



# FACTORES QUE CONTROLAN EL CONTENIDO DE FENOLES EN EL CULTIVO DE CALLOS DE *Theobroma cacao*

## Factors controlling phenol content on *Theobroma cacao* callus culture

Janet Quiñones-Galvez<sup>✉</sup>, Martha Hernández de la Torre, Yemeys Quirós Molina, Yanelis Capdesuñer Ruiz y Reinaldo Trujillo Sánchez

**ABSTRACT.** *Theobroma cacao* L. is known in folk medicine as an antiseptic, diuretic and antiparasitic. Foods derived from this plant are rich in natural products of high added value, including phenolic compounds. As *in vitro* cultivation handle is an alternative source for the production of these metabolites. The present study was conducted to obtain phenolic compounds from callus culture with embryogenic structures. Culture conditions (agitation, light and glucose) were established to increase the concentration of phenols in calluses and elicitors to achieve the increase in callus and excretion into the culture area. The accumulation of phenolic compounds was favored with the additional supplement of glucose, growth in agitation and darkness. The addition of random hydroxylated cyclodextrins allowed the increase in the specific yield of phenols and biomass.

**RESUMEN.** *Theobroma cacao* L. se conoce en la medicina popular como antiséptico, diurético y antiparasitario. Los alimentos derivados de esta planta son ricos en productos naturales de alto valor agregado, entre los que se destacan los compuestos fenólicos. Por lo que manejar su cultivo *in vitro* es una fuente alternativa para la producción de estos metabolitos. El presente estudio se realizó con el objetivo de obtener compuestos fenólicos a partir del cultivo de callos con estructuras embriogénicas. Se establecieron las condiciones de cultivo (agitación, luz y concentración de glucosa) para aumentar la concentración de fenoles en los callos y los elicitores para lograr su incremento en callos y excreción al medio de cultivo. La acumulación de compuestos fenólicos se favoreció con el suplemento adicional de glucosa, el crecimiento en agitación y a la oscuridad. La adición de ciclodextrinas hidroxipropiladas al azar permitió el incremento del rendimiento específico de fenoles y la biomasa.

**Key words:** cacao, *in vitro* culture, glucose

**Palabras clave:** cacao, cultivo *in vitro*, glucosa

## INTRODUCCIÓN

Las plantas constituyen una fuente importante para el aislamiento de productos naturales como drogas, tintes, saborizantes, alimentos, fragancias, y otros químicos que se usan en la industria (1). Varios de estos compuestos son producto del metabolismo secundario, que las plantas no necesitan para su crecimiento, pero sí para su interacción con el medio ambiente que las rodea. Los metabolitos secundarios se agrupan en cuatro clases principales: terpenos, glicósidos, alcaloides y compuestos fenólicos, dentro de los cuales los fenólicos tienen gran importancia en la interacción planta-medio ambiente (2).

Estos compuestos pueden ser de naturaleza compleja y se les asocia con importantes actividades, tales como antioxidante (3), antihipertensiva (4), antitumoral (5), insecticida (6), nematocida (7) y antimicrobiana (8). Los extractos de la planta de *Theobroma cacao* L. (*T. cacao*), ricos en compuestos fenólicos, se utilizan en medicina popular como antiséptico, diurético, antiparasitario (9) y en la última década han incrementado los estudios sobre estos compuestos en sus semillas y productos derivados. Sus funciones fisiológicas en la salud de humanos y animales se han correlacionado con actividades antimutagénica, antioxidante y antitumoral, entre otras (5, 10, 11).

En el caso de *T. cacao*, es importante buscar alternativas con vistas a la obtención de compuestos fenólicos, de manera tal que no se afecten las plantaciones que se utilizan para obtener los productos comerciales como el chocolate, la manteca y otros

Centro de Bioplantitas, Universidad de Ciego de Ávila. carretera a Morón, km 9, Ciego de Ávila. CP 69450. Cuba.

<sup>✉</sup> [jquinones@bioplantitas.cu](mailto:jquinones@bioplantitas.cu)

productos derivados. En este sentido, el cultivo de células y tejidos es una alternativa biotecnológica en estudio desde hace varios años para la obtención de productos naturales de plantas. Hasta la fecha, existen diferentes estrategias para su producción a partir del cultivo de células (callos y suspensiones celulares) (12).

