciona también que la organogénesis es un proceso que está regulado por cambios en los niveles hormonales endógenos de auxinas y citocininas, por lo que la formación de yemas vegetativas es promovida por el balance favorable de la relación auxina/citocinina a las citocininas, mientras que la formación de raíces ocurre por un balance favorable a las auxinas.

La respuesta organogénica en los callos también fue observada por Velásquez (2006) en 2 genotipos del tipo Criollo al utilizar las mismas concentraciones de Sacarosa y 2,4-D, lo que lleva a pensar según lo expuesto anteriormente, que ambos factores tienen una influencia importante sobre la inducción de raíces.

CONCLUSIONES

- El protocolo utilizado para la obtención de ES indujo una respuesta organogénica en el explante, mediante la formación de raíces en los 4 genotipos estudiados.
- La combinación de 80 g l⁻¹ de sacarosa y 4 mg l⁻¹ de 2,4-D, produjeron un alto porcentaje de FC en los estaminoides implantados en el medio de cultivo.
- Se encontraron diferencias genotípicas en la FC a partir de estaminoides provenientes de BF de diferentes longitudes. Los valores más bajos se observaron en los genotipos CHO-42 y CHO163.
- Existen diferencias genotípicas en la respuesta organogénica por parte del explante, en donde el mayor porcentaje de callos que formaron raíces se encontró en el genotipo OC-61 para el tamaño de botón > 6 mm.
- Se determinó la asociación entre el tamaño del BF y la FC sólo en el genotipo CHO-163.

BIBLIOGRAFÍA

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

Alemanno L., T. Ramos Gargadenec, C. Anadry and N. Ferrière. 2003. Localization and identification of phenolic compounds in *Theobroma cacao* L. somatic embryogenic. *Annals of botany* 92:613-623.

Chanatásig, C. 2004. Inducción de la embriogénesis somática en clones superiores de cacao (*Theobroma cacao* L.), con resistencia a enfermedades fungosas. Tesis de Postgrado. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE). Costa Rica. 86 p.

Cope, F. 1976. Cacao. **In:** Evolution in crop plants. N. W. Simmonds Logman. London. 339 p.

Dublín, P. 1991. Multiplicación vegetativa en Café, Hevea y Cacao. **In:** Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones. Capítulo 26. William Roca y Luis Mroginski (Eds). Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Cali, Colombia. 970 p.

Emons, A. 1994. Somatic embryogenesis: cell biological aspects. *Acta Bot. Nerrlandica*. 43(1):1-14.

Li, Z., A. Traore, S. Maximova and M. Guiltinan. 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., L. Moreno-Martínez and S. Pacheco-Rodas. 2000. Avanzos en propagación de Cacao - *Theobroma cacao* - por embriogénesis somática. International Workshop on New Technologies and Cocoa Breeding. Kota Kinabalu, Sabah, Malasia. 163-177.

Maximova, S., L. Alemanno, A. Young, N. Ferriere A. Traore and M. Guiltinan. 2002. Efficiency, genotypic variability and cellular origin of primary secondary somatic embryogenesis of *Theobroma cacao* L. *in vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 38:252-259.

Motamaor, J., A. Risterucci, P. López, C. Ortiz, A. Moreno and C. Lanaud. 2002. Cacao domestication I: the origin of the cacao cultivated by the Mayas. *Heredity* 89:380-386.

Santos, B., J. Gilreath, R. Arbona y A. Pimentel. 2005. La estadística no paramétrica para el análisis e interpretación de estudios de plagas: alternativas al análisis de la varianza. *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología* 75:89-83.

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

Traore, A., S. Maximova and M. Gultinan. 2003.
Micropropagation of *Theobroma cacao* L. using
somatic embryo-derived plants. *In vitro* Cell. Dev.
Biol. Plant. 39(3):61-74.

Velásquez, R., Y. Sandra, C. Betancourt y J. Mata. 2006.
Embriogénesis somática en cultivares de cacao vene-
zolano. *Agronomía Trop.* 56(1):61-74