



**UNIVERSIDAD REGIONAL AMAZÓNICA IKIAM**

Facultad de Ciencias de la Vida

Carrera en Ingeniería en Biotecnología

*Inducción de la embriogénesis somática en Theobroma bicolor  
Humb. & Bonpl. cultivado en la Región Amazónica del Ecuador*

Michelle Carolina Pazmiño Viteri

30 de septiembre de 2020, ciudad de Tena, Napo, Ecuador

REVISTA:

Biot. Veg. eISSN 2074-8647, RNPS: 2154

## DERECHO DE AUTOR

Tena, 26 de febrero de 2020

Yo, Michelle Carolina Pazmiño Viteri con documento de identidad N° 1723136766, declaro que los resultados obtenidos en la investigación que presento en este documento final, previo a la obtención del título de Ingeniería en Biotecnología son absolutamente inéditos, originales, auténticos y personales.

En virtud de lo cual, el contenido, criterios, opiniones, resultados, análisis, interpretaciones, conclusiones, recomendaciones y todos los demás aspectos vertidos en la presente investigación son de mi autoría y de mi absoluta responsabilidad.

Por la favorable atención a la presente, suscribo de usted,  
Atentamente,

Firma:



---

Michelle Carolina Pazmiño Viteri

## CERTIFICADO DEL DIRECTOR

Certifico que el trabajo de integración curricular titulado: “Inducción de la embriogénesis somática en *Theobroma bicolor* Humb. & Bonpl cultivado en la Región Amazónica del Ecuador”, en la modalidad de: artículo original, fue realizado por: Michelle Carolina Pazmiño Viteri, bajo mi dirección.

El mismo ha sido revisado en su totalidad y analizado por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto, cumple con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad Regional Amazónica Ikiam, para su entrega y defensa.

Tena, 21 de febrero de 2020

Firma:



---

Liliana Alexandra Pila Quinga

CI. 1715334601

## APROBACIÓN DEL TRIBUNAL

## ÍNDICE GENERAL

DERECHO DE AUTOR .....	ii
CERTIFICADO DEL DIRECTOR .....	iii
APROBACIÓN DEL TRIBUNAL.....	iv
RESUMEN .....	viii
ABSTRACT .....	ix
1. INTRODUCCIÓN.....	2
2. METODOLOGÍA .....	4
2.1. Material vegetal.....	4
2.2. Introducción del material vegetal a condiciones <i>in vitro</i> .....	5
2.3. Registro del proceso de inducción de la ES .....	8
2.4. Análisis estadísticos .....	9
3. RESULTADOS .....	9
3.1. Efectos del medio de cultivo .....	9
3.2. Registro del proceso de inducción de la ES .....	11
4. DISCUSIÓN .....	19
5. CONCLUSIONES.....	26
6. REFERENCIAS .....	26

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Respuesta embriogénica de explantes de <i>Theobroma bicolor</i> Humb. & Bonpl. provenientes de los medios de cultivo iniciales .....	11
---	----

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Material vegetal de <i>Theobroma bicolor</i> Humb. & Bonpl. ....	6
<b>Figura 2.</b> Representación esquemática del diseño experimental utilizado en la inducción de ES a partir de estaminodios en <i>Theobroma bicolor</i> Humb. & Bonpl. ....	7
<b>Figura 3.</b> Porcentaje de estaminodios que formaron callo en <i>Theobroma bicolor</i> Humb. & Bonpl.....	10
<b>Figura 4.</b> Proceso de formación de callo a partir de estaminodios de <i>Theobroma bicolor</i> Humb. & Bonpl.....	12
<b>Figura 5.</b> Tipos de callos desarrollados a partir de estaminodios de <i>Theobroma bicolor</i> Humb. & Bonpl.....	13
<b>Figura 6.</b> Porcentaje de callos según el color, desarrollados a partir de estaminodios de <i>Theobroma bicolor</i> Humb. & Bonpl.. ....	14
<b>Figura 7.</b> Porcentaje de callos según la textura, desarrollados a partir de estaminodios de <i>Theobroma bicolor</i> Humb. & Bonpl. ....	15
<b>Figura 8.</b> Distribución de las características morfológicas, color y textura, en los callos desarrollados a partir de estaminodios de <i>Theobroma bicolor</i> Humb. & Bonpl. cultivados en el medio de cultivo inicial 1.....	17
<b>Figura 9.</b> Distribución de las características morfológicas, color y textura, en los callos desarrollados a partir de estaminodios de <i>Theobroma bicolor</i> Humb. & Bonpl. cultivados en el medio de cultivo inicial 2.....	18
<b>Figura 10.</b> Proceso de formación de embriones somáticos a partir de estaminodios de <i>Theobroma bicolor</i> Humb. & Bonpl. ....	19

## RESUMEN

*Theobroma bicolor* Humb. & Bonpl. es una especie nativa de la Región Amazónica, cuyas semillas se consumen tostadas y los frutos se utilizan en bebidas tradicionales. La propagación de la especie a través de semillas está limitada por su condición alógama. La embriogénesis somática (ES) es una herramienta poderosa para la propagación clonal, la cual depende de reguladores de crecimiento (PGRs) como el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), cinetina (KIN) y tidiazuron (TDZ). El objetivo del presente trabajo fue el de explorar el efecto de diferentes concentraciones de 2,4-D y TDZ en el proceso de inducción de la ES en *T. bicolor*. Estaminodios fueron cultivados en medios suplementados con 9 o 20  $\mu\text{M}$  de 2,4-D y 22.7 nM o 1  $\mu\text{M}$  de TDZ, seguido de un medio de cultivo suplementado con 9  $\mu\text{M}$  de 2,4-D y 1.4  $\mu\text{M}$  de KIN y finalmente, en un medio de cultivo libre de PGRs. Las diferentes concentraciones de 2,4-D y TDZ desencadenaron la vía embriogénica indirecta, iniciándose la formación del callo a los 8 días. En el medio de cultivo suplementado con 9  $\mu\text{M}$  de 2,4-D y 22.7 nM de TDZ, se observó 90% de respuesta callogénica y 1.67% de embriogénica. Mientras que en el medio de cultivo suplementado con 20  $\mu\text{M}$  de 2,4-D y 1  $\mu\text{M}$  de TDZ, la respuesta callogénica fue de 80% y la embriogénica de 0%. Callos con potencial embriogénico están asociados a colores amarillo-blanco-café y texturas acuosa-cerosa-friable. Los resultados observados muestran que la capacidad embriogénica está asociada a las concentraciones de los PGRs.

Palabras clave: cacao blanco, embriogénesis somática, inducción, 2,4-D, tidiazuron



## ABSTRACT

*Theobroma bicolor* Humb. & Bonpl. is a native species of the Amazon Region, its seeds are consumed toasted and the fruits are used in traditional beverages. Its propagation through seeds is limited due to its allogamy. Somatic embryogenesis (SE) is a powerful tool for clonal propagation, which depends on growth regulators (PGRs) such as 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), kinetin (KIN) and thidiazuron (TDZ). The present study evaluates the effect of different concentrations of 2,4-D and TDZ on the process of SE induction in *T. bicolor*. Staminodes were cultured in media supplemented with 9 or 20  $\mu\text{M}$  of 2,4-D and 22.7 nM or 1  $\mu\text{M}$  of TDZ, followed by a culture medium supplemented with 9  $\mu\text{M}$  of 2,4-D and 1.4  $\mu\text{M}$  of KIN and finally, in a culture medium free of PGRs. The different concentrations of 2,4-D and TDZ triggered the indirect embryogenic pathway, starting the callus formation after eight days. A callus response of 90% and embryogenic response of 1.67% was observed in the culture medium supplemented with 9  $\mu\text{M}$  of 2,4-D and 22.7 nM of TDZ. Whereas in the culture medium supplemented with 20  $\mu\text{M}$  of 2,4-D and 1  $\mu\text{M}$  of TDZ, the callus response was 80% and the embryogenic response of 0%. Calluses with embryogenic potential are associated with yellow-white-brown colors and watery-waxy-friable textures. The observed results shown that *T. bicolor* embryogenic potential is associated with PGRs concentrations.

Keywords: cacao blanco, somatic embryogenesis, induction, 2,4-D, thidiazuron

Abreviaturas:

2,4-D: ácido 2,4-diclorofenoxiacético

CM: Características morfológicas

DKW: Driver y Kuniyuki

ES: Embriogénesis somática

KIN: Cinetina

RC: Respuesta callogénica

RE: Respuesta embriogénica

TDZ: Tidiazuron

PGR: Reguladores de crecimiento

## 1. INTRODUCCIÓN

*Theobroma bicolor* Humb. & Bonpl. conocida como cacao blanco o patas muyu en Ecuador (Peñuela-Mora et al., 2016), pertenece a la familia Malvaceae y al género *Theobroma* (Tropicos.org. Missouri Botanical Garden, 2019). Es una especie arbórea nativa de la Región Amazónica cuyo cultivo se ha extendido ampliamente por México, América Central, Venezuela, Colombia, Ecuador, Perú, Brasil y Bolivia (González et al., 2016; Lim, 2016). Datos históricos revelan que culturas precolombinas empleaban las semillas de *T. bicolor* como parte de sus rituales espirituales y como alimento después de someterlas a un proceso de tostado, además, los frutos se utilizaban en la elaboración de bebidas tradicionales debido al sabor menos amargo y ácido, que las bebidas a base de los frutos de *Theobroma cacao* L. (McNeil, 2006; Pérez-Mora et al., 2017). En Ecuador, en el centro de la Región Amazónica, en la provincia de Napo, cuando se la encuentra en el bosque, *T. bicolor* es considerada como un indicador de asentamientos humanos antiguos (Irvine, 1987). En esta provincia se mantiene la tradición del consumo de semillas y cultivo en chacras, superficies de no más de 2 ha. de extensión, en asociación con *T. cacao*, *Manihot esculenta*, *Zea mays*, entre otras especies nativas (Lugo & Moncada, 2018).

Las semillas de *T. bicolor* poseen valiosas características nutricionales, una cantidad aproximada de 10 semillas proporciona 7 g de proteína, 9 g de fibra y un alto porcentaje de ácidos grasos no saturados (Jee, 1984; Melgarejo et al., 2006). Por otro lado, se ha comprobado la actividad antioxidante de la pulpa y semillas, la cual está asociada a la presencia de compuestos ácidos fenólicos, responsables de estimular el sistema inmunitario produciendo efectos beneficiosos para la salud (García et al., 2002). A esto se suma, un efecto estimulante asociado a la teobromina, sustancia contenida en las semillas de *T. bicolor*, que aumenta la actividad del sistema nervioso central, promoviendo la reducción de la presión arterial y el relajamiento muscular (McNeil, 2006). Estas características la han posicionado en mercados internacionales generando demanda del producto y promoviendo nuevas áreas de cultivo. Además, *T. bicolor* es una especie utilizada como una alternativa para el enriquecimiento de sistemas de producción diversos, los cuales permiten la seguridad y soberanía alimentaria, la

conservación de la diversidad, la mejora de la calidad del suelo y la materialización de saberes indígenas tradicionales (Melgarejo et al., 2006; Olander, 2017; Lugo & Moncada, 2018).

La biología reproductiva de *T. bicolor* es compleja, se ha observado que presenta breviastilia en su flor, es decir, los estambres son más cortos que el estigma, por lo que la autopolinización es imposible a pesar de ser una flor hermafrodita, siendo catalogada como una especie alógama. En este tipo de especies, existe un constante intercambio genético por lo cual, la propagación por semillas ocasiona un rendimiento agronómico variable de los cultivos (Maximova et al., 2005; Melgarejo et al., 2006). Se tienen registros de que las poblaciones indígenas que habitan en la Región Amazónica de Sudamérica diferencian variedades de esta especie por la forma, tamaño y sabor de los frutos (Melgarejo et al., 2006). En Colombia, en la región de Araracuara, se logró distinguir cinco cultivares de acuerdo al tamaño del fruto (Barrera, 1999), sin embargo, hasta la fecha, en Ecuador no se han reportado estudios sobre la variabilidad genética de *T. bicolor*.