La obtención de productos activos a partir del cultivo de células y tejidos tiene un potencial alto para la producción a gran escala y por largos períodos de tiempo bajo condiciones controladas (13). Sin embargo, en ocasiones se requiere de una gran cantidad de material vegetal para producirlos (14) y por ello se desarrollan alternativas para incrementar el rendimiento de los metabolitos en el cultivo *in vitro* de plantas, entre las que se encuentra: la optimización de condiciones de cultivo (15) y la elicitación (16, 17).

El cultivo de tejidos en *T. cacao* se estudia desde el siglo pasado, la embriogénesis es una de las alternativas más estudiadas y fue descrita inicialmente por Esan (18), posteriormente por Pence (19) y se trabaja hasta la actualidad para la propagación de plantas (20); no obstante, la diferenciación celular que se puede alcanzar con la formación de embriones podrían facilitar también la obtención de compuestos fenólicos. Actualmente existen resultados en el monitoreo de la acumulación de fenoles en semillas y suspensiones celulares de *T. cacao* (12), así como en callos embriogénicos y no embriogénicos (21). No obstante, hasta la fecha existe poca información sobre la manipulación de las condiciones de cultivo para la obtención de compuestos fenólicos en el mismo.

Basados en los planteamientos anteriores, teniendo en cuenta la importancia de los compuestos fenólicos presentes en *T. cacao* y las ventajas del uso de las técnicas del cultivo *in vitro* para estos propósitos, la investigación estuvo encaminada a evaluar el efecto de diferentes factores que controlan la síntesis y excreción de compuestos fenólicos en el cultivo de callos con estructuras embriogénicas de *T. cacao*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo experimental se realizó en los Laboratorios de Ingeniería Metabólica y Cultivo de Células y Tejidos del Centro de Bioplasmas, Ciego de Ávila, Cuba. El material vegetal para el cultivo *in vitro* se colectó en el banco de germoplasma de la Estación Experimental de Cacao de Baracoa, Instituto de Investigaciones Agro-Forestales, Baracoa, Cuba.

Para la formación de callos con estructuras embriogénicas, se siguió la combinación de las metodologías con modificaciones en la concentración de glucosa (166,52 mmol L<sup>-1</sup>) y 2,4-D (ácido 2,4-Diclorofenoxiacético, 18,096 μmol L<sup>-1</sup>) de acuerdo a los resultados de experimentos previos (resultados no mostrados) (22, 23). Los estaminoides del clon

UF677, previamente seleccionado por su contenido de compuestos fenólicos (resultados no mostrados), se desinfectaron con hipoclorito de sodio 1 % (v:v) por 20 min, posteriormente se enjuagaron con abundante agua destilada estéril. El material vegetal se colocó en frascos de cultivo que contenían 25 mL de medio semisólido (10 explantes por frasco).

Para la iniciación de los callos, los estaminoides se colocaron en medio de crecimiento de callos primarios (PCG) (22), constituido por sales del medio basal DKW (24), suplementadas con glucosa (166,52 mmol L<sup>-1</sup>), tiamina-HCl (2 mg L<sup>-1</sup>), ácido nicotínico (1 mg L<sup>-1</sup>), glicina (2 mg L<sup>-1</sup>), 2,4 D (18,096 μmol L<sup>-1</sup>), TDZ (N-phenyl-N'-1,2,3-thiadiazol 5-ylurea, 0,023 μmol L<sup>-1</sup>), L- glutamina (250 mg L<sup>-1</sup>), mioinositol (200 mg L<sup>-1</sup>) y gelrite (2,5 g L<sup>-1</sup>) (DUCHEFA) por 14 días. Posteriormente, para la proliferación de los callos, se subcultivaron en medio de crecimiento de callos secundarios (SCG) (22) modificado por Maximova (23), constituido por las sales del medio basal WPM (25), suplementadas con glucosa (166,52 mmol L<sup>-1</sup>), tiamina-HCl (10 mg L<sup>-1</sup>), ácido nicotínico (1 mg L<sup>-1</sup>), piridoxina (1 mg L<sup>-1</sup>), mioinositol (100 mg L<sup>-1</sup>), 2,4 D (18,096 μmol L<sup>-1</sup>), 6-BA (6-benciladenina; 0,222 μmol L<sup>-1</sup>) y gelrite (2,5 g L<sup>-1</sup>) (DUCHEFA) por 14 días.

