

Efecto de diferentes reguladores de crecimiento sobre la embriogénesis somática en tres cultivares de cacao

Andy Arturo Díaz-López^{1*}, Efraín Gerardo Salazar-Yamarte^{1†}, José Gerardo Albarrán-Rincón¹, Carlos Marín¹, Ariadne Lucrecia Vegas-García²

¹Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA), Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias (CENIAP). Maracay, Venezuela. ²Universidad Agraria del Ecuador, Facultad de Ciencias Agrarias. Guayaquil, Ecuador. *Correo electrónico: diazaa35@gmail.com

RESUMEN

Los métodos de propagación tradicionales en el cultivo de cacao son pocos eficientes, por el bajo número de plantas que se producen; estas, pueden presentar características agronómicas indeseables para los productores. La embriogénesis somática puede ser la vía más apta para la regeneración de accesiones de cacao. Se evaluó el efecto del 2,4-D y su combinación con 6-BA y kinetina en la embriogénesis somática de cacao. Se usaron cinco concentraciones de 2,4-D (0; 0,5; 1; 1,5 y 2 mg.L⁻¹) combinadas con 0,05 mg.L⁻¹ de 6-BA y 0,3 mg.L⁻¹ de kinetina sobre el índice de formación de callos (IC) y la formación de embriones somáticos en tres cultivares de cacao (SCA-6, OC-60 y CNM-4), con dos tipos de explantes (estaminodios y pétalos). A los 14 y 28 días de subcultivo se evidenció una respuesta diferencial entre cultivares y tipo de explante en el IC. El mayor IC₁₄ y de IC₂₈ ocurrió en estaminodios y pétalos cultivados en 0,5 mg.L⁻¹ de 2,4-D y 6-BA, con valores respectivos de 11,6 y 29. La mayor frecuencia embriogénica (40 %) y número de embriones somáticos se obtuvo en estaminodios de SCA-6 con 1,5 mg.L⁻¹ de 2,4-D, a diferencia de los embriones obtenidos en los pétalos cultivados en 2 mg.L⁻¹ de 2,4-D y 6-BA. El análisis de componentes principales mostró alta correlación entre la concentración de reguladores de crecimiento, tipo de explante y las variables relacionadas con la embriogénesis; así como, una baja correlación de estas con los IC₁₄ y IC₂₈.

Palabras clave: medio de cultivo, micropropagación, pétalos, *Theobroma cacao* L.

Effect of different growth regulators on somatic embryogenesis in three cocoa cultivars

ABSTRACT

Traditional propagation methods in cocoa cultivation are not very efficient, due to the low number of plants that are produced; these may present undesirable agronomic characteristics for producers. Somatic embryogenesis may be the most suitable route for the regeneration of cocoa accessions. The effect of 2,4-D and its combination with 6-BA and kinetin on somatic embryogenesis of cocoa was evaluated. Five concentrations of 2,4-D (0; 0,5; 1; 1,5 and 2 mg.L⁻¹) were used combined with 0,05 mg.L⁻¹ of 6-BA and 0,3 mg.L⁻¹ of kinetin on the callus formation index (IC) and the formation of somatic embryos in three cocoa cultivars (SCA-6, OC-60 and CNM-4), with two types of explants (staminodes and petals). At 14 and 28 days of subculture, a differential response was evident between cultivars and type of explant in the IC. The highest IC₁₄ and IC₂₈ occurred in staminodes and petals grown in 0,5 mg.L⁻¹ of 2,4-D and 6-BA, with respective values of 11,6 and 29. The highest embryogenic frequency (40 %) and the highest number of somatic embryos was obtained in staminodes of SCA-6 with 1,5 mg.L⁻¹ of 2,4-D, unlike the embryos obtained in the petals grown in 2 mg.L⁻¹ of 2,4-D and 6-BA. The principal component analysis showed a high correlation between the concentration of growth regulators, type of explant and the variables related to embryogenesis; as well as a low correlation of these with IC₁₄ and IC₂₈.

Key words: culture media, micropropagation, petals, *Theobroma cacao* L.

INTRODUCCIÓN

El cultivo de cacao (*Theobroma cacao* L.) tiene gran importancia en la economía de muchos países tropicales, por el uso de su producción. De la almendra se obtiene el licor o pasta de cacao, al moler las semillas de cacao tostado, fermentadas o no; la manteca que se utiliza para cosméticos, en forma de preparaciones o ungüentos contra la resequeidad de la piel y los labios; en la preparación de chocolate blanco y en panadería y repostería. El polvo de cacao, por su parte, se usa para la elaboración de chocolates, bombones y otros productos de confitería (Quintero *et al.* 2017).

En Venezuela, la baja productividad del cultivo de cacao está influida por la presencia de enfermedades; la pérdida progresiva de cultivares tipo criollo, por la obtención de un mayor rendimiento; plantaciones abandonadas; pocos programas de asistencia técnica, transferencia de tecnología y la falta de una infraestructura apropiada (Quintero y García 2010). Otro problema es la alta variabilidad genética en las plantaciones de cacao, como consecuencia de su condición alógama, debido a la incompatibilidad polen-estilo.

Para mantener la uniformidad de los materiales genéticos de cacao se tiene la propagación asexual, por estacas e injertación. Estos no resultan ser los métodos más eficientes, por el dimorfismo vegetativo de la planta, como tallos ortotrópicos que originan una raíz pivotante; su número es reducido, lo que limita su uso. Otro, los tallos plagiotrópicos, que son más numerosos y forman un sistema radical poco profundo; esto restringe la resistencia a la sequía y origina un sistema aéreo desequilibrado, que requiere de cortes frecuentes (Ramos y Gómez 2002).

La embriogénesis somática representa una alternativa para obtener materiales genéticos de cacao uniformes. Es definida por Williams y Maheswaran (1986), como el proceso donde las células haploides o diploides se desarrollan en plantas diferenciadas sin la fusión de gametos. Los embriones somáticos son estructuras bipolares, con un eje radical-apical y no poseen conexión vascular con el tejido materno; son capaces de crecer y formar plantas. Se puede utilizar en los programas de conservación y de

mejora genética de muchas especies vegetales (Gómez 1998; Celestino *et al.* 2005).

Ese proceso morfogénico se ha utilizado en la propagación de plantas de cacao, con diferentes tipos de explantes, tales como: pétalos, estaminodios y cotiledones; así como, diferentes medios de cultivo y fuentes de carbono (Henao *et al.* 2018; Bustami y Werbrouck 2018; García *et al.* 2018).

En Venezuela, Velásquez *et al.* (2006) realizaron modificaciones en la concentración de la fuente de carbono y reguladores de crecimiento, en el medio de cultivo; concluyeron que la inducción de embriones somáticos, a partir de explantes florales, está influenciada por el cultivar y el tamaño del botón floral.

Díaz-López *et al.* (2015) evaluaron el efecto del tiempo de subcultivo (14; 28 y 42 días) sobre la embriogénesis somática, en cinco cultivares de cacao venezolanos. En la metodología utilizaron dos tipos de explante inicial: pétalos y estaminodios; obtuvieron un mayor número de embriones en los estaminodios subcultivados cada 28 días.

Henao *et al.* (2018) desarrollaron un protocolo de regeneración de plantas de cacao, vía embriogénesis secundaria, en diferentes cultivares de origen colombiano. Con este, evaluaron el efecto de dos medios de cultivo, tipo de explante y tiempo de subcultivo, sobre la formación de embriones. En los resultados, encontraron diferencias en la capacidad de respuesta de los cultivares a la inducción del proceso embriogénico.

Las plantaciones de cacao, en Venezuela, están constituidas con alto número de árboles de avanzada edad y baja producción (Quintero y García 2010). Es necesario, plantas jóvenes y uniformes con características agronómicas deseables. Estas podrían ser obtenidas a través del proceso de embriogénesis somática, por los antecedentes sobre la posibilidad de regenerar plantas de cacao por esta vía.

Por tanto, se planteó como objetivo evaluar el efecto de diferentes reguladores de crecimiento sobre la embriogénesis somática, en tres cultivares de cacao, a partir de explantes florales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación de la investigación.

El trabajo experimental se realizó en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos de la Unidad de Biotecnología Vegetal del Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias (CENIAP) del Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA), Venezuela.

Material Vegetal.

Se utilizaron botones florales de 5-6 mm de longitud colectados de los genotipos Ocumare-60 (OC-60), Cuyagua Nombre María (CNM-4) y Scabina-6 (SCA-6), ubicados en el Banco de Germoplasma del INIA-CENIAP, estado Aragua. Los botones florales se colectaron en horas de la mañana y se transportaron hasta el laboratorio en tubos de plástico con 20 mL de agua destilada estéril.

Desinfección de los botones florales y extracción de los estaminodios y pétalos.