A pesar de su valor nutricional, económico, ecológico y social, métodos tradicionales de propagación por medio de semillas en esta especie, limitan el establecimiento de nuevas áreas de cultivo debido al alto grado de heterocigosidad de sus poblaciones resultantes, afectando directamente el rendimiento del cultivo (Maximova et al., 2005; Melgarejo et al., 2006). Con el fin de propagar materiales vegetales con potencial agronómico, se han propuesto técnicas de propagación clonal *in vitro* como la embriogénesis somática (ES) (Loyola-Vargas & Ochoa-Alejo, 2016). La ES es un proceso natural de las plantas, a través de la cual es posible regenerar una planta completa a partir de una única célula (Fehér, 2015). Este proceso puede ser inducido artificialmente, mediante la manipulación adecuada de las condiciones de cultivo, células somáticas cultivadas reprograman su destino celular hacia el desarrollo de embriones somáticos (Freire Seijo, 2003; Fehér, 2005; Melgarejo et al., 2006). Los embriones somáticos son estructuras bipolares, en las que se ha diferenciado la región apical y la región radicular, con un sistema vascular cerrado sin conexión a tejido materno (Loyola-Vargas & Ochoa-Alejo, 2016; Zimmerman, 1993).

La inducción de la ES depende de diferentes factores como la composición del medio de cultivo, la interacción entre reguladores de crecimiento (Plant Growth Regulators -PGRs-),

el origen y tipo de explante, el genotipo de la planta donadora del explante y de las condiciones fisiológicas de incubación (Altamura et al., 2016; Loyola-Vargas & Ochoa-Alejo, 2016; Méndez-Hernández et al., 2019). Los PGRs estimulan la división celular, regulan el crecimiento y diferenciación de las células en embriones (Bhatia, 2015). Los más usados, son las auxinas como el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y las citoquininas como la cinetina (KIN), también se utiliza el tidiazuron (TDZ), el cual presenta una actividad similar a la citoquinina (Guo et al., 2011). Se ha reportado que la inducción de la ES está asociada con la relación auxina/citoquinina ya que estos PGRs actúan sinérgicamente; su homeostasis y comunicación cruzada juegan un rol importante en este proceso (Bhatia, 2015; Nic-Can & Loyola-Vargas, 2016; Méndez-Hernández et al., 2019).

En *T. cacao*, la ES ha sido ampliamente estudiada, la inducción se realiza a partir de estructuras florales cultivadas en medio basal DKW (Driver & Kuniyuki, 1984) suplementado con TDZ (Li et al., 1998), 2,4-D (Maximova et al., 2002) y KIN (Fontanel et al., 2002), reportándose alta actividad embriogénica en diferentes genotipos estudiados (Li et al., 1998; Maximova et al., 2008; Minyaka et al., 2008; Monsalve González et al., 2010; Quainoo & Dwomo, 2012; Henao Ramírez et al., 2018). Sin embargo, para *T. bicolor*, no hay información disponible sobre la ES. En este contexto, el objetivo del presente trabajo fue determinar el efecto de diferentes concentraciones de 2,4-D y TDZ en el proceso de inducción de la ES en *T. bicolor*.

## 2. METODOLOGÍA

### 2.1. Material vegetal

Se utilizaron estaminodios extraídos de 15 botones florales cerrados de un solo individuo de *T. bicolor* (genotipo desconocido) cultivado en una propiedad privada ubicada en la comunidad de Chambira, en el cantón Tena, provincia de Napo, Ecuador (WGS84: -0.984792, -77.837748).

Los botones florales cerrados fueron colectados en horas de la mañana en recipientes con agua fría previamente esterilizada. Éstos fueron transportados al laboratorio de Biología de la Universidad Regional Amazónica Ikiam para proceder con el proceso de desinfección.

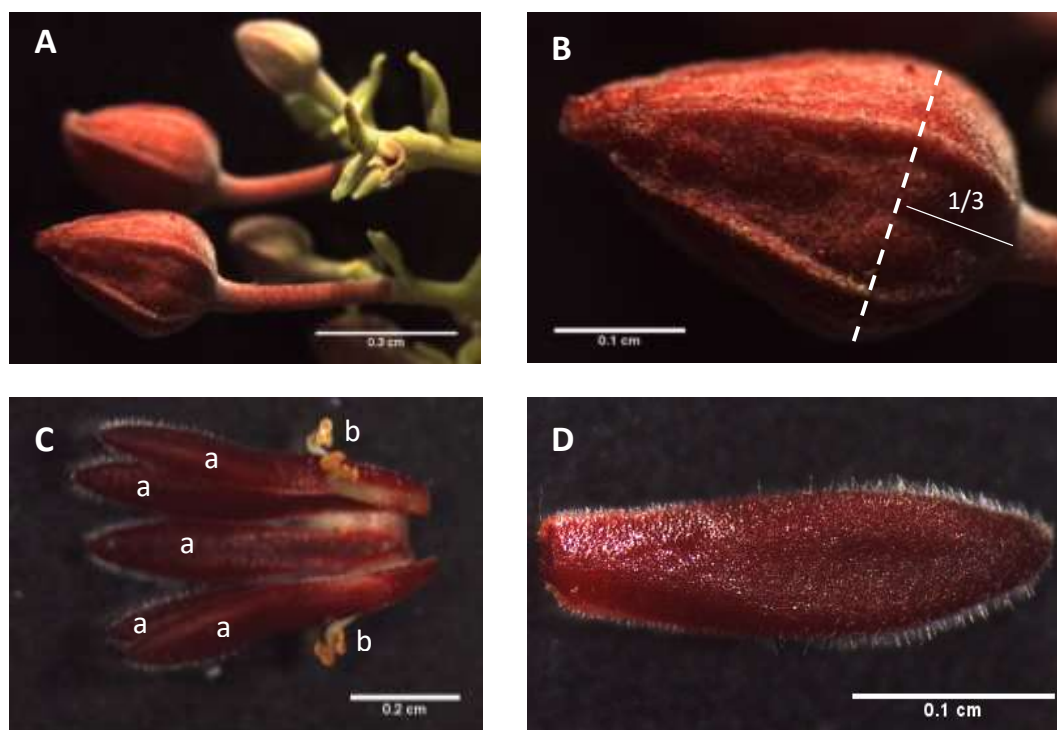
## **2.2. Introducción del material vegetal a condiciones *in vitro***

### **2.2.1. Desinfección del material vegetal**

Los botones florales fueron sometidos a lavados superficiales con detergente líquido comercial y agua potable. Dentro de la cámara de flujo laminar, fueron desinfectados superficialmente por inmersión en una solución de hipoclorito de sodio al 1% (v/v) (a partir de cloro comercial Clorox<sup>®</sup> 5%) por 10 minutos y luego, fueron sometidos a tres enjuagues continuos con agua estéril durante dos minutos cada uno. Se realizó una segunda desinfección que consistió en sumergir los botones florales en una solución de hipoclorito de sodio al 0,5% (v/v) por 5 minutos. Posteriormente, se realizó tres enjuagues continuos con agua estéril, luego éstos fueron colocados sobre papel absorbente estéril y rociados con alcohol al 70%.

### **2.2.2. Extracción de estaminodios**

Después del proceso de doble desinfección, se procedió a realizar la disección de los botones florales para extraer los estaminodios. Se realizó un corte a 1/3 de la base del botón floral, perpendicular al eje longitudinal con la ayuda de un bisturí, luego se procedió a separar los estambres de los estaminodios (Maximova et al., 2005) (Fig. 1). Posteriormente, los estaminodios extraídos fueron inoculados en los medios de cultivo correspondientes.



**Figura 1.** Material vegetal de *Theobroma bicolor* Humb. & Bonpl. (A) Botón floral cerrado. (B) Corte al 1/3 de la base del botón para extracción de los estaminodios, (C) estambres fusionados a los estaminodios. a) estaminodio, b) estambre, (D) estaminodio extraído.

### 2.2.2. Medios de cultivo y condiciones de crecimiento

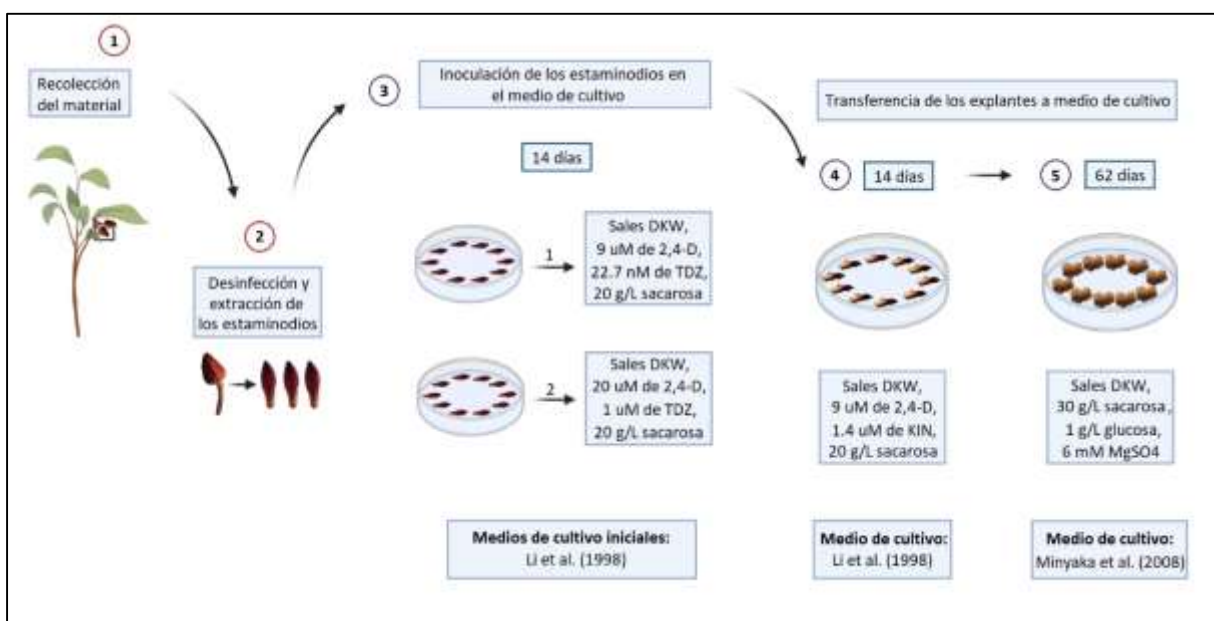
Los estaminodios fueron inoculados en el medio de cultivo inicial suplementado con dos concentraciones diferentes de 2,4-D y TDZ: el medio de cultivo inicial 1, con 9  $\mu\text{M}$  de 2,4-D y 22.7 nM de TDZ y el medio de cultivo inicial 2, con 20  $\mu\text{M}$  de 2,4-D y 1  $\mu\text{M}$  de TDZ. Los dos medios contenían sales basales DKW y 20 g/L de sacarosa. Los estaminodios fueron cultivados por 14 días en cajas Petri con 25 mL de medio de cultivo.

Después de 14 días, los explantes provenientes de los dos medios de cultivo iniciales fueron transferidos al medio de cultivo con sales basales DKW, 20 g/L de sacarosa, suplementados con 9  $\mu\text{M}$  de 2,4-D y 1.4  $\mu\text{M}$  de KIN (Li et al., 1998). Los explantes fueron cultivados en este medio por 14 días adicionales en cajas Petri con 25 mL de medio de cultivo.