Finalmente se colocaron en medio de desarrollo de embriones (ED) (22), constituido por sales del medio basal DKW, suplementadas con sacarosa (87,64 mmol L<sup>-1</sup>), glucosa (5,55 mmol L<sup>-1</sup>), tiamina-HCl (2 mg L<sup>-1</sup>), ácido nicotínico (1 mg L<sup>-1</sup>), glicina (2 mg L<sup>-1</sup>) y mioinositol (100 mg L<sup>-1</sup>), donde se subcultivaron cada 14 d hasta la formación de callos con estructuras embriogénicas. Los cultivos se mantuvieron a la oscuridad con una temperatura de 25 ± 2 °C. Los frascos de cultivo consistieron en pomos de vidrio de 250 mL de capacidad con tapas plásticas de cierre twig-soft para los experimentos relacionados con la formación de callos y erlenmeyers de 250 mL para los de producción de fenoles.

### Obtención de compuestos fenólicos mediante el manejo de condiciones de cultivo de callos con estructuras embriogénicas

Para incrementar el contenido de fenoles y la biomasa de los callos con estructuras embriogénicas se evaluó el efecto de tres factores (concentración de glucosa, luz y agitación) en medio líquido de desarrollo de embriones. Para determinar el efecto de la concentración de glucosa en la concentración de fenoles y el incremento de la biomasa, se probaron diferentes concentraciones de glucosa (277,54; 222,03; 166,52; 111,02; 55,08 y 0,00 mmol L<sup>-1</sup>). El experimento se realizó en condiciones de agitación, en zaranda orbital (RETOMED®) a 120 rpm, con una temperatura de 25 ± 2 °C y en condiciones de oscuridad, con erlenmeyers cubiertos de polietileno negro.

El efecto de la luz se determinó en dos condiciones de cultivo: oscuridad, con erlenmeyers cubiertos

de polietileno negro, y luz, con lámparas blancas fluorescentes (Sylvania, F40T12/D 40 W) que proporcionaron un flujo de fotones fotosintéticos de  $60 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , ambos a una temperatura de  $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ , en condiciones de agitación y con  $277,54 \text{ mmol L}^{-1}$  de glucosa.

Para evaluar el efecto de la agitación se evaluaron dos condiciones de cultivo: estático y agitación, en zaranda orbital (RETOMED®) a 120 rpm, con una temperatura de  $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ , en condiciones de oscuridad, con erlenmeyers cubiertos de polietileno negro y con  $277,54 \text{ mmol L}^{-1}$  de glucosa.

Para los tres experimentos se utilizó 1 g de callos para cada tratamiento y se evaluaron tres réplicas. A los 0, 14 y 28 d se determinó la concentración de fenoles solubles en los callos. Para cada tratamiento se calculó el incremento de la masa seca, restando la masa inicial (0 d) a la masa final (28 d). Se realizaron tres determinaciones por réplica.

### **Influencia de agentes elicitors sobre la producción de fenoles y la masa de callos con estructuras embriogénicas y su excreción al medio de cultivo**

Con el objetivo de estimular la síntesis de fenoles en callos con estructuras embriogénicas y su excreción al medio de cultivo, se utilizó la metodología descrita (15), con las modificaciones dadas por el uso de Biojas® (Biojas, ácido jasmónico,  $1 \text{ g L}^{-1}$  i.a.), producido por el Instituto Cubano de Investigaciones de Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA) en lugar de metil jasmonato. Se evaluó el efecto de tres elicitors: dos ciclodextrinas: ciclodextrinas hidroxipropiladas al azar (CDHA) y ciclodextrinas dimetiladas al azar (CDMA) y el Biojas.

Se transfirió a cada erlenmeyer, 1 g de callos con estructuras embriogénicas. Los tratamientos de elicitación fueron: control (sin elicitor); Biojas  $100 \mu\text{M}$ ; CDMA  $50 \text{ mM}$ ; CDHA  $50 \text{ mM}$ ; CDHA ( $50 \text{ mM}$ ) + Biojas ( $100 \mu\text{M}$ ) y CDMA ( $50 \text{ mM}$ ) + Biojas ( $100 \mu\text{M}$ ). Cada Erlenmeyer contenía 25 mL de medio ED líquido modificado según los resultados anteriores.

