

# EL DESARROLLO VEGETATIVO DE CLONES DE CACAO PROCEDENTES DE EMBRIOGENESIS SOMATICA. Resultados obtenidos en el Ecuador

Arturo Garzón<sup>1</sup> y Didier Paulin<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Biotecnología EET Pichilingue,-INIAP, Km 5 vía El Empalme. Quevedo, Ecuador. Telfax (593) 5 2 750966. P.O. Box. 24. Email:igarzon@iniap-pichilingue.gov.ec

<sup>2</sup>CIRAD, Controlling pests and diseases in tree crops" research unit, Montpellier, F-34398, France. Email: didier.paulin@cirad.fr

## RESUMEN

El proyecto Firclone del CIRAD tuvo por objetivo la producción de plantas obtenidas por embriogénesis somática y la comparación entre las vitroplantas y las plantas procedentes de la multiplicación clonal vía injertos, estacas y semillas. El estudio se realizó en la Estación Experimental Tropical Pichilingue, INIAP (Ecuador), y en Gagnoa (Costa de Marfil) con la SAO (Touton S.A.). En ambos sitios, se sembraron en el 2004 dos ensayos comparativos de más de una hectárea. Seguidamente se presentan los primeros resultados obtenidos en el campo en Ecuador.

Diez clones de origen local (EET, CCAT, SNA, EB) y dos clones testigo (Sca6 , IMC67) fueron reproducidos por embriogénesis somática, injertos sobre patrones de alto bajo vigor y por enraizamiento de estacas plagiotrópicas. También se produjeron plántulas a partir de semillas obtenidas por polinización libre de estos genotipos. El diseño experimental es de parcelas subdivididas con 5 repeticiones, el factor principal fue asignado a la forma clonal y el factor secundario al genotipo. La comparación de la altura de las plantas y del diámetro en el cuello del eje principal, luego de un año de la siembra, muestra una diferencia altamente significativa entre las vitroplantas y las demás formas clonales y entre los genotipos; y una interacción significativa entre genotipo y forma clonal. La altura y el diámetro en el cuello de las vitroplantas son más importantes que los de las plántulas de semilla y de las demás formas clonales. El estudio comparativo de la arquitectura de las vitroplantas y las plántulas de semilla, mediante la medición de la densidad de las cicatrices foliares en el eje ortotrópico, pone de manifiesto que no hay modificación de la filotaxis de las plantas. La altura de formación de las coronas y la densidad de cicatrices foliares son similares en vitroplantas y plántulas de semilla, pero varían según los clones. Este estudio confirma, que la arquitectura de las vitroplantas es idéntica a la de las plántulas de semilla, aunque con un desarrollo más rápido, que les proporciona una mayor precocidad. La continuación de las observaciones, que estudiarán la arquitectura de la corona, las zonas floríferas y los parámetros de producción, permitirá comparar las aptitudes agronómicas de las diferentes formas y evaluar así el valor agronómico y productivo de las vitroplantas.

## INTRODUCCION

Según estadísticas reportadas por el Ministerio de Agricultura y Ganadería del Ecuador SICA (2004), actualmente el cacao en el país ocupa una superficie aproximada de 300 000 ha, distribuidas en 11 de las 22 provincias. Por diversos factores críticos, el 40% de

la superficie presenta bajos niveles de productividad, requiriéndose un urgente proceso de renovación. Estas cifras revelan la necesidad de disponer de metodologías de multiplicación clonal eficientes, que permitan iniciar proyectos comerciales de multiplicación masiva de plantas a fin de cubrir la demanda insatisfecha de los interesados en cultivar cacao, especialmente de la variedad Nacional con sabor “Arriba”.