Finalmente, los explantes fueron transferidos al medio de cultivo libre de PGRs con sales basales DKW, 30 g/L de sacarosa, 1 g/L de glucosa y 6 mM de  $\text{MgSO}_4$  (Minyaka et al.,

2008). Se realizaron subcultivos cada 14 días a cajas Petri con 25 mL medio de cultivo fresco, siendo los explantes cultivados en este medio por 62 días adicionales.

Los explantes se mantuvieron en oscuridad a 25°C. Todos los medios de cultivo fueron previamente ajustados a un pH de 5.8, preparados con agar vegetal y autoclavados a 121°C por 20 minutos. El diseño experimental se resume y presenta en la Figura 2.



**Figura 2.** Representación esquemática del diseño experimental utilizado en la inducción de la ES a partir de estaminodios en *Theobroma bicolor* Humb. & Bonpl.

Cada unidad experimental constó de una caja Petri con 10 explantes y se realizaron seis repeticiones por cada tratamiento.

Se evaluó la respuesta callogénica y la respuesta embriogénica de los explantes, considerando los dos medios de cultivo iniciales.

La respuesta callogénica (RC) se determinó calculando el porcentaje de estaminodios que formaron callo a los 8, 15, 30 y 45 días de cultivo, según la fórmula (1).

$$RC = \text{Promedio} \left( \frac{\text{Total de estaminodios que formaron callo por caja Petri}}{\text{Total de estaminodios cultivados por caja Petri}} \times 100 \right) \quad (1)$$



La respuesta embriogénica (RE) se determinó calculando el porcentaje de explantes que expresaron embriones a los 90 días de cultivo, según la fórmula (2).

$$RE = \text{Promedio} \left( \frac{\text{Total de explantes que expresaron embriones por caja Petri}}{\text{Total de explantes cultivados por caja Petri}} \times 100 \right) \quad (2)$$

Se registró el número de embriones en cada uno de los explantes que mostraron respuesta embriogénica.

### **2.3. Registro del proceso de inducción de la ES**

El proceso de inducción de la ES en los estaminodios y explantes de *T. bicolor* fue observado y registrado a los 8, 15, 30 y 45 días de cultivo. El registro se realizó mediante capturas fotográficas usando una cámara acoplada al estereomicroscopio Leica EZ4 W/E (Leica Biosystems). Las imágenes fueron tratadas con el software de base Leica Application Suite, versión 3.4.0 (Leica Microsystems Switzerland) y con el software ImageJ<sup>®</sup> 1.52a (National Institutes of Health, USA).

Para los explantes que desarrollaron callo, a los 45 días de cultivo, se evaluaron las características morfológicas de color y textura. Para la característica morfológica de color se clasificaron en grupos de color amarillo, blanco, café, marrón, translúcido o la combinación de dos y tres colores de los ya mencionados. Para la característica morfológica de textura se clasificaron en grupos de textura acuosa, tipo algodón, cerosa, compacta o friable según Alemanno et al. (1996), Monsalve González et al. (2010) y Henao Ramírez et al. (2018).

Para las dos características morfológicas (CM), color y textura, se calculó el porcentaje, según la fórmula (3).

$$CM = \frac{\text{Total de estaminodios que desarrollaron callo con diferentes características}}{\text{Total de estaminodios cultivados por caja Petri}} \times 100 \quad (3)$$

Para los explantes que desarrollaron embriones somáticos se registró el proceso de formación de embriones desde los 8 hasta los 90 días de cultivo.

## **2.4. Análisis estadísticos**

Para las variables cuantitativas, se aplicó el de Test de Shapiro-Wilk para comprobar la distribución normal de los datos, luego se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) de un solo factor y una comparación de medias por el Test de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Para las variables cualitativas nominales, se realizó un Análisis de Correspondencia Simple (AC), el cual opera sobre la matriz de desviaciones Chi-cuadrado. También, se elaboró un gráfico Biplot para mostrar la distribución y relación entre éstas.

Los análisis se realizaron utilizando el programa estadístico InfoStat/L, versión 2019 (Centro de Transferencia InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina).

## **3. RESULTADOS**

### **3.1. Efectos del medio de cultivo**

#### **3.1.1. Respuesta callogénica**

El crecimiento de callo se inició a los 8 días después de la inoculación de los estaminodios en los dos medios de cultivo iniciales. A los 8 días, la respuesta callogénica de los estaminodios mostró diferencia significativa entre los medios de cultivo iniciales, siendo 35.0% en los estaminodios del medio de cultivo inicial 1 y 11.7% en los estaminodios del medio de cultivo inicial 2.

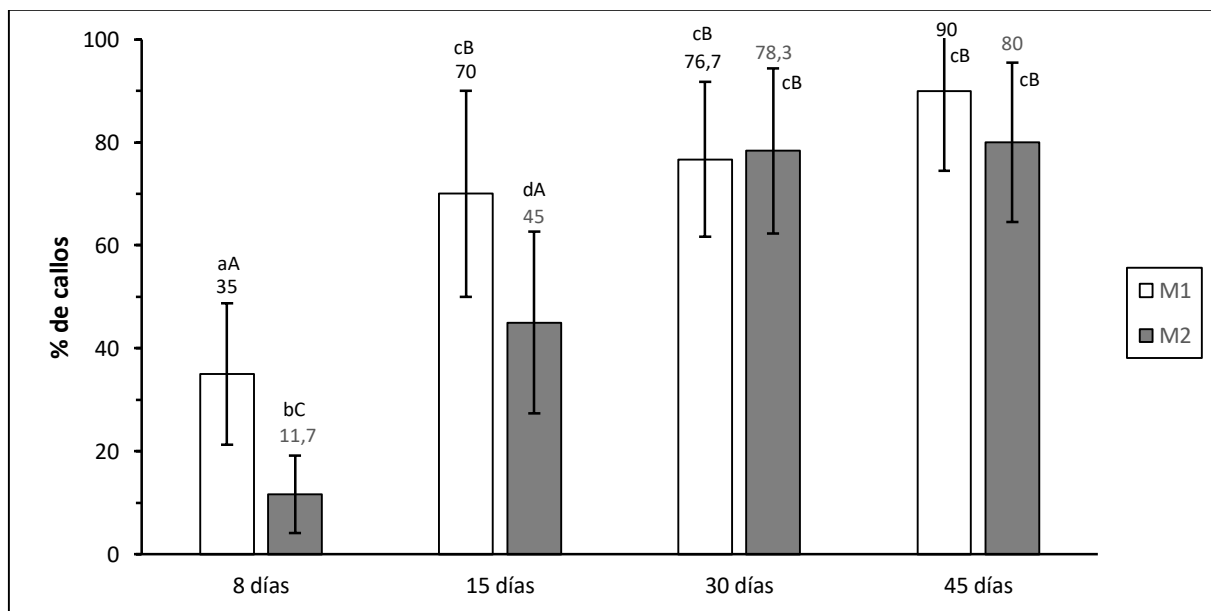
A los 15 días, la diferencia significativa en la respuesta callogénica se mantuvo, siendo 70.0% en los estaminodios del medio de cultivo inicial 1 y 45.0% en los estaminodios del medio de cultivo inicial 2. Además, a los 8 a 15 días, se evidenció un incremento significativo en la respuesta callogénica de 35.0% a 70.0% en los estaminodios del medio de cultivo inicial 1 y de 11.7% a 45.0% en los estaminodios del medio de cultivo inicial 2.

A los 30 días, los explantes cultivados en el medio de cultivo suplementado con 9  $\mu\text{M}$  de 2,4-D y 1.4  $\mu\text{M}$  de KIN, provenientes de los dos medios de cultivo iniciales, no mostraron diferencias significativas en la respuesta callogénica, 76.7% en los explantes provenientes del medio de cultivo inicial 1 y 78.3% en los explantes provenientes del medio de cultivo inicial 2. De los 15 a 30 días de cultivo, no se observó un incremento significativo en la respuesta

calogénica, 70% y 76.7% en los explantes provenientes del medio de cultivo inicial 1, mientras que si se observó un incremento significativo de 45.0% a 78.3% en los explantes provenientes del medio de cultivo inicial 2.

A los 45 días, los explantes cultivados en el medio de cultivo libre de PGRs, provenientes de los dos medios de cultivo iniciales, no mostraron diferencias significativas en la respuesta calogénica, siendo 90.0% en los explantes provenientes del medio de cultivo inicial 1 y 80.0% en los explantes provenientes del medio de cultivo inicial 2. De los 30 a 45 días de cultivo, tampoco se observó un incremento significativo en la respuesta calogénica de los explantes provenientes de los dos medios de cultivo iniciales, 76.7% y 90.0% en los explantes provenientes del medio de cultivo inicial 1 y, 78.3% y 80.0% en los explantes provenientes del medio de cultivo inicial 2.

Los resultados mostraron que la variación de las concentraciones de 2,4-D (9  $\mu$ M - 20  $\mu$ M) y de TDZ (22.7 nM - 1  $\mu$ M) en los medios de cultivo iniciales, no afectó significativamente la respuesta calogénica final de los explantes (Fig. 3).



**Figura 3.** Porcentaje de estaminodios que formaron callo en *Theobroma bicolor* Humb. & Bonpl. Evaluaciones realizadas a los 8, 15, 30 y 45 días después de la inoculación de los estaminodios y explantes en los medios de cultivo. M1: 9  $\mu$ M de 2,4-D y 22.7 nM de TDZ y M2: 20  $\mu$ M de 2,4-D y 1  $\mu$ M de TDZ. La figura indica los valores expresados en porcentaje seguidos de  $\pm$  la desviación estándar (barras verticales). Los datos fueron

transformados para Log (x+1), sometidos a ANOVA y analizados con el test de separación de medias Tukey ( $p < 0,05$ ). Las letras en minúscula indican diferencia estadística entre los medios de cultivo iniciales y las letras en mayúscula indican diferencia estadística entre los días de cultivo.

### 3.1.2. Respuesta embriogénica

A los 90 días de cultivo, se registró el número de embriones somáticos en los explantes que desarrollaron embriones.

La respuesta embriogénica no mostró diferencia significativa entre los explantes provenientes de los dos medios de cultivo iniciales. Los explantes provenientes del medio de cultivo inicial 1 mostraron una respuesta embriogénica de 1.7%, mientras los explantes provenientes del medio de cultivo inicial 2 expresaron una respuesta de 0.0% (Tabla 1).

Se registró el desarrollo de embriones somáticos en los explantes provenientes del medio de cultivo inicial 1, lo que indica que la variación de las concentraciones de 2,4-D (9  $\mu\text{M}$  - 20  $\mu\text{M}$ ) y de TDZ (22.7 nM - 1  $\mu\text{M}$ ) en los medios de cultivo iniciales influenció en la respuesta embriogénica, sin ser estadísticamente diferente.

**Tabla 1.** Respuesta embriogénica de explantes de *Theobroma bicolor* Humb. & Bonpl. provenientes de los medios de cultivo iniciales.