Los botones florales se desinfectaron con una solución de etanol al 70 %, por dos minutos; seguido de una solución de hipoclorito de sodio al 1 % de ingrediente activo (I.A.), por 10 min, con agitación constante. Luego se realizaron tres lavados, de cinco minutos cada uno, con agua destilada estéril. Los botones florales se cortaron con un bisturí N° 11 estéril, a 1/3 de su longitud, desde la parte basal, para la extracción de los estaminodios; y, la extracción de los pétalos con una aguja de disección estéril.

Evaluación del efecto del 2,4-D sobre la inducción y crecimiento del callo.

Para la inducción de callo, los estaminodios y pétalos se sembraron en un medio de cultivo compuesto por las sales de Driver y Kuniyuki (1984) (DKW); con suplemento de 22,7 nM de Thidiazuron (TDZ), según el protocolo descrito por Li *et al.* (1998). Se usaron cinco concentraciones de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), a saber: 0; 0,5; 1; 1,5 y 2 mg.L⁻¹; se añadió: 20 g.L⁻¹ de glucosa; 250 mg.L⁻¹ de glutamina; 100 mg.L⁻¹ de mioinositol; 2 mg.L⁻¹ de tiamina-HCl; 1 mg.L⁻¹ de ácido nicotínico; 2 mg.L⁻¹ de glicina y 2 g.L⁻¹ de Phytigel™. El pH del medio de cultivo se ajustó a 5,8 con una solución de KOH

o HCl 1N. Los explantes permanecieron por 14 días en condiciones de oscuridad en un cuarto climático, a 24°C de temperatura.

El diseño experimental fue totalmente aleatorio, con organización de un arreglo factorial 3x5x2. Se conformaron 30 combinaciones de tratamientos, con cinco repeticiones, lo que representó un total de 150 unidades experimentales o explantes. Los factores evaluados fueron: tres genotipos de cacao (OC-60, CNM-4 y SCA-6), cinco concentraciones de 2,4-D (0, 0,5; 1; 1,5 y 2 mg.L⁻¹) y dos explantes (estaminodios y pétalos). Se utilizó un total de 75 estaminodios y 75 pétalos provenientes de 150 botones florales.

Se evaluó el índice de formación de callos a los 14 días de cultivo (IC14), según Chatanásig (2004), mediante la siguiente expresión:

$$IC = \sum(\text{estado} \times \# \text{ de explantes en ese estado})$$

En esta fase de inducción, se asignó un valor numérico al estado del callo:

- E0: Ausencia de callo (0)
- E1: Inicio de pequeñas formaciones de callo (1)
- E2: El callo cubre casi totalmente el explante (2)
- E3: el callo cubre completamente el explante (3)

Se analizó el índice de crecimiento de callo con la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis ($\alpha = 0,10$). Para la comparación de rangos promedios de a pares se empleó el método descrito por Conover (1999). Los datos del ensayo se tabularon y procesaron en una hoja de cálculo electrónica Microsoft® Excel 2010 y el análisis estadístico avanzado con el programa Infostat v. 2016 (Di Rienzo *et al.* 2016). Asimismo, se describió la apariencia del callo según su coloración y consistencia.

Evaluación del efecto de la kinetina y la 6-BA en los callos primarios.

Se establecieron dos experimentos con los callos formados a partir de los explantes florales. En el primero, se transfirió el 50 % de los callos a un medio de cultivo Secondary Callus Growth (SCG-1), compuesto por las sales de Lloyd y McCown (1981); se suplementó con las concentraciones de 2,4-D mencionadas anteriormente y 0,3 mg.L⁻¹

de kinetina. En el segundo, se transfirió el 50 % de los callos restantes y la kinetina se reemplazó por 0,05 mg.L⁻¹ de 6-Benciladenina (6-BA) en el medio SCG-2. Ambos medios de cultivo se suplementaron con 20 g.L⁻¹ de glucosa, 50 mL de agua de coco; 1 mL.L⁻¹ de stock de vitaminas B5 (100 mg de mioinositol; 10 mg de tiamina-HCl; 1mg de ácido nicotínico y 1mg de piridoxina) y 2,2 g.L⁻¹ de Phytigel™. El pH se ajustó a 5,7 con una solución de KOH 1N. Los explantes permanecieron en condiciones de oscuridad, a una temperatura de 24°C, durante 14 días.

El diseño experimental fue totalmente aleatorio, con organización de un arreglo factorial 2x5x2x3. Los factores evaluados fueron: dos tipos de explante (estaminodios y pétalos); cinco concentraciones de 2,4-D (0, 0,5; 1; 1,5 y 2 mg.L⁻¹); dos fuentes de citocinina (kinetina a una concentración de 0,3 mg.L⁻¹ y 6-BA a una concentración de 0,05 mg.L⁻¹) y tres genotipos de cacao para un total de 60 combinaciones de tratamientos, con cinco repeticiones. Se utilizó un total de 300 botones florales (unidades experimentales).

Se realizó una descripción del callo según su coloración y consistencia. La variable respuesta que se evaluó fue el Índice de Desarrollo de callo a los 28 días de cultivo (IC28), según Chatanásig (2004); quien estableció para esta etapa cuatro estados con su respectivo valor numérico, a saber:

- E4a: callos < 2mm (4)
- E4b: callos de 2-4mm (5)
- E4c: callos de 4-6mm (6)
- E4d: callos > 6mm (7)

Los datos se analizaron con la prueba no paramétrica de una vía (o una cola) de Kruskal-Wallis ($\alpha = 0,10$). Para la comparación de rangos promedios de a pares se empleó el método descrito por Conover (1999). Los datos del ensayo se tabularon y procesaron en una hoja de cálculo electrónica Microsoft® Excel 2010 y el análisis estadístico avanzado con el programa Infostat versión 2016 (Di Rienzo *et al.* 2016).

Diferenciación de embriones somáticos.

Las masas proembriogénicas se transfirieron a un medio de cultivo constituido por las sales de DKW más 30 g.L⁻¹ de sacarosa, 1 g.L⁻¹ de glucosa, 100 mg.L⁻¹ de mioinositol, 2 mg.L⁻¹ de tiamina-HCl, 1 mg.L⁻¹ de ácido nicotínico, 2 mg.L⁻¹ de glicina y 2 g.L⁻¹ de Phytigel™. Se realizaron subcultivos cada 14 días, hasta la aparición de los embriones somáticos. Se evaluó la frecuencia de embriones somáticos (FE), número de embriones según su etapa de desarrollo (globular, corazón y torpedo), número total de embriones somáticos por cultivar y número de embriones somáticos por explante embriogénico.

Se empleó el Análisis de Componentes Principales de la varianza total (ACP) para evaluar la interacción de los diferentes factores. Se realizó una prueba de Ji-Cuadrado, a un nivel de significación de $\alpha = 0,10$. También se efectuó el análisis de Correspondencias Múltiples (ACM). Se utilizó el software Infostat versión 2016 (Di Rienzo *et al.* 2016).

Caracterización Histológica.

Con la finalidad de corroborar la naturaleza embriogénica de los callos, estos se fijaron en una mezcla de 5 mL de formaldehído al 40 %, 5 mL de ácido acético y 90 mL alcohol al 70 % (FAA) por tres semanas. Luego, se realizó la deshidratación en una serie ascendente de alcohol butílico terciario (50; 70; 85; 95; 100 % y alcohol absoluto), con permanencia de 30 min en cada uno de estos. Al final del proceso, se efectuaron tres cambios con alcohol butílico terciario puro y los callos se dejaron toda la noche en el último de estos.

El material vegetal deshidratado se colocó en un recipiente con parafina fundida a 60°C y se realizaron tres cambios de la misma, para eliminar el alcohol por evaporación. Luego, las muestras se transfirieron en cajas de cartulina con parafina fundida, y se dejaron solidificar a temperatura ambiente. Finalmente, se prepararon bloques de parafina que se cortaron a 12 μ m de grosor, con un micrótopo. Los cortes se sometieron a una batería de tinción con safranina y fastgreen, previo a su observación. Las observaciones se realizaron en un microscopio óptico, marca LEITZ.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efecto del 2,4-D.

Según la prueba de Kruskal-Wallis, se observaron diferencias estadísticas en cada genotipo de cacao, en el IC14, con un valor de significancia de $\alpha = 0,10$. Se evidenció un efecto del 2,4-D en la formación de callos. Los IC14 más altos en los estaminodios se obtuvieron en los genotipos CNM-4 y SCA-6 cuando estuvieron expuestos a las concentraciones de 0,5 mg.L⁻¹ y 1 mg.L⁻¹ de 2,4-D, con valores respectivos de 11,6 ± 6,5 y 11,2 ± 6,3. En pétalos, los IC14 más altos (8 ± 5,8 y 7,2 ± 1,8) se observaron en los mismos genotipos, cuando se cultivaron con 0,5 mg.L⁻¹ y 1 mg.L⁻¹ de 2,4-D, respectivamente (Cuadro 1).