Los sistemas de propagación vegetativa tradicionales han sido una importante herramienta para la multiplicación de genotipos seleccionados de cacao, por su habilidad para fijar genéticamente los atributos económicos de interés; no obstante, estas metodologías no han sido suficientes para satisfacer la demanda de materiales genéticos mejorados. Esta situación ha hecho que en el país los planes de renovación de plantaciones iniciados por el Estado y los productores, en la generalidad de los casos hayan sido ejecutados con materiales no mejorados y en muchos casos se continúe la práctica de siembra a partir de semillas de libre polinización, teniendo como consecuencia variaciones notables en los niveles de producción.

Es ampliamente conocido que el cacao es una especie de difícil propagación clonal, por lo tanto los estudios a nivel mundial se han intensificado hacia el perfeccionamiento de las técnicas ya disponibles y a la aplicación de nuevas tecnologías como el cultivo de tejidos *in vitro* y particularmente en cacao, utilizando la metodología de embriogénesis somática (López-Baéz, *et al*, 1996). Luego del primer reporte exitoso de producción de embriones somáticos de cacao con conversión a plántulas, a partir de tejido asexual (López-Baéz *et al* (1993); Sondhal *et al* (1993), varios centros de investigación de países productores y no productores han empeñado sus esfuerzos para adecuar los protocolos de multiplicación a las características genéticas y particularidades mediambientales de los genotipos de interés.

A la luz de los resultados señalados y debido al enorme interés que representa para el país la disponibilidad de una metodología de multiplicación clonal a gran escala, el INIAP en asocio con el CIRAD de Francia, a partir del año 2001, han conducido varios estudios orientados a la introducción, ajuste y validación de la tecnología de embriogénesis somática sobre clones de cacao tipo Nacional (comerciales y experimentales). Finalizada la primera fase de estudio consistente en la evaluación del potencial embriogénico de un grupo de genotipos comerciales y experimentales, los resultados evidenciaron que al menos el 70% de los clones evaluados presentaron altos potenciales embriogénicos y niveles considerables de conversión a plántulas (INIAP, 2003 y 2004). Por otra parte fue factible obtener un grupo de plantas de los genotipos con mayor potencial de multiplicación, las cuales fueron levadas al campo para medir y comparar el valor agronómico y productivo de las plantas y con ello aclarar las inquietudes existentes respecto al desempeño de éstas frente a plantas obtenidas por los sistemas de injertación, estacas y semillas.

El conocimiento que se pueda generar a nivel del país sobre los materiales de cacao de tipo Nacional, sumado a la información producida en otras latitudes sobre clones de diferente origen genético, permitirá decidir si la metodología para la producción *in vitro* de plantas vía embriogénesis somática, puede ser aplicada a escala comercial; ya sea para promover la formación de jardines clonales, desde donde será factible extraer material para la producción de plantas mediante las tecnologías tradicionales; o a su vez, iniciar proyectos de multiplicación masiva que incentiven a los productores y organismos respectivos a promover planes de renovación de las plantaciones improproductivas existentes en el país.

## MATERIALES Y METODOS

### Material vegetal

Los genotipos utilizados en el estudio fueron seleccionados de las colecciones de cacao Nacional mantenidas en la Estación Experimental Tropical Pichilingue (EETP) del INIAP (EET, CCAT, EB y SNA) considerando su valor fenotípico y características de calidad, producción y resistencia a las principales enfermedades. Luego de la evaluación preliminar de las características embriogénicas de los diferentes materiales siguiendo la metodología propuesta por Li *et al* (1998), se seleccionaron 10 genotipos con base al potencial de multiplicación *in vitro* vía embriogénesis somática y dos clones testigo (SCA-6 e IMC-67). Al mismo tiempo fueron multiplicados plantas mediante injertos sobre patrones de alto y bajo vigor, enraizamiento de estacas y semillas de libre polinización, de los mismos genotipos seleccionados, para con ellas implementar el ensayo e iniciar evaluaciones comparativas del comportamiento agronómico y productivo en condiciones de campo.