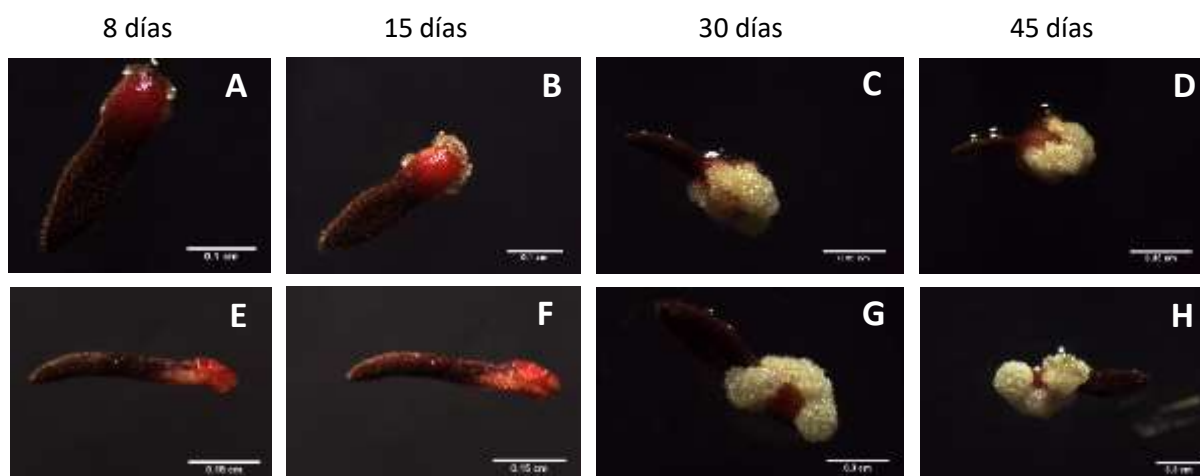
Fecha de evaluación (días)	Medio de cultivo inicial:	Respuesta embriogénica (%)			
90	1	1.67	±	0.408	A
	2	0.00	±	0.000	A

Valores expresados en porcentaje seguidos de  $\pm$  la desviación estándar. Los datos fueron sometidos a ANOVA y analizados con el test de separación de medias Tukey ( $p < 0,05$ ). Las letras en mayúscula indican la diferencia estadística entre los medios de cultivo iniciales. M1: 9  $\mu\text{M}$  de 2,4-D y 22.7 nM de TDZ y M2: 20  $\mu\text{M}$  de 2,4-D y 1  $\mu\text{M}$  de TDZ.

### 3.2. Registro del proceso de inducción de la ES

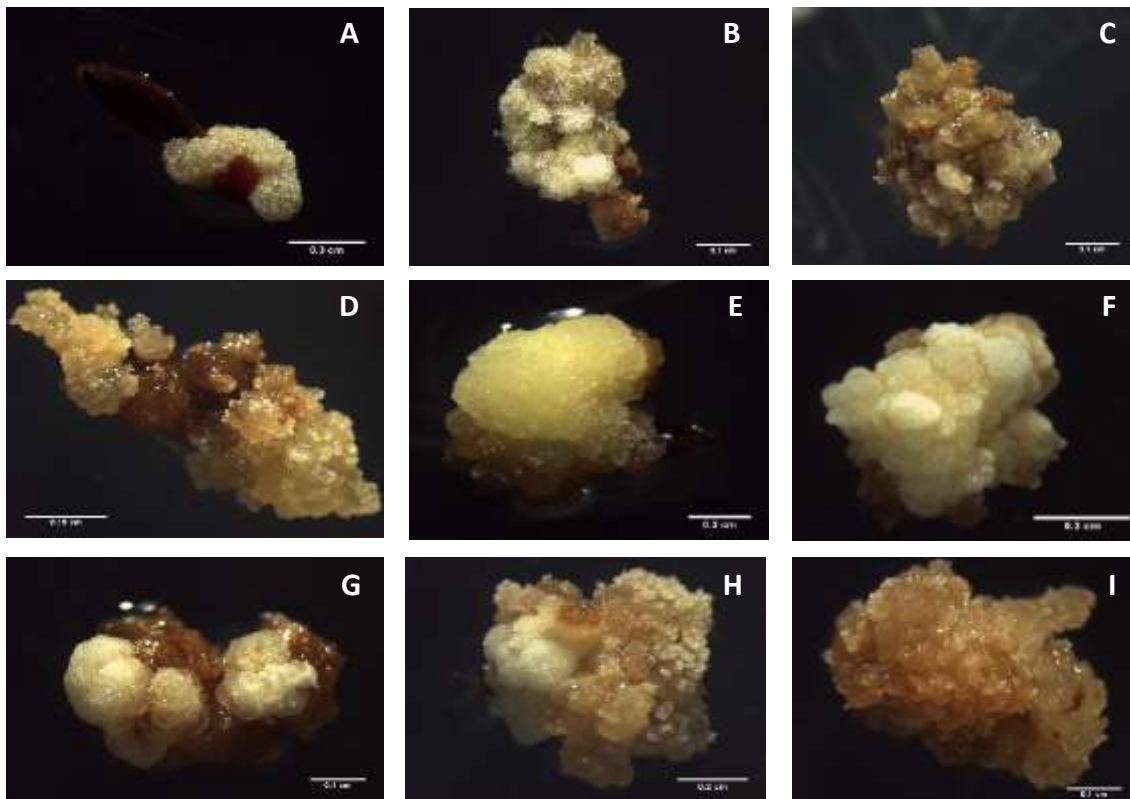
Las características morfológicas de los explantes fueron registradas durante los 45 días de cultivo. A los 8 días, no se registró cambios morfológicos en los estaminodios de los dos medios de cultivo iniciales. A los 15 días, se observó crecimiento de tejido desdiferenciado en

la superficie de los estaminodios del medio de cultivo inicial 1. Mientras que no se registró ningún cambio morfológico en los estaminodios del medio de cultivo inicial 2. A los 30 días, se observó una proliferación de células, la cual dio lugar a la formación de callos provenientes de los dos medios de cultivo iniciales. A los 45 días, se observó un aumento en el tamaño de los callos preformados provenientes de los dos medios de cultivo iniciales (Fig. 4).



**Figura 4.** Proceso de formación de callo a partir de estaminodios de *Theobroma bicolor* Humb. & Bonpl. (A-D) Estaminodios cultivados en el medio de cultivo inicial suplementado con 9  $\mu$ M de 2,4-D y 22.7 nM de TDZ, (E-H) estaminodios cultivados en el medio de cultivo inicial suplementado con 20  $\mu$ M de 2,4-D y 1  $\mu$ M de TDZ. Evaluación y registro a los 8, 15, 30 y 45 días de cultivo.

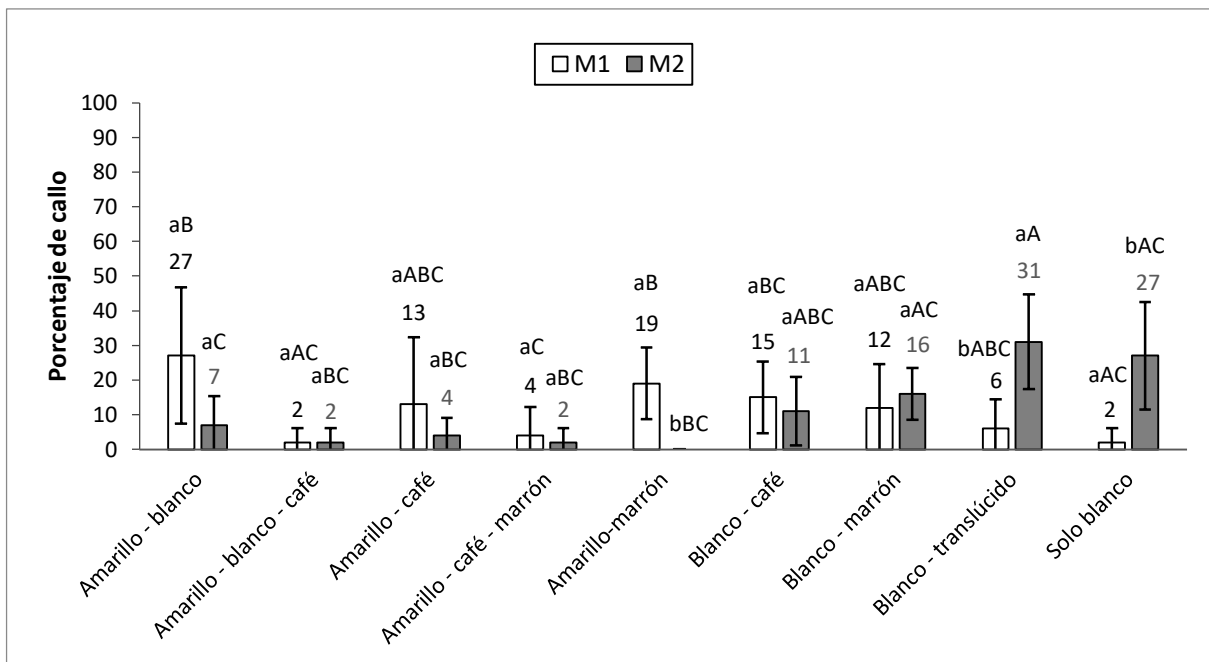
Finalmente, a los 45 días se identificó la formación de 5 tipos de callos. El primer tipo, compuesto por células vítreas, de colores blanco-translúcido y blanco-marrón, de forma redonda, de texturas compacta y seca. El segundo tipo compuesto por células vítreas, de colores amarillo-marrón, amarillo-café y amarillo-café-marrón, de forma no definida, de texturas compacta y seca. El tercer tipo compuesto por células de color amarillo, de forma no definida, de texturas cerosa, friable y seca. El cuarto tipo compuesto por células de colores blanco, blanco-café y amarillo-blanco, de morfología redonda, de texturas tipo algodón, friable y seca. Y por último, el quinto tipo compuesto por células de colores amarillo-blanco-café y amarillo-café-marrón, de morfología no definida y tamaños variables, de texturas cerosa, friable y acuosa (Fig. 5).



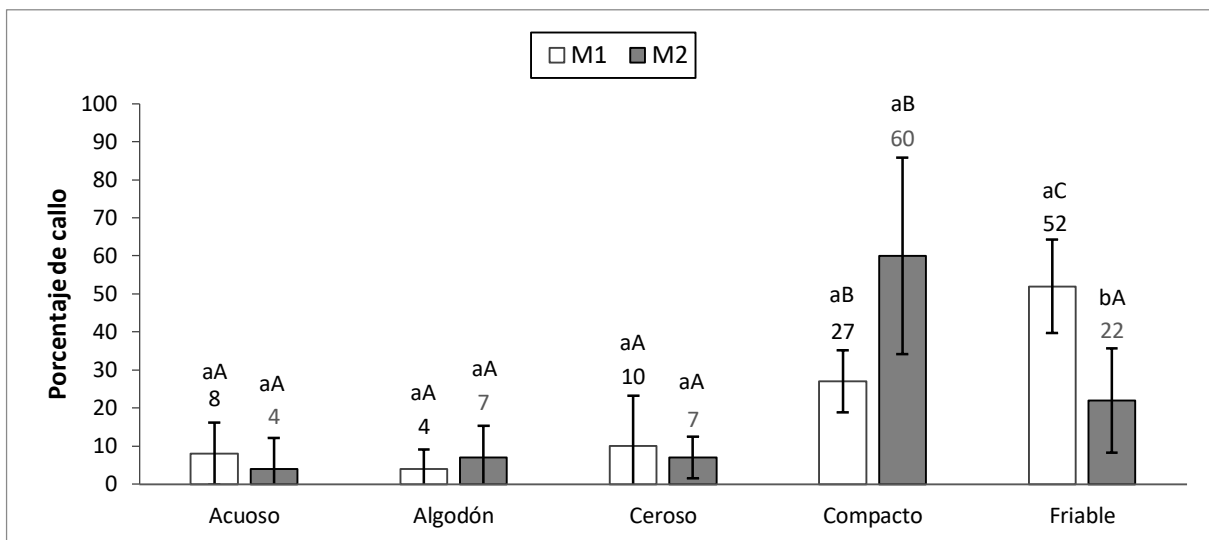
**Figura 5.** Tipos de callos desarrollados a partir de estaminodios de *Theobroma bicolor* Humb. & Bonpl. (A) Callo compuesto por células de color blanco-translúcido, de textura compacta, (B) callo compuesto por células de colores blanco-marrón, de textura compacta, (C) callo compuesto por células de colores amarillo-marrón, de textura compacta, (D) callo compuesto por células de colores amarillo-café, de textura compacta, (E) callo compuesto por células de color amarillo, de textura cerosa, (F) callo compuesto por células de color blanco, de textura tipo algodón, (G) callo compuesto por células de colores blanco-café, de textura tipo algodón, (H) callo compuesto por células de colores amarillo-blanco-café, de texturas cerosa-acuosa y (I) callo compuesto por células de colores amarillo-café-marrón, de texturas cerosa-acuosa.

