

## 2iP AND BRASINOSTEROIDS PROMOTE SOMATIC EMBRYOGENESIS INDUCTION IN *Theobroma cacao* L.

### 2iP Y BRASINOSTEROIDES PROMUEVEN LA INDUCCIÓN DE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN *Theobroma cacao* L.

Iracheta-Donjuan, L.<sup>1\*</sup>; Cruz-López, L.A.<sup>1</sup>; López-Gómez, P.<sup>1</sup>; Avendaño-Arrazate, C.H.<sup>1</sup>; Ortiz-Curiel, S.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Campo Experimental Rosario Izapa, km 18, Carretera Tapachula-Cacahoatán, C.P. 30870, Tuxtla Chico, Chiapas, México.

\*Autor de correspondencia: iracheta.leobardo@inifap.gob.mx

#### ABSTRACT

**Objective:** To evaluate the effect of explant type, phytohormones and brassinosteroid in somatic embryos induction in *Theobroma cacao* L. genotypes.

**Design/methodology/approach:** Completely randomized design with factorial arrangement 3x4x2x2 was used. Three genotypes were evaluated (Carmelo, H13xUF-273 and PA-169xUF-273), four combinations of phytohormones (4.52  $\mu$ M 2,4-D/ 1.16  $\mu$ M Kinetin; 4.52  $\mu$ M 2,4-D/0.02  $\mu$ M 2ip; 4.52  $\mu$ M 2, 4-D/0.02  $\mu$ M TDZ; 4.52  $\mu$ M 2, 4-D/3.91  $\mu$ M 2, 4, 5-T), two explants (petal/staminodium) and absence and presence of 0.02  $\mu$ M of 24-epibrassinolide. Forty-eight treatments were incubated in darkness for 63 days. Percentage of explants with callus, explants with embryos and embryos per explant were evaluated.

**Results:** For explants with callus, only genotype factor had significant differences, so H13xUF-273 induced highest percentages (87%); for explants with embryos, culture medium with 2,4-D (4.52  $\mu$ M)/2ip (0.02  $\mu$ M) presented highest values for somatic embryos induction (n=44). In treatment of staminodium with 2,4-D/2ip and epibrassinolide, Carmelo genotype induced one embryo per explant; while H13xUF-273 in treatment of petals with 2,4-D/2ip and without epibrassinolide induced 1.7 embryos per explant. In PA-169xUF-273, 0.5 embryos were obtained per explant with staminodes in 2,4-D/kinetin and epibrassinolide.

**Limitations on study/implications:** In three genotypes, petal explants without epibrassinolide were more prone to develop roots of the initially formed callus.

**Findings/conclusions:** Genotypes evaluated have different embryogenic capacity, although the combination of 2iP with epibrassinolide improves the induction of embryos and obtaining complete plants.

**Keywords:** Cocoa, micropropagation, 24-epibrassinolide, 2-isopentenyladenine.

#### RESUMEN

**Objetivo:** Evaluar el efecto del tipo de explante, fitoreguladores y brasinoesteroide en la inducción de embriones somáticos en genotipos de *Theobroma cacao* L.

**Diseño/metodología/aproximación:** Se evaluaron los genotipos Carmelo, H13xUF-273 y PA-169xUF-273, con cuatro combinaciones de fitoreguladores (2,4-D 4.52  $\mu$ M/ Kinetina 1.16  $\mu$ M; 2,4-D 4.52  $\mu$ M/2ip 0.02  $\mu$ M; 2,4-D 4.52  $\mu$ M/TDZ 0.02  $\mu$ M; 2,4-D 4.52  $\mu$ M/2,4,5-T 3.91  $\mu$ M), dos explantes (pétalo/estaminodio) y la ausencia/presencia de 0.02  $\mu$ M de 24-epibrasinólida. Los 48 tratamientos se incubaron en oscuridad durante 63 d. Fue evaluado el porcentaje de explantes con callo, explantes con embriones y embriones por explante.