En los genotipos OC-60 y CNM-4 se observaron diferencias en la respuesta de los estaminodios y los pétalos expuestos a las concentraciones de 2,4-D. En OC-60 el mayor IC14 (8,6 ± 3,8) ocurrió en estaminodios cultivados con 2 mg.L⁻¹ de 2,4-D; mientras que, en los pétalos se presentó cuando se expusieron a concentraciones de 0,5 y 2 mg.L⁻¹ (5,6 ± 5,1 y ± 4,6 respectivamente), de ese regulador de crecimiento.

Otro de los valores más altos de IC14 (10,0 ± 3,8), en el genotipo CNM-4, se observó en estaminodios cultivados en 2 mg.L⁻¹ de 2,4-D. Los pétalos de este mismo genotipo mostraron valores más altos IC14 (8,0 ± 5,8 y 7 ± 4,6) cuando se cultivaron en 0,5 y 2 mg.L⁻¹, respectivamente, de ese regulador. El genotipo SCA-6 también mostró diferencias entre los IC14 de pétalos y estaminodios, con los mayores valores en estos últimos; no se observaron diferencias significativas en el IC14 de los pétalos de este genotipo, expuestos a las concentraciones de 2,4-D.

Los resultados evidencian una importante influencia del genotipo, porque los IC14 fueron estadísticamente diferentes entre los tres cultivares de cacao evaluados (Cuadro 1). Se pudo apreciar una mayor tendencia a la formación de callo en el estaminodio, con un IC14 promedio superior de 6,3 en comparación con los pétalos que fue de 4,64. Estos resultados difieren de los obtenidos por Kouassi *et al.* (2017), quienes encontraron más producción de callos en pétalos que en los estaminodios, en tres genotipos de cacao (C1, C14 y C16); solo en uno (C9) observaron una mayor formación de callo en los estaminodios.

Cuadro 1. Rangos y medias de interacción genotipo×explante×concentración de 2,4-D sobre el IC14 bajo condiciones de cultivo *in vitro*. Laboratorio de Biotecnología Vegetal INIA-CENIAP, 2016.

Explante	2,4-D (mg.L ⁻¹)	IC14					
		SCA-6		OC-60		CNM-4	
		Medias	Rangos	Medias	Rangos	Medias	Rangos
Estaminodios	0	0	14,0 b	0	14,0 b	0	14,0 b
	0,5	9,6 ± 3,1	48,5 a	5,0 ± 5,2	32,5 ab	11,6 ± 6,5	55,7 a
	1	11,2 ± 6,3	52,3 a	5,6 ± 4,0	37,2 ab	6,4 ± 7,5	37,7 ab
	1,5	9,4 ± 4,9	49,5 a	4,2 ± 3,4	32,8 ab	7,6 ± 7,5	42,7 a
	2	7,2 ± 6,5	40,9 ab	8,6 ± 3,8	46,7 a	10,0 ± 3,8	51,5 a
Pétalos	0	0	14,0 b	0	14,0 b	0	14,0 b
	0,5	6,6 ± 4,2	50,0 a	5,6 ± 5,1	44,0 a	8,0 ± 5,8	51,2 a
	1	7,2 ± 1,8	52,1 a	4,6 ± 3,2	39,0 ab	4,4 ± 5,8	34,8 ab
	1,5	6,8 ± 4,7	48,2 a	3,8 ± 2,9	35,1 ab	4 ± 4,4	35,5 ab
	2	6,0 ± 1,9	45,6 a	5,6 ± 4,6	42,8 a	7 ± 4,6	49,7 a

Letras iguales significan que no se observaron diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos para la prueba de medias de Kruskal-Wallis ($\alpha=0,10$). P estaminodio = 0,0048; P pétalo= 0,0101

Esto puede deberse a que, el callo se forma a partir de las células parenquimáticas del estaminodio; las cuales son consideradas un tipo de tejido menos especializado y tienen la capacidad de rediferenciarse. Monsalve *et al.* (2005) afirman que los estaminodios se encuentran en el cojín floral fundidos en la base con los estambres y cerca de la zona meristemática floral. Eso puede influir en una mejor respuesta callogénica de este explante en comparación con el pétalo.

Los callos formados en los estaminodios se caracterizaron por presentar una coloración amarilla crema y consistencia compacta. En los pétalos se observó la presencia de callos de apariencia y consistencia más friable y con la misma coloración. Esto coincide con Jheng *et al.* (2006), quienes hacen referencia al cambio en las características del callo en *Oncidium*; que pasan de ser granular y de coloración amarilla, a un callo embriogénico más friable o compacto, cuando combinaron el 2,4-D con el TDZ.

En la Figura 1 se puede apreciar los cuatro estados de desarrollo del callo en los dos tipos de explantes utilizados según Chatanásig (2004) para los tres cultivares de cacao evaluados. La aplicación de 2,4-D resultó importante para la inducción de callos en los tejidos de cacao. La acción del TDZ pudo tener, también, un papel primordial en el incremento endógeno de auxinas,

en el tejido vegetal; este afecta la concentración de otros reguladores de crecimiento en algunas dicotiledóneas. Estudios histológicos reportan que la proliferación celular se mejora por el TDZ, en combinación con el 2,4-D (Guo *et al.* 2011).

Según los resultados, hubo una respuesta callogénica muy variable en los genotipos OC-60 y CNM-4, con excepción de SCA-6, que mostró IC14 similares en las diferentes concentraciones de 2,4-D, en los dos explantes. Las diferencias en la respuesta callogénica en OC-60 y CNM-4 podrían estar asociadas al contenido endógeno de hormonas en los tejidos; además, probablemente, que no se alcanzó la concentración óptima de 2,4-D y TDZ; puede mencionarse otro factor, como la influencia del genotipo en la respuesta inicial.

Los resultados coinciden con los obtenidos por Velásquez *et al.* (2006), quienes observaron una mayor formación de callo en los estaminodios cultivados con 4 mg.L⁻¹ de 2,4-D y 80 g.L⁻¹ de sacarosa y la influencia del genotipo sobre la respuesta de éstos. Monsalve *et al.* (2005), por su parte, mencionan que la aplicación de 2 mg.L⁻¹ de 2,4-D en combinación con TDZ favoreció la formación de callo; así como, una apariencia friable en pétalos y estaminodios de cuatro cultivares de cacao del norte de Santander. Garate-Navarro y Arévalo-Gardini (2017) observaron una mayor

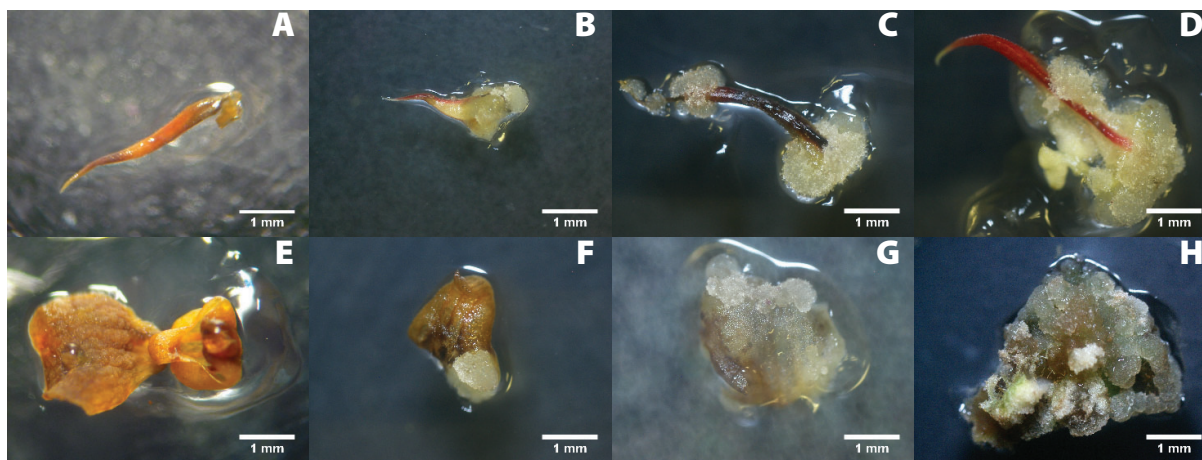


Figura 1. Estados de desarrollo del callo en explantes florales de cacao a los 14 días de establecidos en el medio de cultivo PCG-DKW. **A** y **E**: Estado de desarrollo de callo E0 (3,5X). **B** y **F**: Estado de desarrollo de callo E1 (3,5X). **C** y **G**: Estado de desarrollo de callo E2 (3,5X). **D** y **H**: Estado de desarrollo del callo E3 (3,5X). *A-D*: Estaminodios. *E-H*: Pétalos.

formación de callos en estaminodios de cacao en un medio de cultivo con 1,5 mg.L⁻¹ de 2,4-D combinado con 7 µg.L⁻¹ de TDZ; esto contrasta con los resultados del presente trabajo, donde la formación de callo con 1,5 mg.L⁻¹ de 2,4-D fue menor, probablemente, porque se utilizó una menor concentración de TDZ.

Efecto del 6-BA y la kinetina.