### Ensayo de campo

El ensayo fue iniciado en mayo del 2004 en la EET Pichilingue, INIAP en Quevedo, Ecuador. Se utilizó un Diseño de Parcelas Divididas con cinco repeticiones, asignándole al factor principal la forma de multiplicación (5 formas) y al factor secundario los genotipos (12 genotipos). La unidad experimental esta formada por cinco árboles por genotipo. El cultivo fue establecido con una densidad de 1111 plantas/ha bajo sombra de plátano (*Musa* AAB) establecida en la misma densidad, seis meses antes de implementar el ensayo. Durante el curso del experimento se vienen registrando una serie de variables a efecto de medir el comportamiento agronómico, morfológico, fisiológico y productivo de las plantas.

## RESULTADOS Y DISCUSION

### Desarrollo de plantas

Durante el primer año de establecimiento, se realizó el seguimiento de las plantas a fin de verificar el comportamiento agronómico de éstas en condiciones de campo. La comparación de los valores que describen el crecimiento como la altura y diámetro en el cuello del eje principal, muestran diferencias altamente significativas entre las vitroplantas y las demás formas de multiplicación y entre los genotipos estudiados; y una interacción significativa entre los genotipos y las formas de multiplicación (Cuadro 1).

Los valores de altura total de planta así como del diámetro del eje principal alcanzados por las vitroplantas, es más importante que las plantas provenientes de semilla, aunque sin mayores diferencias en sus valores; no así respecto a las plantas multiplicadas ya sea por injertos sobre patrones de alto y bajo vigor, como por las de estacas o ramillas.

Entre los genotipos estudiados se debe destacar el comportamiento observado en los materiales comerciales EET-48, EET-96 y EET-103, los cuales destacan por sus valores

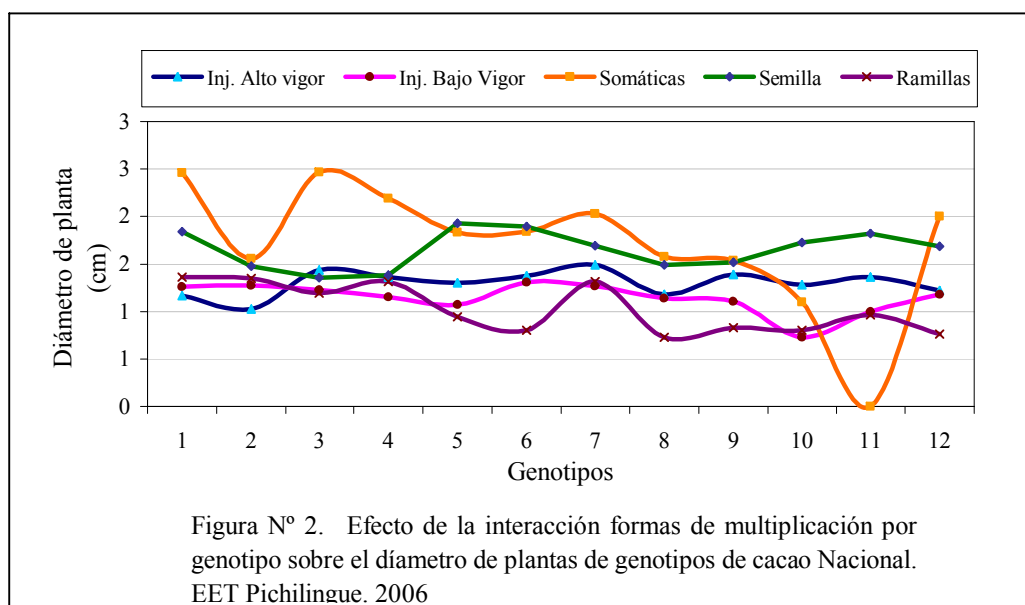
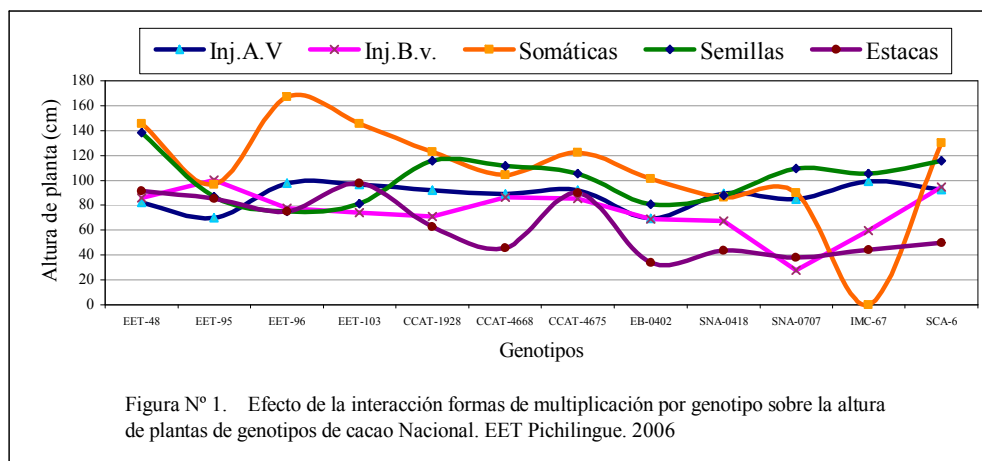
de altura y diámetro de tallo, manteniendo similares tendencias respecto a las formas de multiplicación.