Por otra parte, a los 45 días de cultivo, se calculó de manera independiente el porcentaje de callos correspondientes a cada característica morfológica de color y textura. Los resultados mostraron que la variación de las concentraciones de 2,4-D (9  $\mu\text{M}$  - 20  $\mu\text{M}$ ) y de TDZ (22.7 nM - 1  $\mu\text{M}$ ) en los medios de cultivo iniciales, influenció en las características morfológicas de los callos. El medio de cultivo inicial 1, mostró mayor porcentaje de callos compuestos por células de colores amarillo-blanco 27% y textura friable 52% y, menor porcentaje de callos compuestos por células de colores amarillo-blanco-café y sólo blanco 2% y textura de tipo algodón 4%; mientras el medio de cultivo inicial 2, mostró mayor porcentaje

de callos compuestos por células de colores blanco-translúcido 31% y textura compacto 60% y, menor porcentaje de callos compuesto por células de colores amarillo-marrón 0% y textura tipo acuoso 4% (Fig. 6 y Fig. 7).



**Figura 6.** Porcentaje de callos según el color, desarrollados a partir de estaminodios de *Theobroma bicolor* Humb. & Bonpl. Evaluación realizada a los 45 días de cultivo. M1: 9  $\mu$ M de 2,4-D y 22.7 nM de TDZ y M2: 20  $\mu$ M de 2,4-D y 1  $\mu$ M de TDZ. La figura indica los valores expresados en porcentaje seguidos de  $\pm$  la desviación estándar (barras verticales). Las letras en minúscula indican diferencia estadística entre los medios de cultivo iniciales y las letras en mayúscula indica diferencia estadística entre los colores.



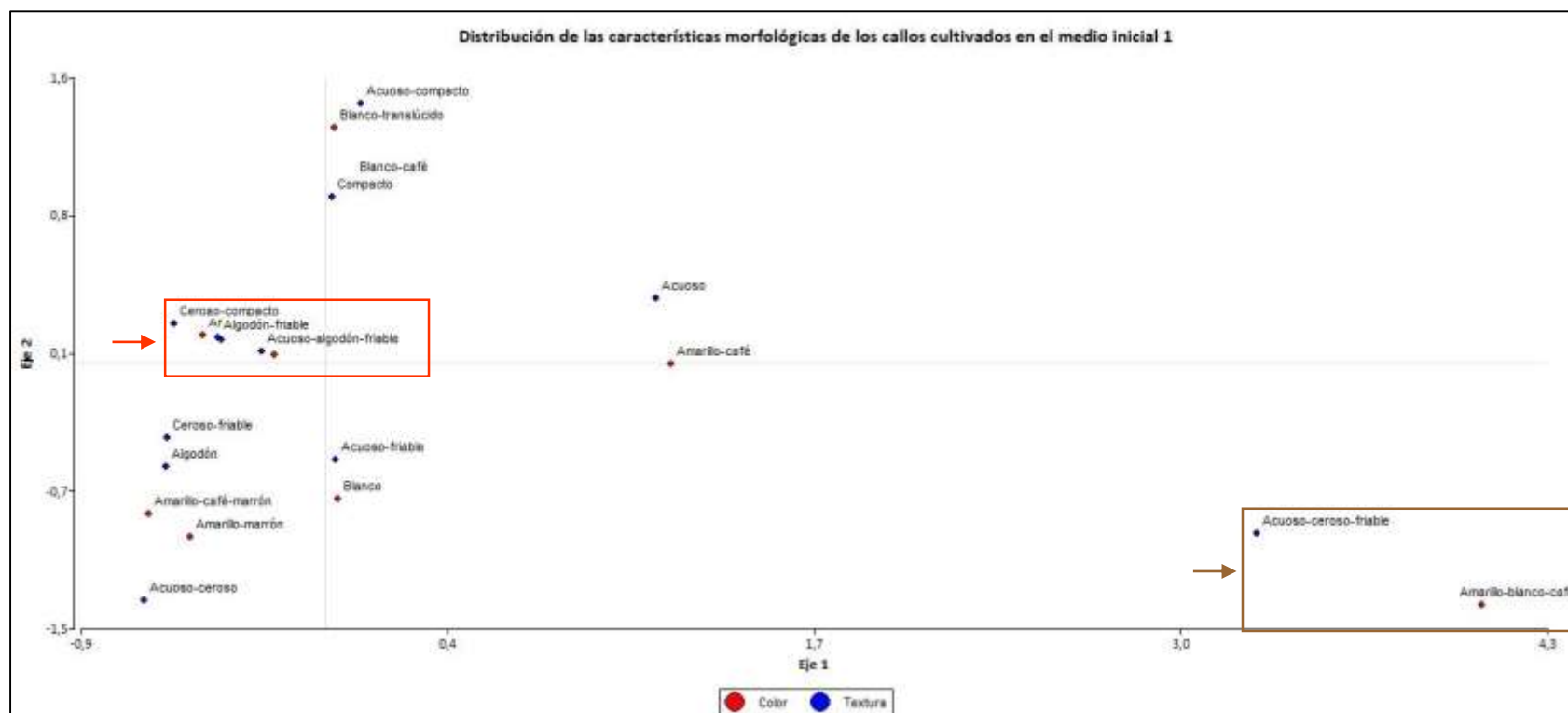
**Figura 7.** Porcentaje de callos según la textura, desarrollados a partir de estaminodios de *Theobroma bicolor* Humb. & Bonpl. Evaluación realizada a los 45 días de cultivo. M1: 9  $\mu\text{M}$  de 2,4-D y 22.7 nM de TDZ y M2: 20  $\mu\text{M}$  de 2,4-D y 1  $\mu\text{M}$  de TDZ. La figura indica los valores expresados en porcentaje seguidos de  $\pm$  la desviación estándar (barras verticales). Las letras en minúscula indican diferencia estadística entre los medios de cultivo iniciales y las letras en mayúscula indica diferencia estadística entre las texturas.

La relación entre las características morfológicas de color y textura fue analizada según su distribución dentro del gráfico Biplot, para lo cual se tomó en cuenta el centroide, punto de corte de los ejes. Una distribución asimétrica de las características morfológicas evaluadas fue observada. Un grupo de las características se ubicaron cerca del centroide con una distancia mínima entre ellas, lo que indica que se encuentran estrechamente relacionadas. Mientras que, otro grupo de características se ubicó lejos del centroide con una distancia mayor entre ellas, lo que indica que se encuentran distantemente relacionadas.

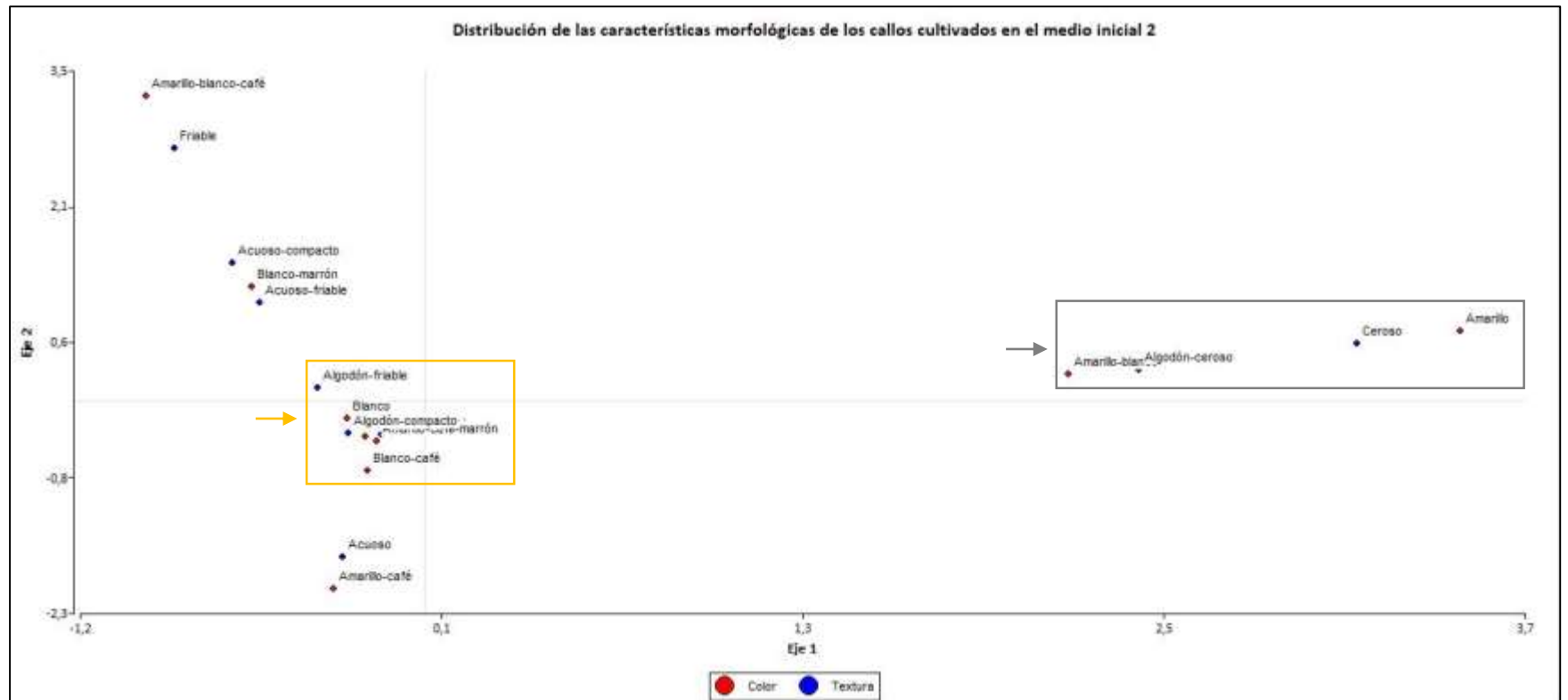
Los resultados mostraron que la variación de las concentraciones de 2,4-D (9  $\mu\text{M}$  - 20  $\mu\text{M}$ ) y de TDZ (22.7 nM - 1  $\mu\text{M}$ ) en los medios de cultivo iniciales, influyó en la relación entre las características morfológicas de color y textura. Una relación estrecha se evidenció en los callos provenientes del medio de cultivo inicial 1, compuestos por células de colores amarillo-blanco y amarillo marrón con las texturas cerosa-compacta, algodón-friable y acuosa-algodón-friable (flecha roja - Fig. 8). Del mismo modo, en los callos provenientes del medio de cultivo inicial 2, compuestos por células de colores blanco, blanco-café y blanco-translúcido con las texturas algodón-friable y algodón-compacta (flecha amarilla - Fig. 9). Al contrario, una



relación distante se evidenció en los callos provenientes del medio de cultivo inicial 1, compuestos por células de colores amarillo-blanco-café con las texturas acuosa-cerosa-friable (flecha marrón - Fig. 8). Del mismo modo, en los callos provenientes del medio de cultivo inicial 2, compuestos por células de colores amarillo y amarillo-blanco-café con la textura cerosa (flecha gris - Fig. 9).