El efecto de los dos medios de cultivo estudiados sobre el IC28 se presenta en el Cuadro 2. La prueba de Kruskal-Wallis estableció diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,10$), entre los genotipos, la concentración de 2,4-D y la fuente de citocinina. Los mayores IC28 se observaron en los pétalos de SCA-6 cultivados en el medio con 0,5 mg.L⁻¹ de 2,4-D y 6-BA (29); así como, en los

estaminodios expuestos a esta misma concentración de 2,4-D combinado con kinetina (28,8). La respuesta de los estaminodios de este cultivar no fue estadísticamente significativa, cuando se expusieron al 6-BA combinado con 0,5; 1,5 y 2 mg.L⁻¹ de 2,4-D.

El genotipo OC-60, por su parte, también mostró IC28 altos en los pétalos cultivados con 2 mg.L⁻¹ de 2,4-D combinado con 6-BA (26,6) y kinetina (26,8); igual, con la concentración de 1 mg.L⁻¹ de esta auxina combinada con kinetina (26,2). El mayor IC28 en el genotipo CNM-4 se observó en los estaminodios cultivados en 0,5 mg.L⁻¹ de 2,4-D y kinetina con un valor de 26,2; mientras que, en los pétalos el IC28 más alto fue de 23,6 en el medio de cultivo con 1,5 mg.L⁻¹ de 2,4-D y la misma citoquinina. Esta respuesta diferencial la

Cuadro 2. Rangos y medias de interacción genotipo×explante×concentración del 2,4-D y citoquininas sobre el IC28 en explantes de cacao bajo condiciones de cultivo *in vitro*. Laboratorio de Biotecnología Vegetal INIA-CENIAP, 2016.

Citoquinina	Explante	2,4-D (mg.L ⁻¹)	IC28					
			SCA-6		OC-60		CNM-4	
			Medias	Rangos	Medias	Rangos	Medias	Rangos
6-BA	Estaminodio	0	0	24,0 d	0	24,0 d	0	24,0 d
		0,5	27,2 ± 15,3	120,0 a	13,6 ± 13	61,5 bcd	17,6 ± 10,3	69,0 abcd
		1	25,4 ± 14,4	110,2 abc	14,6 ± 11,0	63,6 bcd	15,4 ± 14,1	66,4 abcd
		1,5	26,6 ± 14,9	117,7 a	18,6 ± 11,7	75,9 abc	16,4 ± 15,1	72,6 abcd
		2	26,8 ± 15,1	117,7 a	24 ± 3,9	90,3 abc	19,6 ± 11,7	78,4 abc
	Pétalo	0	0	24,5 d	0	24,5 d	0	24,5 d
		0,5	29 ± 7,3	113,7 a	16,4 ± 10,7	65,3b cd	20,8 ± 14,0	92,7 abc
		1	27,8 ± 15,5	120,7 a	21,6 ± 12,3	83,4 abc	17,6 ± 16,3	77,5 abcd
		1,5	26 ± 14,8	109,6 abc	21 ± 12,3	82,0 abc	16,8 ± 15,6	71,7 abcd
		2	26,4 ± 15,0	112,4 ab	26,6 ± 14,9	112,2 ab	14,6 ± 11	62,8 bcd
Kinetina	Estaminodio	0	0	24,0 d	0	24,0 d	0	24,0 d
		0,5	28,8 ± 3,30	115,0 a	23,2 ± 9,9	95,5 abc	26,2 ± 5,8	102,8 abc
		1	14 ± 14,6	66,4 abcd	24,6 ± 6,2	95,3 abc	15 ± 3,7	58,8 cd
		1,5	23 ± 7,5	90,7 abc	25,4 ± 5,2	98,6 abc	21,2 ± 5,7	80,2 abc
		2	18,4 ± 11,3	73,9 abcd	25,8 ± 5,4	99,9 abc	25,2 ± 7,3	100,6 abc
	Pétalo	0	0	24,5 d	0	24,5 d	0	24,5 d
		0,5	20,8 ± 14,0	92,7 abc	21,2 ± 5,4	76,6 abcd	21,6 ± 12,5	83,6 abc
		1	16,4 ± 16,8	75,8 abcd	26,2 ± 6,2	97,8 abc	14,8 ± 8,7	57,5 cd
		1,5	23,8 ± 13,7	95,8 abc	19,6 ± 11,1	74,7 abcd	25,6 ± 3,6	91,9 abc
		2	26 ± 6,6	96,6 abc	26,8 ± 2,5	97,6 abc	20,8 ± 5,0	73,3 abcd

Letras iguales significan que no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos para la prueba de medias de Kruskal-Wallis ($\alpha = 0,10$).

reportó, también, Monsalve *et al.* (2005), quienes evaluaron el efecto de la kinetina y la 6-BA en combinación con el 2,4-D sobre la formación de callos en pétalos y estaminodios de cacao. En el estudio encontraron la mejor respuesta en el medio de cultivo con 2,4-D y kinetina, dependiendo del genotipo y usando el pétalo como explante inicial.

Magyar-Tábori *et al.* (2010) mencionan que, la mayor eficiencia del 6-BA en la inducción de respuestas morfológicas pudiera relacionarse con su menor susceptibilidad a la degradación enzimática. Es posible que la cantidad de 6-BA en el medio fuera menor que la Kinetina, lo que presenta una mayor cantidad de forma libre, de fácil disponibilidad para los explantes (Buah *et al.* 2010). Asimismo, Klem *et al.* (2004) informaron que el 6-BA es químicamente más estable que otras citoquininas derivadas de purinas.

Con relación al tipo de explante, no se observaron diferencias significativas para un $P = 0,10$; puede afirmarse que, para esta etapa del cultivo, el explante no representó un factor que explique la variación en la respuesta, como ocurrió con el IC14. Esto puede deberse que, al final del subcultivo, la necrosis que afecta el tejido trajo como consecuencia una disminución en el crecimiento del callo.

Chanatásig (2004) observó que los callos embriogénicos de cacao cesaron su crecimiento y mostraron signos de necrosis, con una coloración café oscura como consecuencia de la acumulación de compuestos fenólicos. Otra razón que puede explicar esto, es que los callos embriogénicos formados en presencia de 2,4-D se bloquean en su desarrollo por la eliminación de este regulador de crecimiento; posteriormente, se da inicio a la producción y acumulación de auxina endógena en la periferia del callo, al aumentar la expresión de genes responsables de la biosíntesis de auxina (Su *et al.* 2009, Bai *et al.* 2013).

Durante la permanencia de los explantes en el medio de cultivo SCG, se observó la presencia de estructuras similares a embriones somáticos, en etapa globular, en la superficie del callo del genotipo CNM-4; aunque no llegaron a desarrollarse y tomaron una coloración marrón oscuro (Figura 2).

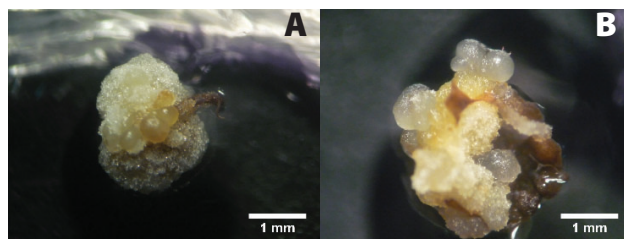


Figura 2. Detalle de explantes con estructuras similares a embriones somáticos en etapa globular en CNM-4 (3,5X). A: Estaminodio. B: Pétalo.

Lo anterior, coincide con Li *et al.* (1998), quienes observaron estas estructuras sobre estaminodios de cacao, al final del período de permanencia en un medio de cultivo suplementado con 2 mg.L^{-1} 2,4-D y $0,3 \text{ mg.L}^{-1}$ de kinetina. Gallego *et al.* (2016) reportaron que estas estructuras globulares tomaron una coloración marrón oscura en el genotipo de cacao ICS95 y explican que el oscurecimiento de las mismas se debe a la presencia de gran cantidad de polifenoles distribuidos al azar en el tejido y mezclados con polisacáridos y proteínas, lo cual detuvo el proceso de embriogénesis somática en cacao. Quiroz-Figueroa *et al.* (2001) también afirman que los compuestos fenólicos pueden actuar como inhibidores de la embriogénesis somática.

Por otro lado, Castellarin *et al.* (2011) mencionan que la producción de fenoles se relaciona, estrechamente, con los azúcares. Dai *et al.* (2014) afirman que, la síntesis de estos compuestos se incrementa con el uso de la glucosa durante el cultivo *in vitro* de *Vitis vinifera* L. y, se asocia a la expresión de genes estructurales y regulatorios. Quiñónez-Galvez *et al.* (2016) determinaron que la concentración de fenoles se incrementó en condiciones de oscuridad, a un mayor contenido de glucosa en el medio de cultivo. La máxima concentración de estos compuestos se detectó a los 14 días de cultivo de estaminodios de cacao.

Diferenciación de embriones somáticos.