**Resultados:** Respecto al porcentaje de explantes con callo, solo el factor genotipo propició diferencias significativas, donde H13xUF-273 indujo los porcentajes más elevados (87%); mientras que para explantes con embriones, el medio DKW con 2,4-D 4.52  $\mu$ M/2ip 0.02  $\mu$ M registró mayor inducción de embriones somáticos (n=44). Carmelo, generó la aparición de un embrión por explante en el tratamiento de estaminodio con 2,4-D/2ip y epibrasinólida; mientras el H13xUF-273 con pétalos en 2,4-D/2ip y sin epibrasinólida indujo 1.7 embriones por explante. En PA-169xUF-273 se lograron 0.5 embriones por explante con estaminodios en DKW con 2,4-D/kinetina y epibrasinólida.

**Agroproductividad:** Vol. 12, Núm. 1, enero. 2019. pp: 65-70.

**Recibido:** octubre, 2018. **Aceptado:** diciembre, 2018.

**Limitaciones del estudio/implicaciones:** En los tres genotipos, los explantes de pétalo sin epibrasinólida fueron más propensos a desarrollar raíces del callo inicialmente formado.

**Hallazgos/conclusiones:** Los genotipos evaluados presentan diferente capacidad embriogénica, aunque la combinación de 2iP con epibrasinólida mejora la inducción de embriones y la obtención de plantas completas.

**Palabras clave:** Cacao, micropropagación, 24-epibrasinólida, 2-isopenteniladenina.

## INTRODUCCIÓN

**La producción** de cacao (*Theobroma cacao* L.) en México ha disminuido en la última década; de tal forma que en la actualidad se cuenta con 59,920 ha, de las cuales se cosechan 23,763 t, con escasamente un promedio de 0.404 t ha<sup>-1</sup> (SIAP 2017). Lo anterior es debido al derribo de plantaciones y cambio de uso de suelo, provocados por la llegada en el 2005 de la moniliasis *Moniliophthora roreri* Cif & Par. En este sentido, el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) ha logrado el desarrollo de nuevos genotipos criollos con alta calidad, así como nuevas variedades y genotipos élites con diferente grado de tolerancia a moniliasis (Avendaño-Arrazate *et al.*, 2018). No obstante, los genotipos élites requieren ser propagados vegetativamente para conservar las características seleccionadas.

Las técnicas *in vitro* son una alternativa importante para la regeneración de plantas libres de enfermedades en espacios reducidos (Quainoo y Dwomo, 2012). La embriogénesis somática (ES) es una alternativa para la producción de estructuras vegetativas con dos polos de crecimiento (vástago y raíz) similares a los embriones gaméticos. Existen reportes relacionados con la inducción, multiplicación a gran escala y regeneración exitosa de cacao por ES (Maximova *et al.*, 2002; Guiltinan y Maximova, 2010). Una limitante es que los genotipos no siempre responden de igual forma a la inducción de la ES. Lo anterior se debe a la condición recalcitrante de la especie, causada por la liberación de compuestos fenólicos que provoca que algunas células embriogénicas no se diferencien a embriones somáticos (Alemanno *et al.*, 2003), así como a las necesidades ambientales *in vitro* particulares para cada genotipo. De tal forma que el éxito en la formación de embriones somáticos primarios, dependerá de múltiples factores, tales como el genotipo, sales inorgánicas, agentes osmóticos, metales pesados, pH, temperatura, oxigenación y el balance de reguladores del crecimiento (Iracheta-Donjuan, 2009; García *et al.*, 2018).

Con base a lo anterior, la etapa de inducción de embriones primarios es de especial interés, ya que sin ésta no es posible ninguna de las etapas posteriores. Esto último puede ser posible mediante la formación de callo embriogénico con mayor potencial para la formación de embriones en medios líquidos (Guillou *et al.*, 2018). Por tal motivo es importante la búsqueda de combinaciones de reguladores del crecimiento que induzcan un balance hormonal interno y externo que favorezca la ES, sobre todo en genotipos