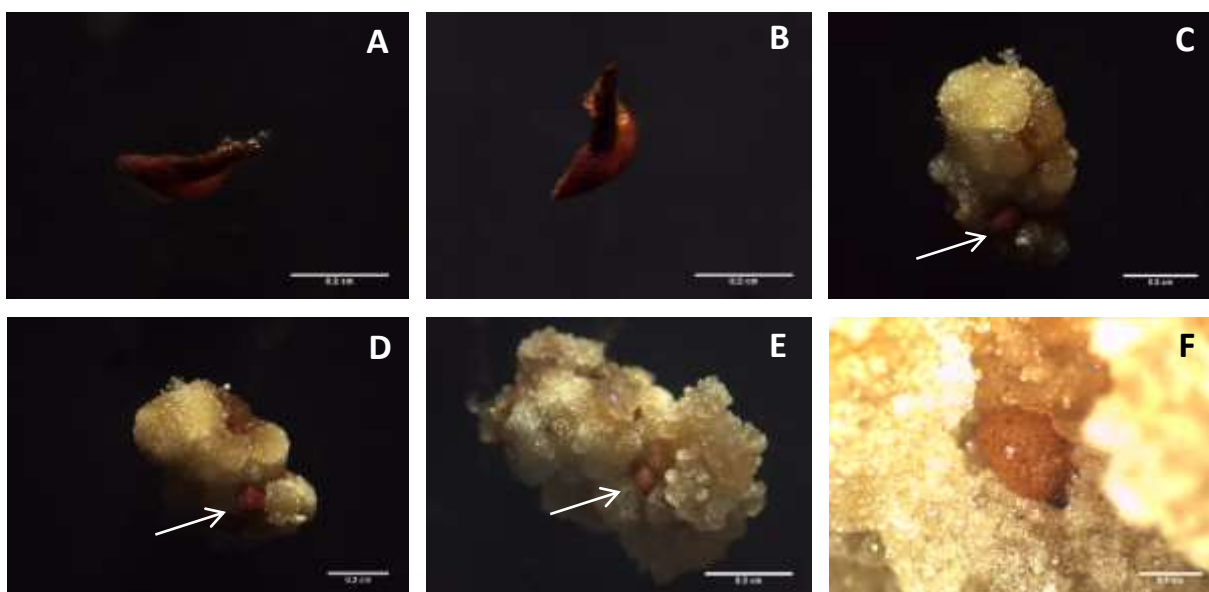


**Figura 8.** Distribución de las características morfológicas, color y textura, en los callos desarrollados a partir de estaminodios de *Theobroma bicolor* Humb. & Bonpl. cultivados en el medio de cultivo inicial 1 suplementado con 9  $\mu\text{M}$  de 2,4-D y 22.7 nM de TDZ. Evaluación realizada a los 45 días de cultivo. Las variables cualitativas fueron sometidas a un Análisis de Correspondencia Simple, el cual opera sobre la matriz de desviaciones Chi-cuadrado. Los círculos de color rojo corresponden a la característica morfológica: color, mientras que los círculos de color azul a la característica morfológica: textura.



**Figura 9.** Distribución de las características morfológicas, color y textura, en los callos desarrollados a partir de estaminodios de *Theobroma bicolor* Humb. & Bonpl. cultivados en el medio de cultivo inicial 2 suplementado con 20  $\mu\text{M}$  de 2,4-D y 1  $\mu\text{M}$  de TDZ. Evaluación realizada a los 45 días de cultivo. Las variables cualitativas fueron sometidas a un Análisis de Correspondencia Simple, el cual opera sobre la matriz de desviaciones Chi-cuadrado. Los círculos de color rojo corresponden a la característica morfológica: color, mientras que los círculos de color azul a la característica morfológica: textura.

Finalmente, se registró el proceso de formación de los embriones somáticos a partir de los explantes que mostraron respuesta embriogénica. La formación de embriones inició con una transición del callo compuesto por células de colores amarillo-café-marrón, de texturas acuoso-ceroso-friable hacia un callo de tamaño mayor y de forma no definida, compuesto por células de color amarillo-blanco-café, de texturas cerosa-friable. En la superficie de este callo, se identificó estructuras proembriogénicas, que emergieron quedando adheridas, las cuales fueron observadas a los 60 días de cultivo. Por último, se observó que a partir de esta estructura hubo una transición a la formación de embriones somáticos completamente visibles a los 90 días de cultivo (Fig. 10).



**Figura 10.** Proceso de formación de embriones somáticos a partir de estaminodios de *Theobroma bicolor* Humb. & Bonpl. Estaminodio y explante cultivado en el medio de cultivo inicial suplementado con 9  $\mu$ M de 2,4-D y 22.7 nM de TDZ. (A) Estaminodio a los 8 días de cultivo, (B) estaminodio a los 15 días de cultivo, (C) callo desarrollado a los 45 días de cultivo, (D) formación de estructura proembriogénica a los 60 días de cultivo (flecha blanca), (E) expresión de embriones somáticos a los 90 días de cultivo (flecha blanca), (F) embrión somático a los 90 días de cultivo con un aumento de 35x con estereomicroscopio.

#### 4. DISCUSIÓN

En el presente estudio, la inducción de la ES en *T. bicolor* a partir de estructuras florales en medios de cultivo suplementados con diferentes concentraciones de 2,4-D y TDZ,

combinado con KIN, desencadenó una vía embriogénica indirecta, se observó la proliferación de tejido amorfo, desorganizado y desdiferenciado el cual dio lugar a la formación de callo. El uso de auxinas, específicamente 2,4-D, promueve la ES indirecta, medios de cultivo ricos en auxinas inducen la formación de grandes cantidades de callos (Kononowicz et al., 1984). Auxinas y citoquininas son esenciales y necesarios para la proliferación celular *in vitro*, la relación auxina/citoquinina determina la vía morfogénica que seguirá el tejido cultivado y una relación adecuada permitirá el desarrollo de células embriogénicas (Bhatia, 2015; Loyola-Vargas & Ochoa-Alejo, 2016).

Resultados similares se han reportado en la inducción de la ES en *T. cacao*, utilizando medios suplementados con 2,4-D, TDZ y KIN, estudios realizados con diferentes genotipos muestran que la inducción de la ES, utilizando estructuras florales, desencadena la vía embriogénica indirecta (Li et al., 1998; Minyaka et al., 2008; Monsalve González et al., 2010; Quainoo & Dwomo, 2012; Henao Ramírez et al., 2018).

Esto permite sugerir que las estructuras florales utilizadas en *T. cacao* como en *T. bicolor*, previo a adquirir la competencia embriogénica, atraviesan por un proceso de proliferación celular hasta la formación de callo con células desdiferenciadas. Es decir, células adultas maduras revierten su estado a células juveniles.

La formación de callo en la inducción de la ES en *T. bicolor*, inició a los 8 días de cultivo en los estaminodios de los dos medios de cultivo iniciales, el uso de diferentes concentraciones de 2,4-D y TDZ no afectó el inicio de formación de callo, lo que indica que este evento es independiente de la concentración de los PGRs. La auxina más utilizada en la ES, es la auxina sintética 2,4-D, promueve la secreción completa de un conjunto diferente de proteínas y el aumento de especies reactivas de oxígeno (ROS), asociadas a un estrés oxidativo, el cual puede conducir a señales que inducen la reprogramación celular (Loyola-Vargas & Ochoa-Alejo, 2016). Resultado del estrés, se activa y promueve la división celular conduciendo a la formación temprana de grupos de pequeñas células con citoplasmas densos, que por sucesivas divisiones dan lugar a la formación de callos (Huang & Yeoman, 1984). TDZ juega un papel fundamental en la morfogénesis, induce diferentes respuestas, tales como la acumulación o incremento en la actividad de auxina endógena, participa en la modificación de las membranas

celulares, los niveles de energía, la absorción y asimilación de nutrientes. Ha sido reportado que TDZ induce la formación de callo, en explantes de especies leñosas, se ha obtenido resultados exitosos usando concentraciones mayores a 0.1  $\mu\text{M}$  de TDZ (Guo et al., 2011).

Por otro lado, la tasa de crecimiento de callo, durante los primeros 15 días de cultivo, se vio ralentizada en los estaminodios cultivados en el medio de cultivo suplementado con 20  $\mu\text{M}$  de 2,4-D y 1  $\mu\text{M}$  de TDZ, cuyas concentraciones de los PGRs fueron más altas que las del medio de cultivo inicial 1. La presencia de 2,4-D, desencadena la formación y crecimiento de callo (Loyola-Vargas & Ochoa-Alejo, 2016). Sin embargo, la exposición de los estaminodios a altas concentraciones de TDZ, puede impedir la síntesis de etileno endógeno, provocando la inhibición de la iniciación y crecimiento de callo (Li et al., 1998; Pais, 2019). Después de los 15 días de cultivo, se observó un descenso ligero en la tasa de crecimiento de callo en los explantes provenientes de los medios de cultivo iniciales, la cual se mantuvo hasta después de los 30 días de cultivo. Estos resultados se ajustan a lo sugerido por Bhatia (2015), el desarrollo de callo durante la ES sigue un patrón de crecimiento igual a una curva sigmoidea, dividida en tres fases, la primera llamada fase de retraso, donde las células se adaptan al medio de cultivo, el cual es suplementado de nutrientes y PGRs; luego la segunda llamada fase logarítmica, las células se dividen rápidamente provocando un aumento en el número de células y la última llamada fase estacionaria, donde la tasa de división celular disminuye, el número de células se estabiliza y el crecimiento finalmente se detiene.

Resultados similares fueron reportados por Li et al. (1998), Monsalve González et al. (2010) y Henao Ramírez et al. (2018) en la ES de *T. cacao*, utilizando el medio de cultivo suplementado con 9  $\mu\text{M}$  de 2,4-D y 22.7 nM de TDZ, donde la formación de callos se registró entre los 7 y 14 días después de la inoculación. Por otro lado, la tasa de formación de callo observada en el presente estudio, se ajusta a los resultados obtenidos por Li et al. (1998), donde la tasa más alta de proliferación de callos se observó con una concentración de 22.7 nM de TDZ, mientras que al aumentar la concentración a 454.5 nM de TDZ, la producción de callos se limitó a la base del explante con crecimiento reducido y un obscurecimiento en el resto del explante. En contraste, Velásquez Salazar et al. (2006) durante la ES de *T. cacao*, reportaron

que al ajustar las concentraciones de 2,4-D a 20  $\mu\text{M}$ , hubo una estimulación de la tasa de proliferación de callo.

Esto sugiere que, la respuesta callogénica durante la ES de *T. bicolor* es similar a la de *T. cacao*, el inicio de la formación de callo es independiente de las concentraciones de 2,4-D y TDZ utilizadas en los medios de cultivo iniciales, mientras que la tasa de crecimiento de callo, es influenciada por las concentraciones de 2,4-D y TDZ utilizadas en los medios de cultivo iniciales, la cual se estabiliza con el uso de 2,4-D y KIN en el segundo medio de cultivo.

La formación de embriones somáticos fue evidenciada en explantes provenientes del medio de cultivo inicial suplementado con 9  $\mu\text{M}$  de 2,4-D y 22.7 nM de TDZ. El desarrollo de embriones somáticos se da en respuesta a la adición de PGRs específicos, los cuales permiten que las células somáticas diferenciadas se desdiferencien en células competentes para la embriogénesis (Bhatia, 2015). Según Loyola-Vargas & Ochoa-Alejo (2016), en cultivos establecidos, las masas de células proembriogénicas se forman como una etapa de transición hacia la ES, este proceso se encuentra regulado por la presencia de auxinas. La polarización de células previo al desarrollo embrionario, se lleva a cabo mediante la síntesis, el transporte diferencial y la distribución asimétrica continua de auxinas polares, las cuales son influenciadas por la aplicación de PGRs exógenos (Fehér, 2008; Nic-Can & Loyola-Vargas, 2016; Méndez-Hernández et al., 2019). Se ha reportado que el uso de 2,4-D conduce a la pérdida de la polaridad original de la célula e interfiere con los gradientes de auxina endógenos perturbando el programa de organogénesis (Nic-Can & Loyola-Vargas, 2016). El uso de TDZ también juega un papel importante en este proceso, mantiene, mejora la acumulación y el transporte de auxina (Guo et al., 2011). Además de 2,4-D y TDZ, la presencia de KIN, también favorece la inducción de tejidos embriogénicos ya que posee la capacidad de estimular la biosíntesis de citoquinina endógena o alterar su metabolismo, además, que mantiene una acción coordinada con la auxina, manteniendo un equilibrio hormonal (Li et al., 1998; Henao Ramírez et al., 2018).