Durante la permanencia de los callos en el medio sin reguladores de crecimiento, se mantuvo el proceso de necrosis iniciado en el subcultivo anterior. Los estaminodios no experimentaron esta necrosis, continuaron su crecimiento y conservaron su coloración amarilla crema. Eso ocurrió

con el resto de los cultivares, sin la formación de embriones somáticos.

La diferenciación de embriones somáticos ocurrió durante el segundo subcultivo en el medio sin reguladores de crecimiento, dos meses después de iniciado el cultivo. Sólo el genotipo SCA-6 resultó embriogénico y el número de embriones somáticos varió según la concentración de 2,4-D y su combinación con kinetina y 6-BA (Figura 3A, 3B, 3C y 3D). Se observó la presencia de

raíces en los callos embriogénicos (Figura 3E) y embriones somáticos en diferentes etapas de desarrollo: globular, corazón y torpedo (Figura 3D, 3F y 3G). En la Figura 3H se muestran proembriones de cacao en la parte interior del callo. Estas estructuras mostraron células con citoplasma denso y un núcleo prominente. No se observa la presencia de una protodermis definida como si ocurre en el embrión globular de la Figura 3I que muestra, además, células con una

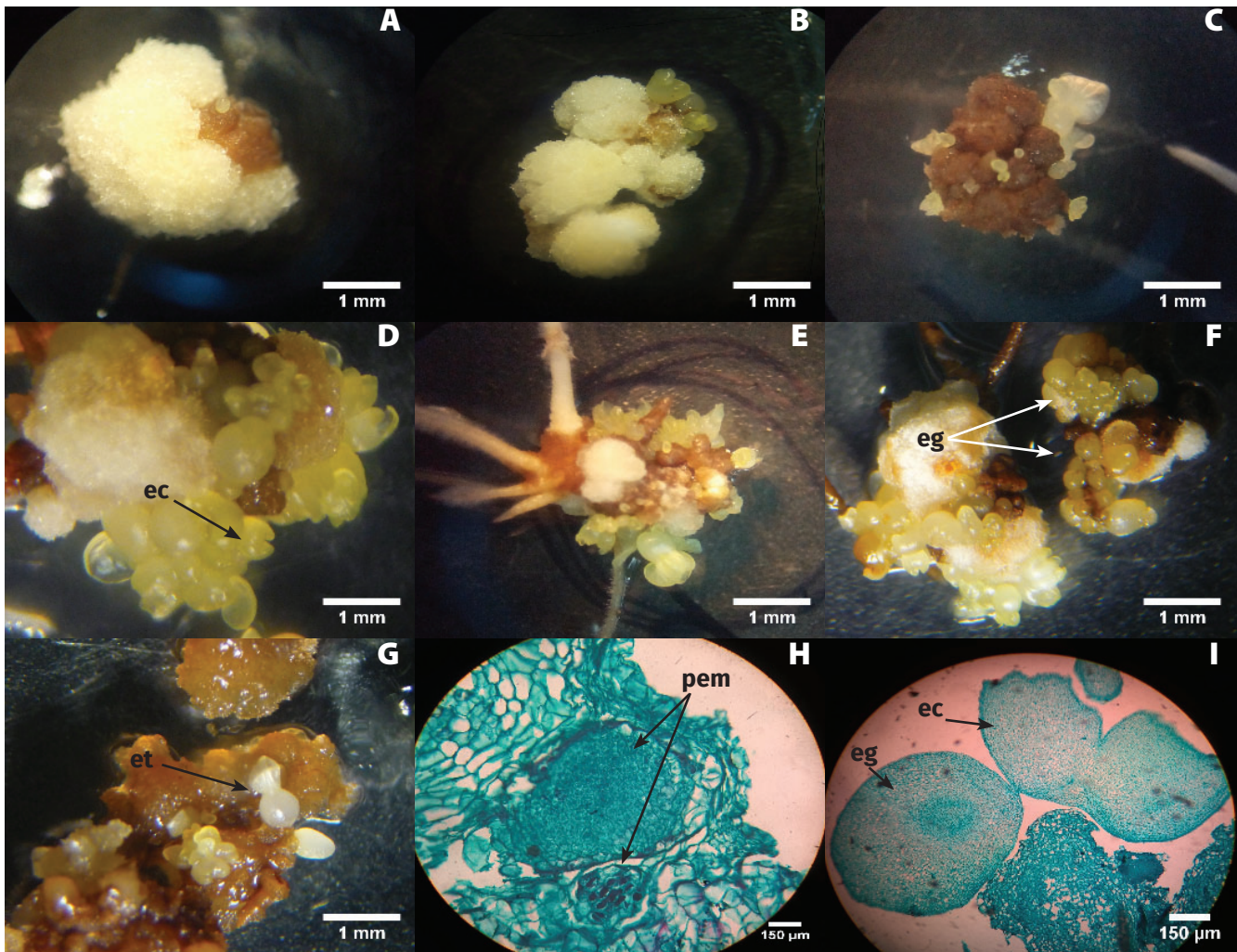


Figura 3. Callos embriogénicos de cacao cultivar SCA-6. **A:** Callo embriogénico de estaminodio con $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de 2,4-D. **B:** Callo embriogénico de estaminodio con 1 mg.L^{-1} de 2,4-D. **C:** Callo embriogénico de pétalo con $1,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de 2,4-D. **D:** Callo embriogénico de pétalo con 2 mg.L^{-1} de 2,4-D con embrión somático en etapa de corazón **E:** Callo embriogénico con raíces. **F:** Embriones somáticos en etapa globular. **G:** Embrión somático en etapa de torpedo dos meses después de iniciado el cultivo. **H:** Proembrión de cacao en el interior del callo (40X). **I:** Embriones somáticos en etapa globular y corazón (20X). **ec:** embrión en etapa de corazón, **eg:** embrión en etapa globular, **et:** embrión en etapa torpedo, **pem:** proembrión.

alta actividad mitótica. En la Figura 3, también se muestran embriones somáticos en transición hacia la etapa de corazón.

En la Figura 4 se muestra el número de embriones somáticos y la frecuencia embriogénica según su etapa de desarrollo en el cultivar SCA-6 para la combinación de 2,4-D y kinetina, y se presentó mayor frecuencia embriogénica en los pétalos cultivados en el medio que contenía 2 mg.L⁻¹ de 2,4-D (20 %) en comparación con los estaminodios, cuya frecuencia más alta fue de 16% en presencia de 1 mg.L⁻¹ de 2,4-D.

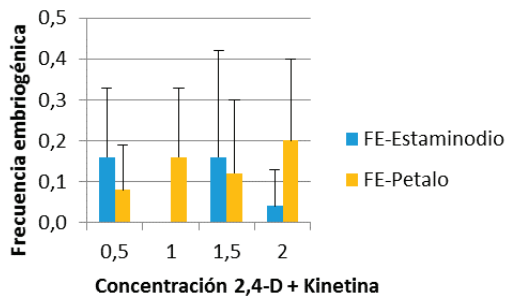


Figura 4. Frecuencia embriogénica con 2,4-D y Kinetina (0,3 mg.L⁻¹) en el genotipo SCA.

Con respecto al número de embriones somáticos, en la Figura 5 se muestra que los pétalos produjeron mayor valor; esto, cuando se utilizó 1,5 mg.L⁻¹ (16) y 2 mg.L⁻¹ de 2,4-D (13 embriones) en el medio de cultivo, en comparación con los estaminodios que solo produjeron seis embriones somáticos en el medio con 0,5 mg.L⁻¹ y cuatro en 1,5 mg.L⁻¹ de esta auxina (Figura 6).

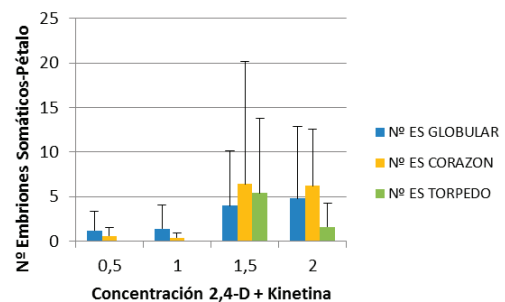


Figura 5. Embriones somáticos en pétalos del genotipo SCA-6 con 2,4-D y Kinetina (0,3 mg.L⁻¹)

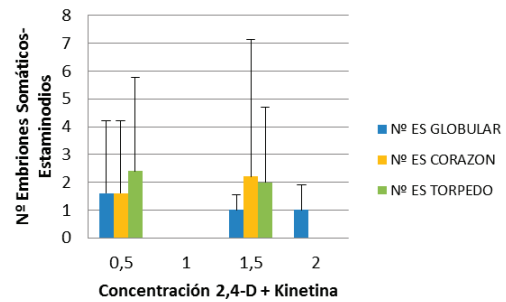


Figura 6. Embriones somáticos en estaminodios del genotipo SCA-6 con 2,4-D y Kinetina (0,3 mg.L⁻¹)

Los explantes expuestos a las diferentes concentraciones de 2,4-D en combinación con 6-BA mostraron la mayor frecuencia embriogénica, con un valor aproximado de 40 % en los estaminodios con 1,5 mg.L⁻¹ de 2,4-D (Figura 7).