con poca capacidad morfogénica *in vitro*. Al respecto, Monsalve *et al.* (2005) reportaron el efecto de la kinetina y el BAP en la formación de embriones de cacao; registrando que la kinetina generó mayor número de embriones promedio, con 2.2 embriones por callo. Quainoo y Dwomo (2012) reportan que la combinación de bajas concentraciones del ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y tidiazuron (TDZ) generan mayor proporción de embriones somáticos normales en un genotipo de cacao. Por su parte, el uso de brasinosteroides para la inducción de la ES primaria en cacao, no ha sido abordado, por lo cual se desconoce si en interacción con citocininas, es capaz de mejorar la frecuencia embrionaria. Recientemente, para *Coffea arabica* L., se ha reportado que la adición de 24-epibrasinólida al medio de cultivo con citocininas, mejora la diferenciación de la ES, e incluso mejora la estructura morfo-histológica de los embriones (Chone *et al.*, 2018). Por tal motivo, el objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto del tipo de explante, fitorreguladores y brasinosteroides en la inducción de embriones somáticos en tres genotipos de *T. cacao*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El material biológico consistió en botones florales de los genotipos Carmelo, H13×UF-273 y PA-169×UF-273, en antesis entre 5 y 7 mm, los cuales fueron asperjados con fungicida azoxystrobin 50% a 1.5 g L<sup>-1</sup> durante 10 d previo al establecimiento *in vitro*. Se seleccionaron únicamente botones libres de oxidación, enfermedades o ataque de insectos. Los botones florales fueron lavados con detergente común y agua corriente para eliminar impurezas. En condiciones

asépticas fueron desinfectadas superficialmente con una solución de hipoclorito de sodio (NaClO) a una concentración de 2% (v/v) durante 15 min, posteriormente se enjuagaron con agua destilada esterilizada por tres ocasiones.

Se evaluaron ocho medios de cultivo producto de cuatro diferentes combinaciones de fitorreguladores [4.52  $\mu\text{M}$  de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D)/1.16  $\mu\text{M}$  de Kinetina; 4.52  $\mu\text{M}$  de 2,4-D/0.02  $\mu\text{M}$  de isopenteniladenina (2ip), 4.52  $\mu\text{M}$  de 2,4-D/0.02  $\mu\text{M}$  de tidiazurón (TDZ), 4.52  $\mu\text{M}$  de 2,4-D/3.91  $\mu\text{M}$  de 2,4,5-triclorofenoxiacético (2,4,5-T)] y la presencia o ausencia de 0.02  $\mu\text{M}$  de 24-epibrasinolida. Se utilizó como medio basal el DKW (Driver y Kuniyuki, 1984), con un pH de 5.7, gelificado con Gelrite (3 g L<sup>-1</sup>). Los diferentes medios de cultivo se esterilizaron a 121 °C 15 lb por 20 min, al término de lo cual se vaciaron 10 mL en caja Petri de 60×15 mm en condiciones asépticas.

Por cada genotipo se evaluaron 16 tratamientos, producto de la combinación de ocho medios de cultivo y dos tipos de explante; pétalo/estaminodio. Cada tratamiento con 10 repeticiones, la unidad experimental fue una caja Petri con cinco explantes de pétalos y estaminodios.

Los explantes sembrados y herméticamente sellados se incubaron durante 21 d en los tratamientos ya mencionados; al término de este tiempo fueron transferidos en su totalidad al medio de expresión, consistente en el medio DKW sin reguladores del crecimiento donde permanecieron 42 d más. Durante los 63 d que duró el experimento, los explantes se mantuvieron en condiciones de oscuridad a 26±1 °C. Se evaluó

el porcentaje de explantes con callo, porcentaje de explantes con embriones, número de embriones y porcentaje de explantes con raíces.

Se utilizó un diseño completamente al azar con arreglo factorial y el análisis de varianza se realizó con la ayuda del paquete estadístico SAS versión 9.0 y para la comparación de medias se utilizó la prueba de Tukey con una significancia de 0.05.

Una muestra de embriones cotiledonares generados en los tratamientos fueron transferidos al medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962) con 0.57  $\mu\text{M}$  de ácido giberélico y 0.05  $\mu\text{M}$  de ácido naftalenacético, 1.0  $\mu\text{M}$  de 2iP y 3.7  $\mu\text{M}$  de ácido absísico, lo anterior con el fin de completar su maduración. Posteriormente, los embriones fueron transferidos para su enraizamiento hasta la formación de plántulas con al menos un par de hojas expandidas. Las plántulas obtenidas fueron aclimatadas en un sustrato de turba de esfagno en condiciones de invernadero, dentro de charolas con domo de plástico transparente con 90% de humedad relativa.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De acuerdo al análisis factorial, los efectos más importantes se observaron de forma individual en los factores y sus niveles. Para el porcentaje de callogénesis se registraron diferencias significativas para el factor genotipo, donde el cruzamiento H13×UF-273 indujo los porcentajes más elevados de explantes con formación de callo, comparado con los otros dos genotipos. Sin embargo, el tipo de combinación de reguladores en el medio de cultivo, así como el tipo de explante y presencia de epibrasinólida no indujeron diferencias significativas ( $P \leq 0.05$ ) en la formación de callo (Cuadro 1). No obstante, la mayor o menor producción de callo por los tratamientos, no estuvo correlacionada con la formación de embriones o raíces. Aunque la producción de embriones puede ocurrir de forma directa a partir del tejido somático original, o a partir de callo, es deseable que éste último sea de tipo embriogénico, situación que no siempre ocurre durante la producción de embriones primarios (Guillou *et al.*, 2018).