Además, la formación de embriones somáticos fue observada una vez que los explantes fueron transferidos al medio de cultivo libre de PGRs, este proceso inició a los 60 y culminó a los 90 días de cultivo. Kononowicz et al. (1984) y Fehér (2008), mencionan que el desarrollo de embriones somáticos procede en medios de cultivo libres de PGRs, esto permite que las células

sean capaces de autoabastecerse de auxinas por medio de su síntesis a través de una ruta alterna. La remoción de 2,4-D del medio de cultivo es esencial para permitir la inducción de la ES, ya que se produce una reducción de la concentración de auxina endógena, y la inactivación de un número determinado de genes reguladores de la ES, que en consecuencia, genera la formación de embriones somáticos (Nic-Can & Loyola-Vargas, 2016; Zimmerman, 1993).

Resultados similares fueron reportados por Li et al. (1998), Quainoo & Dwomo (2012) y Henao Ramírez et al. (2018) en la ES en *T. cacao*, en medios de cultivo suplementado con 9  $\mu\text{M}$  2,4-D y 22.7 nM de TDZ, seguido de un medio de cultivo suplementado con 9  $\mu\text{M}$  de 2,4-D y 1.4  $\mu\text{M}$  de KIN y, finalmente, un medio libre de PGRs; la formación de embriones somáticos se observó desde los 42 hasta 75 días de cultivo. Esto indica que la formación de embriones somáticos en *T. bicolor* se ajusta al tiempo observado en especies del mismo género.

Por otro lado, la respuesta embriogénica registrada en el presente estudio fue de 1.67%, este valor podría estar asociado a la interacción de los PGRs, el origen y tipo de explante, el genotipo de la planta, entre otros (Loyola-Vargas & Ochoa-Alejo, 2016). En *T. cacao*, Li et al. (1998), Quainoo & Dwomo (2012) y Henao Ramírez et al. (2018), reportaron respuestas embriogénicas de 0 a 98%. Esta diferencia se la ha asociado a los genotipos utilizados, el estado fisiológico de la planta donadora y el tiempo de cultivo (Quainoo & Dwomo, 2012).

Es posible sugerir que, la expresión de embriones somáticos en *T. bicolor*, depende del equilibrio de las concentraciones de 2,4 D y TDZ utilizados durante el proceso de inducción, el cual estaría asociado a la desprogramación de la ruta celular del explante y a la reprogramación celular del callo con el fin de desencadenar la diferenciación y expresión de embriones somáticos.

Los explantes provenientes del medio de cultivo inicial suplementado con 20  $\mu\text{M}$  de 2,4-D y 1  $\mu\text{M}$  de TDZ, mostraron respuesta embriogénica de 0%. Las concentraciones de 2,4-D y TDZ suplementadas al medio de cultivo inicial fueron más altas en comparación con aquellas suplementadas en el medio donde se observó la expresión de embriones somáticos. Es posible asociar estos resultados a que la adición de altas concentraciones de auxina al medio de cultivo



suele suprimir el crecimiento organizado de las células y puede anular la polaridad de la masa embriogénica, desencadenando la inhibición del proceso embriogénico iniciado por las auxinas endógenas (Henaó Ramírez et al., 2018). Se ha descrito que tratamientos con altas concentraciones de TDZ obstaculizan el crecimiento y desarrollo de los embriones, debido a la disminución de auxina y citoquinina endógenas. Además, se ha reportado que TDZ puede promover la acumulación de compuestos fenólicos e influenciar en el desempeño de enzimas antioxidantes (Guo et al., 2011). Se debe recalcar que la secreción de compuestos fenólicos de células cultivadas en condiciones de estrés, pueden inhibir la ES en algunas especies (Loyola-Vargas & Ochoa-Alejo, 2016). Las especies del género *Theobroma* son ricas en compuestos fenólicos (García et al., 2002; Hii et al., 2009; Lim, 2016) y existen reportes de la liberación de estos compuestos en la ES en *T. cacao* (Alemanno et al., 1996; Gallego Rúa et al., 2016), por lo que podría considerarse como un factor limitante en la formación de embriones somáticos en *T. bicolor*.

Resultados similares en la ES en *T. cacao* fueron reportados por Li et al. (1998), los cuales verificaron un descenso notable en la respuesta embriogénica en explantes que provenían del medio de cultivo suplementado con concentraciones superiores a 22.7 nM de TDZ, llegando a obtener una respuesta embriogénica nula bajo una concentración de 227.3 nM de TDZ. Asimismo, Quainoo & Dwomo (2012), verificaron una disminución notable en la frecuencia y respuesta embriogénica de explantes que provenían del medio de cultivo suplementado con concentraciones superiores a 4.05  $\mu$ M de 2,4-D, llegando a obtener una respuesta embriogénica nula bajo una concentración de 9  $\mu$ M de 2,4-D.

Por otro lado, el desarrollo de embriones somáticos en los explantes de *T. bicolor* en el presente estudio, estuvo asociado a callos compuestos por células de colores amarillo-blancocafé y texturas acuoso-ceroso-friable. Según Bhatia (2015), dependiendo de las condiciones *in vitro*, los callos adquieren diferente morfología y textura, las cuales pueden relacionarse a la capacidad embriogénica.

Resultados similares se encontraron en el desarrollo de embriones somáticos en *T. cacao*, callos compuestos por células isodiamétricas de color amarillo, callos compuestos por células de color pajizo con una forma irregular, de aspecto semitranslúcido y callos compuestos

por células granulares de color marrón y textura friable están asociados a cultivos embriogénicos. Mientras que callos compuestos por células de color blanco de textura compacta, callos compuestos por gigantes células translúcidas de una forma irregular y callos compuestos por células granulares de apariencia vítrea están asociados a cultivos no embriogénicos (Alemanno et al., 1996; Garcia et al., 2016; Henao Ramírez et al., 2018).

La presencia de callos con capacidad embriogénica fue mayor, en explantes provenientes del medio de cultivo inicial suplementado con 9  $\mu\text{M}$  de 2,4-D y 22.7 nM de TDZ, 2% de callos compuestos por células de colores amarillo-blanco-café y 52% para las texturas acuoso-ceroso-friable, comparado con los explantes provenientes del medio de cultivo inicial suplementado con 20  $\mu\text{M}$  de 2,4-D y 1  $\mu\text{M}$  de TDZ, 2% callos de colores amarillo-blanco-café y 22% para las textura acuoso-ceroso-friable.

Existen reportes que describen que la formación de callo está asociada con la relación auxina/citoquinina (Loyola-Vargas & Ochoa-Alejo, 2016), a pesar de ello, no se ha podido determinar si las características morfológicas se encuentran asociadas a esta relación (Bhatia, 2015). Chanatásig Vaca (2004), menciona que un tipo de callo no es exclusivo de un determinado explante o tratamiento, incluso más de una característica morfológica puede presentarse en un mismo explante. Jheng et al. (2006), reportaron que los niveles de combinación de 2,4-D y TDZ exógenos cambiaron el callo granular y amarillo de *Oncidium* en un callo embriogénico más friable o compacto. Existen pocos informes disponibles sobre el tipo de callo inducido por TDZ; sin embargo, ha sido descrito que en *Azadirachta indica* A. Juss, se forma un callo compuesto por células isodiamétricas de color verde y textura compacto a bajas concentraciones de TDZ (Guo et al., 2011).

Para *T. bicolor*, las variaciones de las concentraciones de 2,4-D y TDZ suplementadas a los medios de cultivo iniciales influenciaron en la relación que existe entre las características morfológicas de los callos desarrollados, aquellos que provinieron del medio de cultivo inicial suplementado con 9  $\mu\text{M}$  de 2,4-D y 22.7 nM de TDZ, tenían características de colores amarillo-blanco y amarillo marrón asociadas con las texturas cerosa-compacta y acuosa-algodón-friable. Mientras que, los que provinieron del medio de cultivo inicial suplementado con 20

$\mu\text{M}$  de 2,4-D y  $1 \mu\text{M}$  de TDZ, tenían características de colores blanco, blanco-café y blanco-translúcido asociados con las texturas algodón-friable y algodón-compacta.

Se ha observado que, en la ES de *T. cacao*, los callos desarrollados a partir de estaminodios, poseen características morfológicas de color crema asociado con la textura compacta (Díaz-López et al., 2015), el color blanco asociado con la textura tipo algodón (Buah, 2010) y el color translúcido asociado con las texturas friable y compacta (Chanatásig Vaca, 2004).

En este contexto se sugiere que en la ES en *T. bicolor*, los callos con potencial embriogénico están compuestos por células de colores amarillo-blanco-café y texturas acuoso-ceroso-friable, sin embargo, se necesitan más estudios para consolidar esta información.

## 5. CONCLUSIONES

El presente estudio describe por primera vez, el proceso de inducción de la ES en *T. bicolor*, en el cual se evidenció que las concentraciones de 2,4-D y TDZ utilizadas en el medio de cultivo inicial, desencadenaron la vía embriogénica indirecta, donde la formación de callos inició a los 8 días de cultivo. La respuesta callogénica a los 15 días estuvo asociada a las concentraciones de 2,4-D y TDZ utilizadas en los medios de cultivo iniciales, donde se observó una ralentización de crecimiento asociada a las altas concentraciones de TDZ, las cuales no afectaron a la respuesta callogénica final. El desarrollo de callo se ajustó a un patrón de crecimiento sigmoideo. Por otro lado, la respuesta embriogénica estuvo asociada a la concentración de 2,4 D y TDZ utilizada en el medio de cultivo inicial, la cual permitió desencadenar vías de desprogramación y reprogramación celular hacia la formación de embriones somáticos. Finalmente, se estableció un protocolo de inducción de ES para *T. bicolor*, basado en tres medios: 1) medio de cultivo inicial suplementado con  $9 \mu\text{M}$  de 2,4-D y  $22.7 \text{ nM}$  de TDZ, 2) medio de cultivo suplementado con  $9 \mu\text{M}$  de 2,4-D y  $1.4 \mu\text{M}$  de KIN y 3) medio cultivo libre de PGRs. Por otra parte, los análisis realizados a las variables cualitativas ayudaron a comprender la asociación de las características morfológicas de los callos a la respuesta embriogénica, sin embargo, se necesitan más estudios para profundizar los conocimientos hacia la comprensión de este proceso. Los hallazgos en este estudio se

constituyen en una base científica para estudios de desarrollo embriogénico, elaboración de estrategias de propagación clonal *in vitro* de esta especie a largo plazo, así como en un aporte al conocimiento de la ES en especies del género *Theobroma*, nativas de la Región Amazónica.