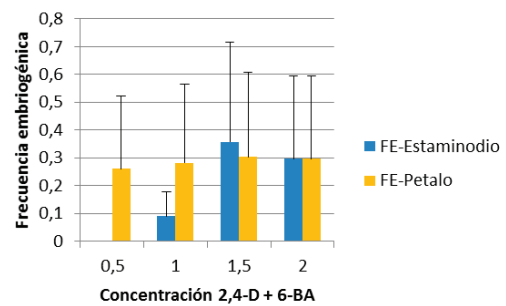


Figura 7. Frecuencia embriogénica con 2,4-D y 6-BA (0,05 mg.L⁻¹) en el genotipo SCA

Al comparar el número de embriones somáticos entre ambos explantes, se observa un mayor número de estos en los estaminodios (15 embriones), en comparación con los pétalos (12 embriones), en la combinación de 2 mg.L⁻¹ de 2,4-D con 0,05 mg.L⁻¹ de 6-BA. El número de embriones somáticos disminuyó en la medida en que la concentración de 2,4-D fue más baja (Figura 8A y 8B). Los resultados demuestran la influencia que tiene el tipo de explante inicial, la citoquinina y la concentración de auxina, en el desarrollo de embriones somáticos en alta frecuencia.

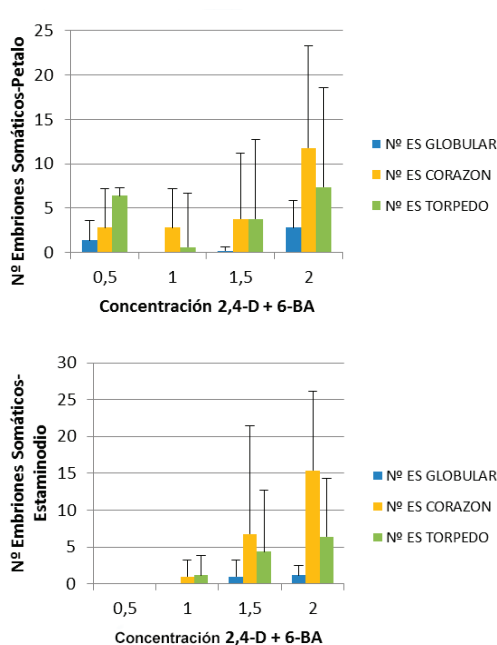


Figura 8. Embriões somáticos en pétalos (A) y estaminodios (B) con 2.4-D y 6-BA (0,05 mg.L⁻¹)

La 6-BA estimuló una mayor formación de embriões somáticos en comparación con la kinetina, según la concentración de la auxina. Los resultados coinciden con los obtenidos por Chanatásig (2004), en SCA-6, con la misma concentración de 2,4-D que se usó en la presente investigación. Quainoo y Dwomo (2012) mencionan una mayor formación de embriões somáticos y alta frecuencia embriogénica en estaminodios de cuatro genotipos de cacao, al utilizar las concentraciones de 2 mg.L⁻¹ de 2,4-D y 5 µg.L⁻¹ de TDZ.

El análisis de componentes principales indica una alta correlación entre las variables frecuencia embriogénica; número de embriões somáticos, en etapa de corazón y torpedo; número total de embriões somáticos con la concentración de reguladores de crecimiento y tipo de explante inicial.

En los tratamientos que mostraron mayor frecuencia embriogénica, se observó mayor presencia de embriões somáticos en etapa de corazón y torpedo (Figura 9A). Esto se encontró en pétalos y estaminodios cultivados en el medio con 1,5 y 2 mg.L⁻¹ de 2,4-D en combinación con 0,05 mg.L⁻¹ de 6-BA y 0,3 mg.L⁻¹ de kinetina. Los resultados

coinciden con los reportados por García *et al.* (2016). Esos autores mencionan un mayor número de embriões somáticos formados en los pétalos cultivados en presencia de ambas citoquininas, con variación en la respuesta, según el genotipo y el tipo de explante. Las variables IC14 y IC28 tuvieron una baja correlación, con las variables respuesta de embriogénesis somática en cacao. Esto indica que la formación de callo no está asociada a la formación de embriões somáticos, porque no todas las células son capaces de diferenciarse para formar estas estructuras (Figura 9A).

El primer componente principal contribuyó con el 61,3 % de la variabilidad total explicada. Las variables que más contribuyeron de forma positiva con este componente fueron la frecuencia embriogénica, número de embriões somáticos en etapa de corazón y torpedo, y el número total de embriões somáticos. De forma secundaria lo hizo el IC28 y la contribución negativa hacia el primer componente vino de la variable IC14. Con relación al segundo componente principal, este contribuye con el 16,5 % de la varianza total explicada. Según los coeficientes del segundo vector propio y de correlación, las variables que más contribuyeron de forma positiva a este componente fueron el IC14 y el IC28. Los estaminodios cultivados en 1,5 mg.L⁻¹ de 2,4-D y 0,05 mg.L⁻¹ de 6-BA tuvieron IC28 mayores que el resto de los tratamientos. Ambos componentes explican el 77,8 % de la variabilidad.

La Figura 9B sugiere que los embriões somáticos en etapa de corazón y torpedo se formaron cuando los estaminodios se cultivaron en un medio de cultivo con 2 mg.L⁻¹ de 2,4-D y 0,05 mg.L⁻¹ 6-BA. La respuesta de los pétalos estuvo asociada a las concentraciones de 0,5 y 1,5 mg.L⁻¹ de 2,4-D obteniéndose un mayor número de embriões somáticos en estas concentraciones. La formación de embriões en etapa globular fue mayor en los medios de cultivo suplementados con kinetina sin importar el tipo de explante inicial y la concentración de 2,4-D.