Para las variables embriogénesis y embriones por explante no se registraron diferencias significativas entre genotipos, tipo de explante y epibrasinólida; aun y cuando el porcentaje de explantes con embriones fue entre 2.6 y 3 veces mayor en ambos cruzamientos que el genotipo Carmelo; así como de 2.2 a 2.7 veces más embriones en estos mismos cruzamientos respecto a Carmelo (Cuadro 1).

Las diferencias estadísticas registradas indican que los genotipos utilizados tienen diferente capacidad morfogénica *in vitro* y, por lo tanto, diferente grado de competencia celular para tomar la ruta de la ES. Aun y cuando ambos cruzamientos están emparentados, ya que comparten al progenitor UF-273, es notoria una segregación en la respuesta de ambos para las variables estudiadas. Resultados similares fueron reportados por Quainoo y Dwomo (2012), quienes, en 16 genotipos de cacao, solo cuatro de ellos presentaron alta frecuencia en formación de embriones. Maximova *et al.* (2002), consideran que aparte de los factores asociados con el genotipo, la

baja inducción de ES puede deberse al estado fisiológico de los botones.

Para el factor tipo de regulador adicionado al medio DKW con 4.52  $\mu\text{M}$  de 2,4-D; tanto el porcentaje de explantes con embriones como el número de embriones totales inducidos por cada regulador, presentaron diferencias significativas ( $P \leq 0.05$ ). Si bien la adición de 1.16  $\mu\text{M}$  de Kinetina y 0.02  $\mu\text{M}$  de 24-epibrasinólida, indujeron mayor actividad embriogénica que el TDZ y 2,4,5-T, la adición al medio de 2iP elevó la respuesta embriogénica de manera general (Cuadro 1). Lo anterior difiere del reporte de Quainoo y Dwomo (2012), donde el medio con TDZ y 2,4-D fue la mejor combinación para la inducción de la ES en al menos cuatro genotipos de cacao. Por su parte Guiltinan y Maximova (2010), consignan para la inducción de embriones primarios en cacao, el uso de TDZ y 2,4-D (medio PCG) durante 14 d, para después subcultivar y mantenerlos por 14 d en un medio con BAP y 2,4-D (medio SCG). Mientras que, en el presente trabajo, la combinación de TDZ y 2,4-D, propició baja producción de callo y nula formación de embriones. Sin embargo, los resultados de las investigaciones de Chone et al. (2018) son similares a las re-

portadas en este trabajo, pues señalan que el cultivo de hojas de *Coffea arabica*, en medio MS con 24-epibrasinólida en asociación con 2iP produce 6.8 veces más embriones somáticos que los explantes solo con 2,4-D.

Para las tres variables señaladas hubo diferencias significativas ( $P \leq 0.05$ ) entre tratamientos. Por lo tanto, en los constituidos por el genotipo Carmelo (T1 al T16), no se registraron diferencias estadísticas entre ellos. Aun y cuando los tratamientos T6, T13 y T14 fueron los únicos en generar 10% de explantes con embriones, solo el tratamiento T14 (estaminodio con 2iP y epibrasinólida) mejoró el número de embriones totales (Cuadro 2 y Figura 1 A, B).