## 6. REFERENCIAS

- Alemanno, L., Berthouly, M., & Michaux-Ferrière, N. (1996). Histology of somatic embryogenesis from floral tissues cocoa. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 46(3), 187–194. <https://doi.org/10.1007/BF02307094>
- Altamura, M. M., Rovere, F. Della, Fattorini, L., D'Angeli, S., & Falasca, G. (2016). Recent Advances on Genetic and Physiological Bases of *In Vitro* Somatic Embryo Formation. In M. A. Germaná & M. Lambardi (Eds.), *In Vitro Embryogenesis in Higher Plants, Methods in Molecular Biology* (Vol. 1359, pp. 405–413). Springer Science. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3061-6\\_3](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3061-6_3)
- Barrera, A. (1999). *Determinación de algunas propiedades físico mecánicas de la semilla de Maraco (Theobroma bicolor H.B.K.) y obtención del bacalate*. Univerdad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano.
- Bhatia, S. (2015). Plant Tissue Culture. In *Modern Applications of Plant Biotechnology in Pharmaceutical Sciences* (pp. 31–107). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802221-4.00002-9>
- Buah, J. N. (2010). Callus Induction and Somatic Embryogenesis in Five Cacao (*Theobroma cacao* L.) Genotypes in Ghana. *Biotechnology (Faisalabad)*, 9(3), 355–361. <https://doi.org/10.3923/biotech.2010.355.361>
- Chanatásig Vaca, C. I. (2004). Inducción de la embriogénesis somática en clones superiores de cacao (*Theobroma cacao* L.), con resistencia a enfermedades fungosas. In *Escuela de Posgrado, Programa de Educación para el Desarrollo y la Conservación del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza*. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza CATIE.
- Díaz-López, A., Sánchez, D., Valera-Leal, J., & Vegas García, A. (2015). Formación de embriones somáticos en cinco cultivares de *Theobroma cacao* L. cultivados en Venezuela. *Biotecnología Vegetal*, 15(1), 27–34. <file:///C:/Users/Usuario/AppData/Local/Temp/6->

17-1-PB.pdf

- Driver, J. A., & Kuniyuki, A. H. (1984). *In vitro* propagation of Paradox Walnut rootstock. *Horticultural Science*, *19*(4), 507–509.
- Fehér, A. (2005). Why somatic plant cells start to form embryos? *Plant Cell Monographs*, *2*(December), 85–101. [https://doi.org/10.1007/7089\\_019](https://doi.org/10.1007/7089_019)
- Fehér, A. (2008). The initiation phase of somatic embryogenesis: What we know and what we don't. *Acta Biologica Szegediensis*, *52*(1), 53–56.
- Fehér, A. (2015). Somatic embryogenesis: Stress-induced remodeling of plant cell fate. *Biochimica et Biophysica Acta Journal*, *1849*, 385–402.
- Fontanel, A., Gire-Bobin, S., Labbé, G., Favereau, P., Álvarez, M., Rutte, S., & Pétiard, V. (2002). *In vitro* multiplication and plant regeneration of *Theobroma cacao* L. via stable embryogenic calli. *10 IAPTC Congress*, 23–28.
- Freire Seijo, M. (2003). Aspectos básicos de la embriogénesis somática. *Bioteología Vegetal*, *3*(4), 195–209.
- Gallego Rúa, A. M., Henao Ramírez, A. M., Urrea Trujillo, A. I., & Atehortúa Garcés, L. (2016). Polyphenols distribution and reserve substances analysis in cacao somatic embryogenesis. *Acta Biológica Colombiana*, *21*(2), 335–345. <https://doi.org/10.15446/abc.v21n2.50196>
- Garcia, C., Corrêa, F., Findley, S., Almeida, A.-A., Costa, M., Motamayor, J. C., Schnell, R., & Marelli, J.-P. (2016). Optimization of somatic embryogenesis procedure for commercial clones of *Theobroma cacao* L. *African Journal of Biotechnology*, *15*(36), 1936–1951. <https://doi.org/10.5897/ajb2016.15513>
- García, D., Assunção, D., Mancini, P., Torres, R., & Mancini-Filho, J. (2002). Antioxidant activity of macambo (*Theobroma bicolor* L.) extracts. *European Journal of Lipid Science and Technology*, *104*(5), 278–281. [https://doi.org/10.1002/1438-9312\(200205\)104:5<278::AID-EJLT278>3.0.CO;2-K](https://doi.org/10.1002/1438-9312(200205)104:5<278::AID-EJLT278>3.0.CO;2-K)
- González, A. A., Moncada, J., Idarraga, A., Rosenberg, M., & Cardona, C. A. (2016). Potential of the amazonian exotic fruit for biorefineries: The *Theobroma bicolor* (Makambo) case. *Industrial Crops and Products*, *86*, 58–67. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.02.015>

- Guo, B., Abbasi, B. H., Zeb, A., Xu, L. L., & Wei, Y. H. (2011). Thidiazuron: A multi-dimensional plant growth regulator. *African Journal of Biotechnology*, 10(45), 8984–9000. <https://doi.org/10.5897/ajb11.636>
- Henao Ramírez, A. M., de la Hoz Vasquez, T., Ospina Osorio, T. M., Garcés, L. A., & Urrea Trujillo, A. I. (2018). Evaluation of the potential of regeneration of different Colombian and commercial genotypes of cocoa (*Theobroma cacao* L.) via somatic embryogenesis. *Scientia Horticulturae*, 229, 148–156. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.10.040>
- Hii, C. L., Law, C. L., Suzannah, S., & Cloke, M. (2009). Polyphenols in cocoa (*Theobroma cacao* L.). *Asian Journal of Food and Agro-Industry*, 2(4), 702–722. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822000000400003>
- Huang, B., & Yeoman, M. (1984). Callus proliferation and morphogenesis in tissue cultures of *Arapidopsis thaliana* L. *Plant Science Letters*, 33, 353–363.
- Irvine, D. (1987). *Resource Management by the Runa Indians of the Ecuadorian Amazon*. PhD Dissertation Stanford University.
- Jee, M. H. (1984). Composition of the fat extracted from the seeds of *Theobroma bicolor*. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 61(4), 751–753. <https://doi.org/10.1007/BF02672127>
- Jheng, F. Y., Do, Y. Y., Liauh, Y. W., Chung, J. P., & Huang, P. L. (2006). Enhancement of growth and regeneration efficiency from embryogenic callus cultures of *Oncidium 'Gower Ramsey'* by adjusting carbohydrate sources. *Plant Science*, 170, 1133–1140.
- Kononowicz, H., Kononowicz, A. K., & Janick, J. (1984). Asexual Embryogenesis via Callus of *Theobroma cacao* L. *Zeitschrift Für Pflanzenphysiologie*, 113(4), 347–358. [https://doi.org/10.1016/s0044-328x\(84\)80041-0](https://doi.org/10.1016/s0044-328x(84)80041-0)
- Li, Z., Traore, A., Maximova, S., & Gultinan, M. J. (1998). Somatic embryogenesis and plant regeneration from floral explants of cacao (*Theobroma cacao* L.) using thidiazuron. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 293–299.
- Lim, T. K. (2016). Malvaceae: *Theobroma bicolor*. In *Edible Medicinal and Non-Medicinal Plants* (pp. 204–207). Springer. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-26065-5>
- Loyola-Vargas, V., & Ochoa-Alejo, N. (2016). *Somatic Embryogenesis: Fundamental Aspects*

- and Applications* (V. M. Loyola-Vargas & N. Ochoa-Alejo (eds.)). Springer International Publishing Switzerland. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-33705-0>
- Lugo, C., & Moncada, J. (2018). Sembrando vida y cultura: Las Chacras como espacios multifuncionales en comunidades indígenas andinas, caso, Fakcha Llakta, Otavalo, Ecuador. In J. R. Aranguren Carrera & J. A. Moncada Rangel (Eds.), *Una aproximación al conocimiento de la diversidad y multifuncionalidad de las chacras andinas*. Editorial UTN.
- Maximova, S. N., Alemanno, L., Young, A., Ferriere, N., Traore, A., & Gultinan, M. J. (2002). Efficiency, genotypic variability, and cellular origin of primary and secondary somatic embryogenesis of *Theobroma cacao* L. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, *38*, 252–259. <https://doi.org/10.1079/IVP2001257>
- Maximova, S., Young, A., Pishak, S., & Gultinan, M. J. (2008). Field performance of *Theobroma cacao* L. plants propagated via somatic embryogenesis. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, *44*, 487–493. <https://doi.org/10.1007/s11627-008-9130-5>
- Maximova, S., Young, A., Pishak, S., Miller, C., Traore, A., & Gultinan, M. J. (2005). Integrated system for propagation of *Theobroma cacao* L. *Forestry Sciences*, *77*, 209–227.
- McNeil, C. (2006). *Chocolate in Mesoamerica: a cultural history of cacao*. University Press of Florida.
- Melgarejo, L. M., Hernandez, M. S., Barrera, J. A., & Carrillo, M. (2006). *Oferta y potencialidades de un banco de germoplasma del género Theobroma en el enriquecimiento de los sistemas productivos de la región amazónica* (Primera). Instituto Amazónico de Investigaciones Científicas- Sinchi, Universidad Nacional de Colombia.
- Méndez-Hernández, H. A., Ledezma-Rodríguez, M., Avilez-Montalvo, R. N., Juárez-Gómez, Y. L., Skeete, A., Avilez-Montalvo, J., De-La-Peña, C., & Loyola-Vargas, V. M. (2019). Signaling overview of plant somatic embryogenesis. *Frontiers in Plant Science*, *10*(77), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00077>
- Minyaka, E., Niemenak, N., Fotso, Sangare, A., & Ndoumou Omokolo, D. (2008). Effect of MgSO<sub>4</sub> and K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> on somatic embryo differentiation in *Theobroma cacao* L. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, *94*, 149–160. <https://doi.org/10.1007/s11240-008-9398-5>

- Monsalve González, L. S., García Rojas, C. Y., & Sigarroa Rieche, A. K. (2010). Obtención de embriones somáticos primarios de *Theobroma cacao* en clones de interés regional para el departamento norte de Santander, Colombia. *Revista Respuestas - Universidad Francisco de Paula Santander*, 1.
- Nic-Can, G. I., & Loyola-Vargas, V. M. (2016). The role of the auxins during somatic embryogenesis. In V. M. Loyola-Vargas & N. Ochoa-Alejo (Eds.), *Somatic Embryogenesis: Fundamental Aspects and Applications* (Issue 130, pp. 171–182). Springer International Publishing Switzerland. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-33705-0>
- Olander, J. (2017). *Macambo: un superalimento de la selva tropical para ver*. <http://canopybridge.com/macambo-a-rainforest-superfood-to-watch/>
- Pais, M. S. (2019). Somatic embryogenesis induction in woody species: The future after OMICs data assessment. *Frontiers in Plant Science*, 10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00240>
- Peñuela-Mora, M. C., Schwarz, A., Monteros-Altamirano, Á., Zurita-Benavides, M. G., Cayapa, R., & Romero, N. (2016). *Guía de la Agrobiodiversidad. Tres comunidades kichwa: Atacapi, Alto Tena y Pumayacu*. Universidad Regional Amazónica Ikiam.
- Pérez-Mora, W., Jorrin-Novo, J. V., & Melgarejo, L. M. (2017). Substantial equivalence analysis in fruits from three *Theobroma* species through chemical composition and protein profiling. *Food Chemistry*, 496–504. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.07.128>
- Quainoo, 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(1), 72–78. <https://doi.org/10.5539/jps.v1n1p72>
- Tropicos.org. Missouri Botanical Garden. (2019). *Theobroma bicolor* Bonpl. <https://www.tropicos.org/Name/30400668>
- Velásquez Salazar, R., Sandrea, Y., Mata, J., & García, F. (2006). Embriogénesis somática en cultivares de cacao venezolanos. *Agronomía Trop.*, 56(1), 61–74.
- Zimmerman, J. L. (1993). Somatic Embryogenesis : A Model for Early Development in Higher Plants. *The Plant Cell*, 5, 1411–1423.