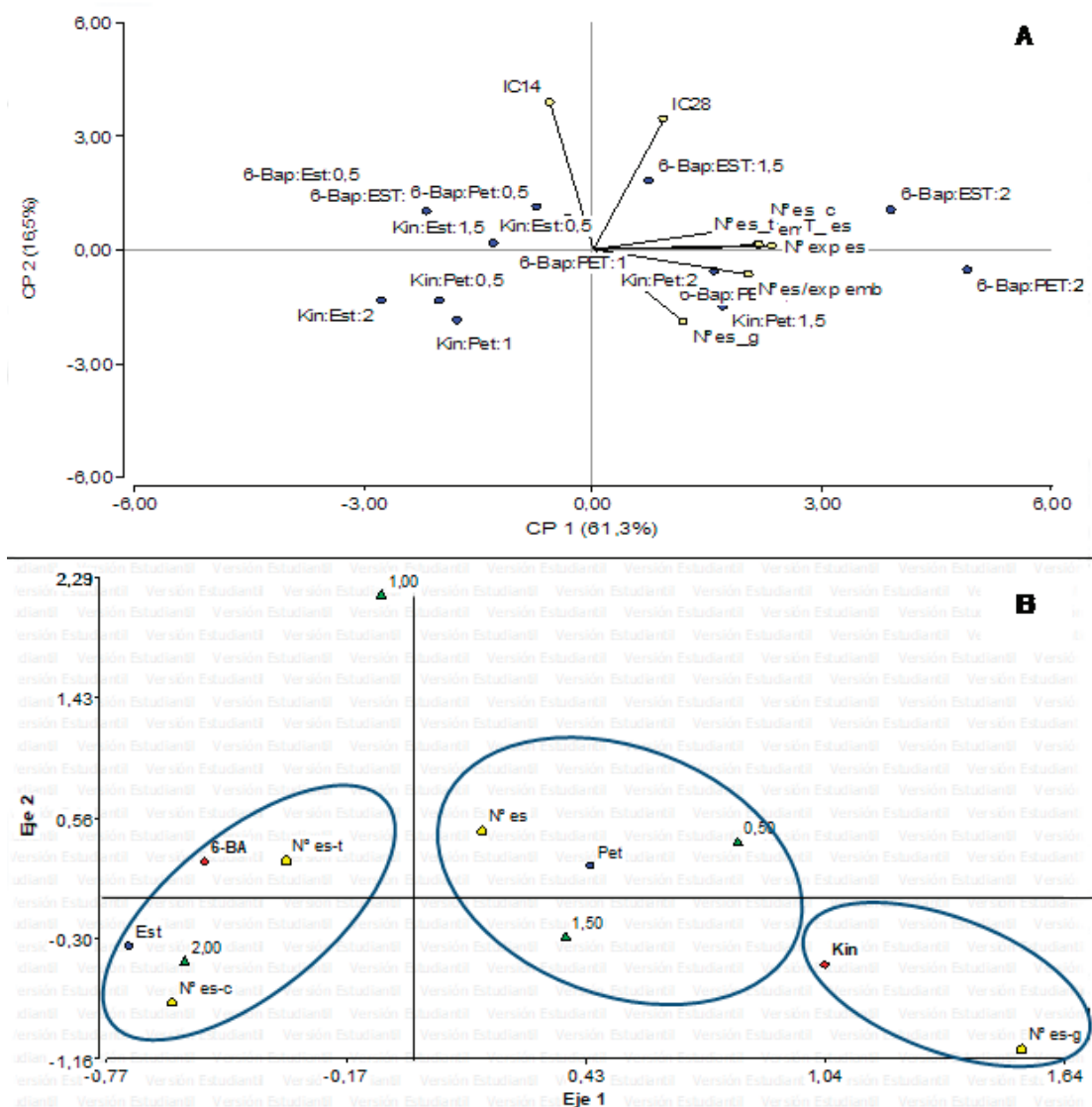


Figura 9. **A:** Análisis de componentes principales de las variables evaluadas en la embriogénesis somática en el genotipo de cacao SCA-6. **B:** Análisis de correspondencias múltiples para las variables tipo de explante, fuente de citocinina, concentración de 2,4-D y etapa de desarrollo del embrión somático en SCA-6. **6-BA:** 6-benciladenina, **Est:** estaminodio, **es:** embriones somáticos, **Nº es-c:** número de embriones somáticos en etapa corazon, **Nº es-g:** número embriones somáticos en etapa globular, **Nº es-t:** número embriones somáticos etapa torpeda, **IC14:** índice de desarrollo de callo a los 14 días de cultivo, **IC28:** índice de callo a los 28 días de cultivo, **Kin:** kinetina, **pet:** pétalo.

Con relación a la conversión de los embriones somáticos a plántulas, se logró la germinación de aproximadamente 56 embriones somáticos en el genotipo SCA-6, en el mismo medio de cultivo sin reguladores de crecimiento. En las Figuras 10A, 10B y 10C, se muestra el proceso de germinación de un embrión somático de

cacao; en la Figura 10D se muestran embriones del genotipo SCA-6 germinados, después de un mes de permanencia en el medio de cultivo sin reguladores. Estos embriones se caracterizaron por tener una coloración blanquecina, con cotiledones pequeños y de color blanco, y produjeron raíces con hipocótilos largos (Figura 10D).

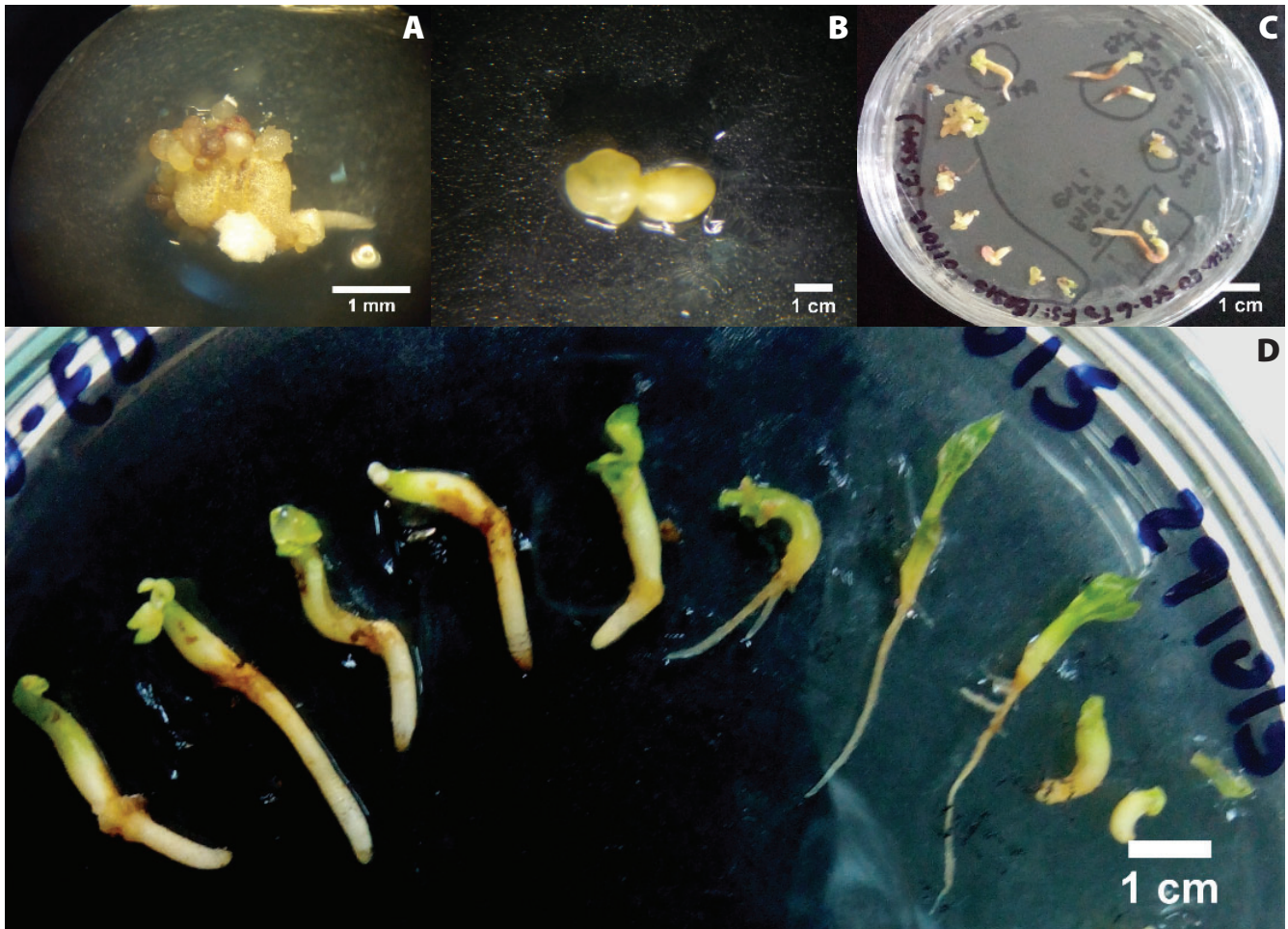


Figura 10. **A:** Callo con estructuras similares a embriones somáticos y presencia de raíces en el genotipo CNM-4 (3,5X). **B:** Embrión somático en etapa de torpedo del genotipo SCA-6 (3,5X). **C:** Proceso de germinación de embriones somáticos de cacao en medio de cultivo sin reguladores de crecimiento. **D:** Inicio de conversión de embriones somáticos a plántula en SCA-6.

CONCLUSIONES

Se logró inducir la embriogénesis somática en cacao a partir de explantes florales en los genotipos SCA-6 y CNM-4. El genotipo SCA-6 fue el único que formó embriones somáticos en distintas etapas de desarrollo. El genotipo CNM-4 sólo formó embriones somáticos en etapa globular y en el OC-60 solo hubo formación de callo.

Las concentraciones de 2,4-D (1,5 y 2 mg.L⁻¹) en combinación con 0,3 mg.L⁻¹ de kinetina indujeron una mayor cantidad de embriones somáticos en los pétalos de SCA-6. La mayor cantidad de embriones formados en los estaminodios ocurrió

con 2 mg.L⁻¹ de 2,4-D combinado con 0,5 mg.L⁻¹ de 6-BA, en el mismo genotipo.

La oxidación fenólica fue un factor limitante en el desarrollo de los embriones somáticos en el genotipo CNM-4.

Se observó una respuesta diferencial en el proceso de embriogénesis somática en cacao con influencia del genotipo y el tipo de explante.