Cuadro N° 1. Valores estadísticos para variables de crecimiento de estudio comparativo de formas de multiplicación de genotipos de cacao Nacional. EET Pichilingue. 2006

Fuentes de Variación	Variables de Crecimiento			
	Altura de planta (cm)		Diámetro de tallo (cm)	
	G. de L.	Cuadrados Medios	G. de L.	Cuadrados Medios
Formas de multiplicación	4	16732.083 **	4	4.5509 **
Error (a)	16	2054.95	16	0.2385
Genotipos	11	2948.53 **	11	0.37426 **
Formas x Genotipo	43	1452.21**	43	0.226 **
Error (b)	190	483.16	190	0.0648

\*\* Altamente significativo

A pesar de los resultados observados en los factores, se debe destacar el efecto de la interacción formas de multiplicación por genotipos, tanto a nivel de la altura de plantas (Fig. 1), como de diámetro del eje principal (Fig. 2), con una marcada superioridad de los genotipos EET's multiplicados por embriogénes somática y semillas.



El comportamiento observado en los parámetros de crecimiento durante el primer año de establecimiento de vitroplantas y plantas provenientes de semilla, se ven favorecidas en los dos casos por la presencia de un crecimiento dimórfico de sus plantas y un sistema radical pivotante, que les permite explorar capas inferiores de suelo con mayor facilidad en búsqueda de factores esenciales para su crecimiento, particularmente durante los períodos críticos (Traore *et al*, 2003, Guiltinan and Maximova, 2000).

### Arquitectura de vitroplantas y plantas de semilla

El estudio comparativo de la arquitectura de las vitroplantas y las plantas de semilla, mediante la medición de la altura de formación de horquetas y de la densidad de las cicatrices o inserciones foliares en el eje principal, presenta diferencias entre las dos formas de multiplicación, mientras que los genotipos estudiados y la interacción forma de multiplicación por genotipo, solo presentan diferencias en la primera variable (Cuadro 2).