En el caso del genotipo H13xUF-273 (T17 al T32), los tratamientos T18 (pétalo con 2iP) y T22 (pétalo con 2iP y epibrasinólida), indujeron mayor actividad embriogénica de forma significativa con respecto al testigo T17 (pétalos con Kinetina), mientras que en el cruzamiento PA-169xUF-273, los tratamientos T45 (estaminodio con Kinetina y epibrasinólida) y T46 (estaminodio con 2iP y epibrasinólida) solo numéricamente superaron al testigo T41 (estaminodio con Kinetina), en el porcentaje de explantes con embriones; pero no para el número de embriones totales; ya que éste (testigo) indujo mayor cantidad de embriones, con 3.4 a 5.6 veces más respecto al T45 y T46. Es importante señalar que en dicho tratamiento testigo los embriones fueron en su totalidad globulares y con alto grado de presencia de tricomas (Figura 2 E). Incluso, después de concluido el experimento, tales embriones con tricomas no tuvieron capacidad para completar su desarrollo hasta la formación de cotiledones, por lo que tendieron a oxidarse y a desdiferenciarse en callo.

Los resultados anteriores indican que la presencia de 2iP en combinación con el 2,4-D, que fue constata para todos los tratamientos, pero principalmente la combinación de 2iP con epibrasinólida favorece la competencia, determinación y diferenciación celular de los explantes para tomar la ruta morfogénica de la ES (Figura 2 A, B, C y D), ya que los embriones formados fueron capaces de madurar y desarrollar plantas normales completamente aclimatadas (Figura 2 F y G).

En los tres genotipos se apreció variabilidad de respuesta entre tratamientos para la formación de raíces adventicias (Cuadro 2). Para cada uno de los genotipos, los tratamientos con explantes de pétalo fueron los

**Cuadro 1.** Efecto de los factores genotipo, medio de cultivo y presencia de brasinoesteroides en la respuesta morfogénica de explantes foliares de tres genotipos de *Theobroma cacao* L., 63 días después del establecimiento.

Factor	Explantes con callo (%)	Explantes con embriones (%)	Número de embriones
<b>Genotipo</b>			
Carmelo	75.62 b	1.87 a	12.8 a
H13xUF-273	87.50 a	5.62 a	35.2 a
PA-169xUF-273	75.75 b	5.00 a	28.8 a
<b>Regulador (DKW+2,4-D)</b>			
KIN	75.66 a	5.00 ab	30.0 ab
2ip	81.33 a	10.83 a	44.4 a
TDZ	77.66 a	0.00 b	0.0 b
2,4,5-T	83.33 a	0.83 b	2.4 b
<b>Tipo de explante</b>			
Pétalo	79.41 a	4.16 a	31.2 a
Estaminodio	79.83 a	4.16 a	43.2 a
<b>Epibrasinólida</b>			
Ausencia	82.50 a	2.08 a	33.6 a
Presencia	76.75 a	6.25 a	43.2 a
C.V.	25.41	7.68	24.97

† Letras diferentes por columna son significativamente diferentes (Tukey  $\leq 0.05$ ). Los grupos estadísticos corresponden al análisis después de aplicar la transformación de los datos con la fórmula  $\sqrt{x+1}$  C.V.= Coeficiente de variación.

**Cuadro 2.** Respuesta morfogénica *in vitro* de explantes de *Theobroma cacao* L., sometidos al medio DKW+2,4-D con diferentes combinaciones de reguladores y 24-epibrasinólida. Datos después de 63 días del establecimiento.