LITERATURA CITADA

- Bai B, Su YH; Yuan, J; Zhang, XS. 2013. Induction of somatic embryos in *Arabidopsis* requires local *YUCCA* expression mediated by the down-regulation of ethylene biosynthesis (en línea). *Molecular Plant* 6(4): 1247–1260. Consultado: 05 feb. 2017. Disponible en: <https://bit.ly/3lalwQ6>
- Buah, JN; Danso, E; Taah, KJ; Abole, EA; Bediako, EA; Asiedu, J; Baidoo, R. 2010. The effects of different concentrations cytokinins on the *in vitro* multiplication of Plantain (*Musa* sp.) (en línea). *Biotechnology* 9(3): 343-347. Consultado: 28 ene. 2017. Disponible en: <https://bit.ly/3j34nHpf>.
- Bustami, MU; Werbrouck, S. 2018. Somatic Embryogenesis in elite indonesian cacao (*Theobroma cacao* L.). In: Jain, S; Gupta, P. (eds.) *Step Wise Protocols for Somatic Embryogenesis of Important Woody Plants*. Forestry Sciences. Cham, Switzerland, Springer. Vol 85: 73-81. (en línea). Consultado: 01 jun. 2018. Disponible en: <https://bit.ly/34qFGR7>
- Castellarin, SD; Gambetta, GA; Wada, H; Shackel, KA; Matthews, MA. 2011. Fruit ripening in *Vitis vinifera*: spatiotemporal relationships among turgor, sugar accumulation, and anthocyanin biosynthesis (en línea). *Journal of Experimental Botany* 62 (12): 4345-4354. Consultado 08 de sep. 2018. Disponible en: <https://bit.ly/319jGAo>
- Celestino, C; Hernández, I; Carneros, E; López-Vela, D; Toribio, M. 2005. La embriogénesis somática como elemento central de la biotecnología forestal. *Investigación Agraria: Sistema y Recursos Forestales* 14(3): 345-357.
- Chatanásig, CI. 2004. Inducción de la embriogénesis somática en clones superiores de cacao (*Theobroma cacao* L.), con resistencia a enfermedades fungosas. Tesis M.Sc. Turrialba, Costa Rica. CATIE. 86p.
- Conover, WJ. 1999. *Practical Nonparametric Statistics*. 3ed. John Wiley & Sons, Inc., New York. 584p.
- Dai, ZW; Meddar, M; Renaud, C; Merlin, I; Hilbert, G; Delrot, S; Gomès, E. 2014. Long-term *in vitro* culture of grape berries and its application to assess the effects of sugar supply on anthocyanin accumulation (en línea). *Journal of Experimental Botany* 65 (16): 4665-4677. Consultado 08 sep. 2017. Disponible en: <https://bit.ly/3gkmCGP>
- Díaz-López, AA; Sánchez, D; Valera-Leal, J; Vegas García, AL. 2015. Formación de embriones somáticos en cinco cultivares de *Theobroma cacao* L. cultivados en Venezuela (en línea). *Biotecnología Vegetal* 15 (1): 27-34. Consultado 19 ago. 2018. Disponible en: <https://bit.ly/34IKZBx>
- Di Rienzo, JA; Casanoves, F; Balzarini, MG; González, L; Tablada, M; Robledo, CW. 2016. *Infostat* (en línea, programa informático). Córdoba, Argentina. Universidad Nacional de Córdoba. Consultado 12 feb. 2016. Disponible en: <https://bit.ly/3gksaB0>
- Driver, JA; Kuniyuki, AH. 1984. *In vitro* propagation of paradox walnut rootstock. *Hortscience* 19:507-509.
- Gallego, AM; Henao, AM; Urrea, AI; Atehortúa, L. 2016. Polyphenols distribution and reserve substances analysis in cocoa somatic embryogenesis (en línea). *Acta Biológica Colombiana* 21(2): 335-345. Consultado 28 ago. 2016. Disponible en: <https://bit.ly/31fLF9A>.
- Garate-Navarro, MA; Arévalo-Gardini, E. 2017. Induction of somatic embryogenesis from cocoa farmer field collection of ICT – Peru (en línea). *International Annals of Science* 2(1): 6-11. Consultado: 16 jun. 2018. Disponible: <https://bit.ly/2FJtBfD>.
- García, C; Correa, F; Findley, S; Almeida, AA; Costa, M; Motamayor, JC; Schnell, R; Marelli, JP. 2016. Optimization of somatic embryogenesis procedure for commercial clones of *Theobroma cacao* L. (en línea). *African Journal of Biotechnology* 15(36): 1936-1951. Consultado: 03 mar. 2017. Disponible en: <https://bit.ly/3gow4bT>.

- García, C; Marelli, JP; Motamayor, JC; Villela, C. 2018. Somatic embryogenesis in *Theobroma cacao* L. (en línea) En: Loyola-Vargas V; Ochoa-Alejo N. (eds) Plant cell culture protocols, Methods in Molecular Biology 1815: 227-245. New York, United States. Human Press. Consultado: 01 oct. 2018. Disponible en: <https://bit.ly/34qdJZL>.
- Gómez, R. 1998. Embriogénesis somática. En: Alvarado, Y; Gómez, R; Jiménez, E; Orellana, P. (eds.). Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. Santa Clara, Cuba. Instituto de Biotecnología de las Plantas (IBP). v.1. p. 57-79.
- Guo, B; Haider, B; Zeb, A; Xu, LL; Wei, YH. 2011. Thidiazuron: A multi-dimensional plant growth regulator. African Journal of Biotechnology 10(45): 8984-9000.
- Henao, AM; Vásquez, T; Ospina, TM; Atehortúa, L; Urrea, AI. 2018. Evaluation of the potential of regeneration of different Colombian and commercial genotypes of cocoa (*Theobroma cacao* L.) via somatic embryogenesis (en línea). Scientia Horticulturae 229: 148-156. Consultado 31 may. 2018. Disponible en: <https://bit.ly/32gcp9i>
- Jheng, FY; Do, YY; Liauh, YW; Chung, JP; Huang, PL. 2006. Enhancement of growth and regeneration efficiency from embryogenic callus cultures of *Oncidium 'Gower Ramsey'* by adjusting carbohydrate sources. Plant Science 170: 1133-1140.
- Klem, M; Balla, J; Machackova, BI; Eder, J; Prochazka, S. 2004. The uptake and Metabolism of Benzylaminopurine in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) and Cucumber (*Cucumis sativus* L.) explants. Plant Growth Regulator 31(1):135-142.
- Kouassi, KM; Kaia, J; Kouame, C; Tah, MG; Koffi, EK. 2017. Comparing the effect of plant growth regulators on callus and somatic embryogenesis induction in four elite *Theobroma cacao* L. genotypes (en línea). Hortscience 52(1):142-145. Consultado: 23 jun. 2018. Disponible en: <https://bit.ly/3aKWaEW>.
- Li, Z; Traore, A; Maximova, S; Guiltinan, M. 1998. Somatic embryogenesis and plant regeneration from floral explants of cacao (*Theobroma cacao* L.) using Thidiazuron. In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant 34: 293-299.
- Lloyd, G; McCown, B. 1981. Commercially feasible micropropagation of Mountain Laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. Combined Proceedings, International Plant Propagators Society 30: 421-427.
- Magyar-Tábori, K; Dobránszki, J; Teixeira da Silva, JA; Bulley, SM; Hudák, I. 2010. The role of cytokinins in shoot organogenesis in Apple (en línea). Plant Cell Tiss Organ Cult. 101:251-267. Consultado: 28 ene. 2018. Disponible en: <https://bit.ly/2EmEEee>
- Monsalve, LS; Garcia, CY; Sigarrosa, A. 2005. Obtención de embriones somáticos primarios de *Theobroma cacao* en clones de interés regional para el Departamento Norte de Santander, Colombia. Revista de la Universidad Francisco de Paula 1: 21-29.
- Quainoo, AK; Dwomo, BI. 2012. The effect of TDZ and 2,4-D concentrations on the Induction of Somatic Embryo and Embryogenesis in Different Cocoa Genotypes. Journal of Plant Studies 1 (1): 72-78.
- Quintero, ML; García, LN. 2010. La producción de cacao en Venezuela: Hacia una nueva ruralidad. Actualidad Contable FACES 13(20): 114-123.
- Quintero, ML; Anido, JD; Azuaje, A. 2017. El consumo de cacao en Venezuela y en el mundo desde una perspectiva sostenible (1960-2014) (en línea). Agroalimentaria 23(45): 23-49. Consultado 18 mar 2018. Disponible en: <https://bit.ly/3heRZ6N>
- Quiñones-Galvez, J; Hernández de la Torre, M; Quirós Molina, Y; Capdesuñer Ruiz, Y; Trujillo Sánchez, R. 2016. Factores que controlan el contenido de fenoles en el cultivo de callos de *Theobroma cacao* (en línea). Cultivos Tropicales 37: 118-126. Consultado 20 ago. 2018. Disponible en: <https://bit.ly/2FCWIKH>

- Quiroz-Figueroa, F; Mendez-Zeel, M; Larque-Saavedra, A; Layola-Vargas, V. 2001. Picomolar concentrations of salicylates induce cellular growth and enhance somatic embryogenesis in *Coffea Arabica* tissue culture. *Plant Cell Reports* 20: 679-684.
- Ramos, G.; A. Gómez. 2002. Propagación del cacao: Injerto parche. Centro de Investigaciones Agropecuarias del Estado Mérida. Maracay, Venezuela. INIA. 26p. (Serie D, N°2).
- Su, YH; Zhao, XY; Liu, YB; Zhang CL; O'Neill, SD; Zhang, XS. 2009. Auxin-induced *WUS* expression is essential for embryonic stem cell renewal during somatic embryogenesis in *Arabidopsis* (en línea). *The Plant Journal* 59(3): 448–460. Consultado: 05 feb. 2017. Disponible en: <https://bit.ly/3glcY6u>
- Velásquez, R; Sandrea, Y; Betancourt, C; Mata, J. 2006. Embriogénesis somática en cultivares de cacao venezolano. *Agronomía Tropical* 56(1):61-74.
- Williams, EG; Maheswaran, G. 1986. Somatic Embryogenesis: Factors Influencing Coordinated Behaviour of Cells as an Embryogénie Group. *Annals of Botany* 57: 443-462.