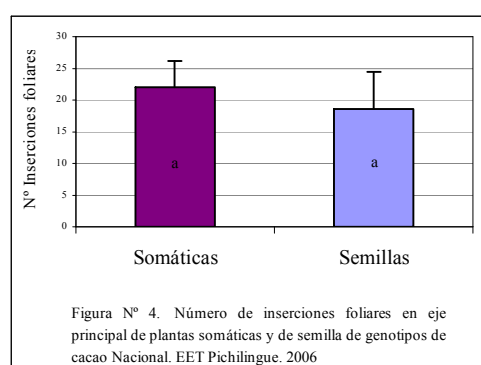
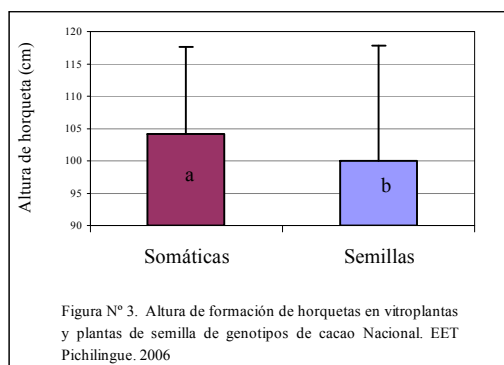
Cuadro N° 2. Valores estadísticos para variables que describen la arquitectura de plantas somáticas y de semilla de genotipos de cacao Nacional. EET Pichilingue. 2006

Fuentes de Variación	Variables de morfológicas			
	Altura Formac. Horqueta (cm)		Inserciones en Eje Ppal.	
	G. de L.	Cuadrados Medios	G. de L.	Cuadrados Medios
Formas de multiplicación	1	1023.73 *	1	139.095 *
Error (a)	4	448.24523	4	66.18
Genotipos	11	592.5877 *	11	52.910993 ns
Formas x Genotipo	11	969.80105 **	10	41.0993 ns
Error (b)	70	239.62678	70	32.73

ns = No significativo, \* = significativo al 5%, \*\* = Significativo al 1%

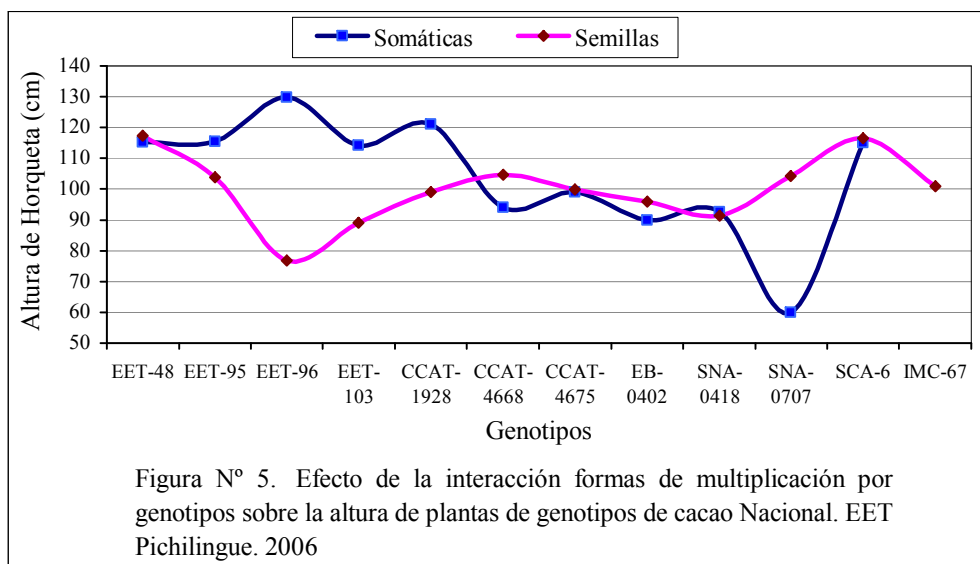
A pesar de las diferencias de tipo estadístico ( $\alpha \leq 0.05$ ), los valores observados no reflejan diferencias que pudieran hacer presumir cambios de tipo morfológico entre vitroplantas y plantas de semillas, lo cual es confirmado por la similitud de los valores en el número de cicatrices foliares, reflejando que la filotaxis de las plantas no es alterada.

Como se puede observar en las figuras N° 3 y 4, la altura promedio de formación de coronas, así como el número de inserciones foliares en vitroplantas y en plantas de provenientes de semillas presentan valores muy similares, lo cual permite aseverar



la no existencia de cambios en la arquitectura de las plantas.