Tratamiento	Explantes con embriones (%)	Número de embriones	Explantes con raíces (%)
1. Carmelo/P/KIN	0 c <sup>†</sup>	0 c <sup>†</sup>	30 defg <sup>†</sup>
2. Carmelo/P/2ip	0 c	0 c	60 abcd
3. Carmelo/P/TDZ	0 c	0 c	10 fg
4. Carmelo/P/2,4,5-T	0 c	0 c	30 defg
5. Carmelo/P/KIN/Epbr	0 c	0 c	30 defg
6. Carmelo/P/2ip/Epbr	10 bc	1.0 bc	60 abcd
7. Carmelo/P/TDZ/Epbr	0 c	0 c	10 fg
8. Carmelo/P/2,4,5-T/Epbr	0 c	0 c	50 bcde
9. Carmelo/E/KIN	0 c	0 c	0 g
10. Carmelo/E/2ip	0 c	0 c	10 fg
11. Carmelo/E/TDZ	0 c	0 c	0 g
12. Carmelo/E/2,4,5-T	0 c	0 c	0 g
13. Carmelo/E/KIN/Epbr	10 bc	2.0 bc	20 efg
14. Carmelo/E/2ip/Epbr	10 bc	10.0 ab	10 fg
15. Carmelo/E/TDZ/Epbr	0 c	0 c	10 fg
16. Carmelo/E/2,4,5-T/Epbr	0 c	0 c	0 g
17. H13×UF-273/P/KIN	0 c	0 c	70 abc
18. H13×UF-273/P/2ip	40 a	17.0 a	80 ab
19. H13×UF-273/P/TDZ	0 c	0 c	80 ab
20. H13×UF-273/P/2,4,5-T	0 c	0 c	90 a
21. H13×UF-273/P/KIN/Epbr	10 bc	5.0 bc	0 g
22. H13×UF-273/P/2ip/Epbr	30 ab	9.0 abc	20 efg
23. H13×UF-273/P/TDZ/Epbr	0 c	0 c	0 g
24. H13×UF-273/P/2,4,5-T/Epbr	0 c	0 c	0 g
25. H13×UF-273/E/KIN	0 c	0 c	0 g
26. H13×UF-273/E/2ip	0 c	0 c	30 defg
27. H13×UF-273/E/TDZ	0 c	0 c	0 g
28. H13×UF-273/E/2,4,5-T	0 c	0 c	10 fg
29. H13×UF-273/E/KIN/Epbr	0 c	0 c	0 g
30. H13×UF-273/E/2ip/Epbr	10 bc	5.0 bc	40 cdef
31. H13×UF-273/E/TDZ/Epbr	0 c	0 c	10 fg
32. H13×UF-273/E/2,4,5-T/Epbr	0 c	0 c	20 efg
33. PA-169×UF-273/P/KIN	0 c	0 c	0 g
34. PA-169×UF-273/P/2ip	0 c	0 c	0 g
35. PA-169×UF-273/P/TDZ	0 c	0 c	10 fg
36. PA-169×UF-273/P/2,4,5-T	0 c	0 c	50 bcde
37. PA-169×UF-273/P/KIN/Epbr	10 bc	1.0 bc	20 efg
38. PA-169×UF-273/P/2ip/Epbr	0 c	0 c	10 fg
39. PA-169×UF-273/P/TDZ/Epbr	0 c	0 c	10 fg
40. PA-169×UF-273/P/2,4,5-T/Epbr	0 c	0 c	30 defg
41. PA-169×UF-273/E/KIN	10 bc	17.0 a	0 g
42. PA-169×UF-273/E/2ip	0 c	0 c	0 g
43. PA-169×UF-273/E/TDZ	0 c	0 c	0 g
44. PA-169×UF-273/E/2,4,5-T	0 c	0 c	0 g
45. PA-169×UF-273/E/KIN/Epbr	20 abc	5.0 bc	0 g
46. PA-169×UF-273/E/2ip/Epbr	30 ab	3.0 bc	0 g
47. PA-169×UF-273/E/TDZ/Epbr	0 c	0 c	0 g
48. PA-169×UF-273/E/2,4,5-T/Epbr	10 bc	3.0 bc	0 g
C.V.	7.68	24.97	12.29

<sup>†</sup> Letras diferentes por columna son significativamente diferentes (Tukey  $\leq 0.05$ ). Los grupos estadísticos corresponden al análisis después de aplicar la transformación de los datos con la fórmula  $\sqrt{x+1}$ . C.V.=Coeficiente de variación. P=pétalo. E=estaminodio. Epbr=24-epibrasinólida.

más propensos a desarrollar raíces directamente del callo previamente formado. Sin embargo, en los tratamientos T17 a T20, correspondientes a pétalos del H13×UF-273 con los cuatro reguladores sin epibrasinólida, fueron los que generaron los mayores porcentajes de rizogénesis.

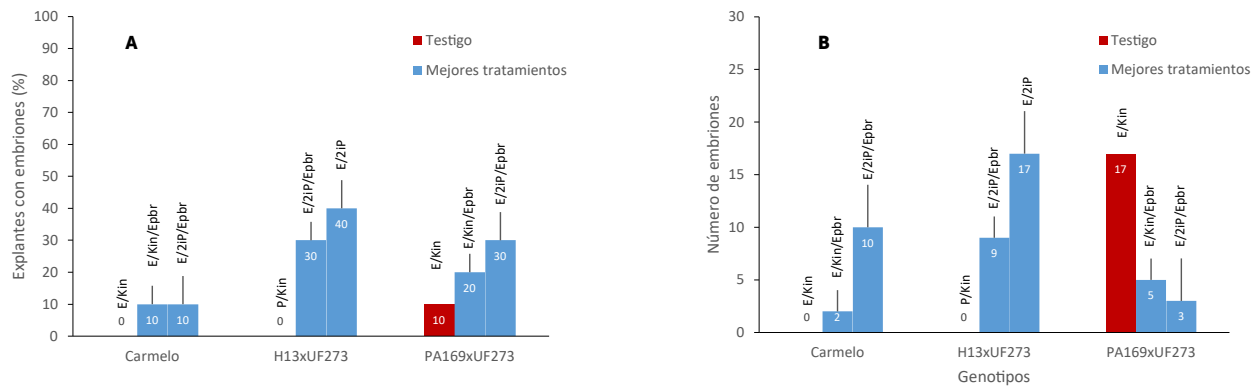
Al respecto se ha reportado que el desarrollo del eje embrionario y raíces, son eventos mutuamente excluyentes a pesar de existir ambos polos meristemáticos (Iracheta-Donjuan, 2009); aunque en este trabajo es necesario precisar que las raíces formadas no provenían de los embriones somáticos; por lo que no afectó la formación de embriones, ya que incluso tratamientos con alta producción de embriones tuvieron elevada producción de raíces adventicias.

## CONCLUSIONES

La capacidad morfogénica de los explantes de pétalo y estaminodios de los genotipos evaluados, fue afectada de forma diferente de acuerdo al tipo de regulador del crecimiento utilizado y a la presencia de la 24-epibrasinólida. El medio de cultivo con 2,4-D, cuando es adicionado con la citocinina 2iP, mejora la competencia y determinación celular de los explantes para tomar la ruta de la embriogénesis somática. La adición de epibrasinólida al medio con 2,4-D y 2iP, promueve no solo la embriogénesis somática, sino que también propicia la generación de embriones capaces de continuar las etapas de desarrollo hasta la formación de plantas completas.

## LITERATURA CITADA

Alemanno, L., Ramos, T., Gargadenc, A., Andary, C., Ferriere N. (2003). Localization and identification of phenolic



**Figura 1.** Comparación de los mejores tratamientos con respecto al testigo con el explante de estaminodio (E) o pétalo (P) en el medio adicionado solo con kinetina (Kin). A: Comparación del porcentaje de explantes con embriones, y B: comparación de tratamientos para el número de embriones totales. Datos a los 63 días después del establecimiento, ± error estándar.

compounds in *Theobroma cacao* L. somatic embryogenesis. *Annals Botany*. 92:613-23. doi: 10.1093/aob/mcg177

Avendaño-Arrazate, C.H., Guillén-Díaz, S., Hernández-Gómez, E. (2018). "Regalo de Dios": clon de cacao (*Theobroma cacao* L.) tolerante a *Moniliophthora roreri* Cif & Par, para la renovación de las zonas cacaoteras de México. *Agroproductividad* 11:173-176.

Chone, R.M.S., Rocha, D.I., Monte-Bello, C.C., Pinheiro, H.P., Dornelas, M.C., Haddad, C.R.B., Almeida, J.A.S. (2018). Brassinosteroid increases the cytokinin efficiency to induce direct somatic embryogenesis in leaf explants of *Coffea arabica* L. (Rubiaceae). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 135(1):63-71. doi.org/10.1007/s11240-018-1443-4

Driver, D., Kuniyuki, D. (1984). *In vitro* propagation of paradox walnut rootstock. *Journal of Horticultural Science* 19:507-509.