El efecto de la interacción formas de multiplicación por genotipo sobre la altura de formación de la corona de las plantas (Fig. 5) y no sobre el número de cicatrices foliares, confirma que la arquitectura de las plantas es idéntica a la de las plantas de semilla, aunque con un desarrollo más rápido, lo cual les proporciona una mayor precocidad.



## CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos en el presente estudio, durante el primer año de desarrollo del cultivo se concluye que las vitroplantas presentan un crecimiento similar al de las plantas producidas por semillas, pero con marcadas diferencias sobre las plantas obtenidas mediante los sistemas de injetación o enraizamiento de estacas plagiotrópicas. Por otra parte, la ausencia de diferencias en el número de inserciones foliares entre vitroplantas y plantas de semilla confirma que la filotaxis y por tanto su arquitectura no son alteradas. Sin embargo, se debe señalar que la continuación de las observaciones que estudiarán la arquitectura de la corona, las zonas floríferas y los parámetros de producción, permitirán comparar las aptitudes agronómicas de las diferentes formas de multiplicación y evaluar así el valor agronómico y productivo de las vitroplantas.

## AGRADECIMIENTO

Los autores dejan constancia de su agradecimiento a la Dra. Laurence Alemanno y al personal científico del CIRAD, Francia que colaboró durante la Ejecución del Proyecto FIRCLONE, al igual que a los estudiantes que participaron en los diferentes estudios a través de los cuales fue posible iniciar los trabajos de multiplicación y ejecución del presente estudio en el país.

## BIBLIOGRAFÍA

- Guiltinan, M. and Maximova S. 2000. Recent advances in the tissue culture of cocoa from somatic embryos from somatic embryos to bent wood gardens. Proc. Int. Workshop on New Technology and Cocoa Breeding. Kota Kinabalu, 2000. 157–162.
- INIAP. 2003 y 2004. Informes técnicos Proyecto Firclone. Convenio INIAP-CIRAD, EET Pichilingue, Programa Cacao y café. Lab. Biotecnología. 25 p.
- Li, Z., Traore, A., Maximova, S. and Guiltinan, M.J. 1998. Somatic embryogenesis and plant regeneration from floral explant of cacao (*Theobroma cacao* L.) using thiadiazuron. In Vitro Cell Dev Biol. 34:293-299.
- López-Baéz, O., H. Bollon, A.B. Eskes and V. Petiard. 1993. Embryogenése somatique de cacaoyer *Theobroma cacao* L. a partir de pieces florales. Compte Rendus de L'Academia des Sciences París. Science de la vie. 316 :579-584.
- López-Baéz, O., H. Bollon, M. Alvarez y V. Petiard. 1996. Ex Vitro performance and nuclear ADN ploidy of cocoa plants regenerated by somatic embryogenesis. In Proceeding of the 12<sup>th</sup> International Cocoa Research Conference. Nov. 17 23. Salvador, Bahía, Brasil. Pp 589 – 594.
- Sondahl, M.R., Lui, C. Bellato and A. Bragin. 1993. Cocoa somatic embryogenesis. Acta Horticulturae. 336:245-248.
- Sica. 2004. Servicio de información agropecuario del Ministerio de Agricultura y Ganadería del Ecuador. Elaborado por el Dr. Jorge Soria Vasco. Breve historia del cultivo de cacao en el Ecuador. Disponible en [www.sica.gov.ec/cadenas/cacao/docs/historia\\_cacao.htm](http://www.sica.gov.ec/cadenas/cacao/docs/historia_cacao.htm)
- Traore, A., Maximova, S. and Guiltinan, M.J. 2003. A micropropagation system for cocoa (*Theobroma cacao* L.) using somatic embryo derived plantlets. In vitro Cell Dev. Biol. Plant 40:257-261.