García, C., Marelli, J.-P., Motamayor, J.C., Vilella, C. (2018). Chapter 15. Somatic embryogenesis in *Theobroma cacao* L. In V. M. Loyola-Vargas and N. Ochoa-Alejo (Eds.), *Plant cell culture protocols, methods in molecular biology*, (pp:227-24) 5vol. 1815, ©Springer Science+Business Media, LLC. doi.org/10.1007/978-1-4939-8594-4\_15

Guillou, C., Fillodeau, A., Brulard, E., Breton, D., De-Faria-Maraschin, S., Verdier, D., Simon, M., Ducos, J.P. (2018). Indirect somatic embryogenesis of *Theobroma cacao* L. in liquid medium and improvement of embryo-to-plantlet conversion rate. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*. doi.org/10.1007/s11627-018-9909-y

Guiltinan, M.J., Maximova, S. (2010). Integrated system for vegetative propagation of cacao. *Protocol Book*. Versin 2.1. November 17, 2010. American Cacao Research Institute. United States Department of Agriculture. The Pennsylvania State University. Recuperado de [http://www.personal.psu.edu/mjg9/Guiltinan\\_Lab\\_Website/Protocols\\_files/Cacao%20tissue%20culture%20protocol%20-V2.1.pdf](http://www.personal.psu.edu/mjg9/Guiltinan_Lab_Website/Protocols_files/Cacao%20tissue%20culture%20protocol%20-V2.1.pdf)

Iracheta-Donjuan, L. 2009. Propagación. En M. Alonso-Báez y J.F. Aguirre-Medina (Eds), *Manual de producción de cacao* (pp: 87-90). Primera edición. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Campo

Experimental Rosario Izapa, Tuxtla Chico, Chiapas, México.

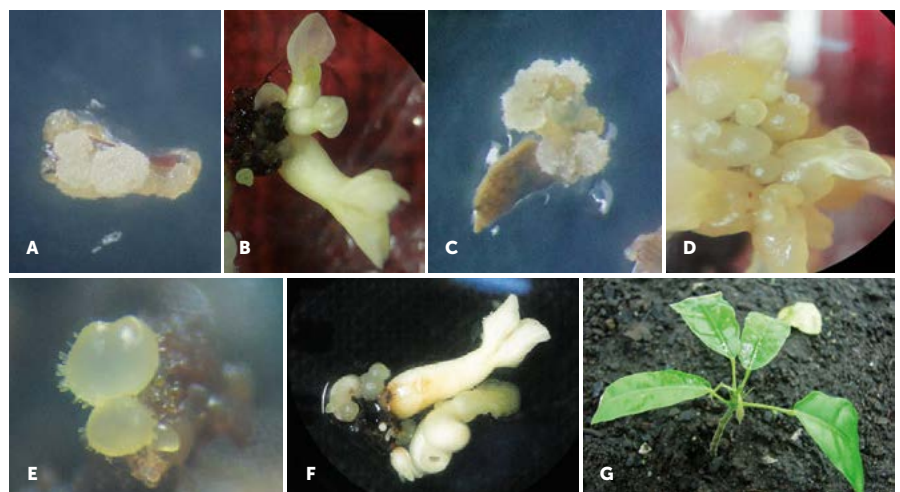
Maximova, S., Alemanno, L., Young, A., Ferriere, N., Traore, A., Guiltinan, M. (2002). Efficiency, genotypic variability and cellular origin of primary and secondary somatic embryogenesis of *Theobroma cacao* L. *Cell. Dev. Biol. Plant* 38:252-259. doi:10.1079/IVP2001257

Monsalve, G. L., García, R. C. Y., Sigarroa, R. A. K. (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 Santander*. Año 10 (1):21-29. Recuperado de <https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/5555264.pdf>

Murashige, T., Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Hort Science* 27:450-452.

Quinoo, A.K., Dwomo, B.I. (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* 1:72-78. doi:10.5539/jps.v1n1p72

SIAP. (2017). Sistema de Información Agrícola y Pesquera. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Recuperado de [www.gob.mx/siap](http://www.gob.mx/siap).



**Figura 2.** Respuesta morfogénica *in vitro* de explantes de *Theobroma cacao* L. y la regeneración de plantas completas. A: Estaminodio de genotipo Carmelo con callo. B: Producción de embriones de Carmelo en medio con 2iP+Epibrasinólida. C: Pétalo con callo de H13xUF-273. D: Embriones múltiples de genotipo H13xUF-273 en medio con 2iP. E: Embriones globulares con tricomas de PA-169xUF-273 en medio con Kinetina. F: Embriones cotiledonares en maduración con embriones secundarios. G: Plántula regenerada y aclimatada.