El medio de cultivo líquido con las ciclodextrinas se esterilizó en autoclave a  $120 \text{ }^\circ\text{C}$  durante 20 min. El Biojas se adicionó en el momento de montaje del experimento, esterilizándolo mediante filtración, con filtro de  $0,45 \mu\text{m}$ . A los siete días de la aplicación de los elicitors se determinó el incremento en la masa seca (MS) y la concentración de fenoles en los callos con estructuras embriogénicas y en el medio de cultivo ( $\text{mg g}^{-1}$  MS). Se procesaron tres erlenmeyers en cada tratamiento, considerado cada uno como una réplica. Se realizaron tres determinaciones por réplica.

### **Determinación de compuestos fenólicos**

Para la extracción de compuestos fenólicos, los callos se liofilizaron y maceraron hasta obtener polvo fino. Las muestras se extrajeron en Soxhlet Büchi, de acuerdo al procedimiento descrito (26). Para ello se desengrasaron previamente con hexano (Merk) a  $70 \text{ }^\circ\text{C}$

por 3 h (3 g en 30 mL), se secaron para eliminar los restos de hexano y se extrajeron con igual tiempo, temperatura y proporción de metanol (Merk). El procedimiento se repitió tres veces.

La extracción de los compuestos fenólicos excretados al medio de cultivo se realizó con la adición de igual volumen de acetato de etilo frío que de medio de cultivo y se dejó en agitación en la oscuridad toda la noche. La fase orgánica se concentró hasta sequedad  $60 \text{ }^\circ\text{C}$  en un rotoevaporador (Rotadex, Heidolph 94200) y finalmente se resuspendió en 1 mL de metanol.

La cuantificación de fenoles se realizó en espectrofotómetro (T70, UV/VIS spectrometer, PG Instruments Ltd., China) según procedimiento (27). A  $100 \mu\text{L}$  del extracto vegetal, se le adicionaron  $900 \mu\text{L}$  de agua destilada y  $100 \mu\text{L}$  del reactivo de Folin-Ciocalteu. La mezcla se dejó reposar durante cinco minutos, luego se agregaron  $600 \mu\text{L}$  de una solución de  $1 \text{ mol L}^{-1}$  NaOH saturada con  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  y se incubó por 1 h a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  para permitir el desarrollo del color. Se midieron las absorbancias en espectrofotómetro a 725 nm. El contenido de compuestos fenólicos se expresó en mg de fenoles por g de masa seca ( $\text{mg g}^{-1}\text{MS}$ ), referidos a una curva patrón de ácido clorogénico.

### **Análisis estadístico**

El procesamiento estadístico de los resultados se realizó con el utilitario Statistical Package for Social Sciences (SPSS) versión 20 para Windows (28). Se realizaron pruebas paramétricas (T-test, ANOVA de un factor y bifactorial). Se aplicaron pruebas de Tukey HSD en los casos en los cuales los ANOVA presentaron diferencias significativas. Previamente se demostró que los datos de cada tratamiento cumplían los supuestos de distribución normal y homogeneidad de varianzas, según las pruebas Kolmogorov-Smirnov y Levene respectivamente para  $p \leq 0,05$ . Los detalles del tratamiento estadístico aparecen en cada figura o tabla en el acápite resultados y discusión.

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

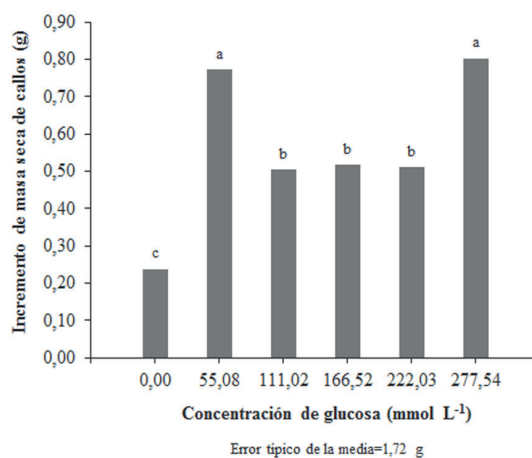
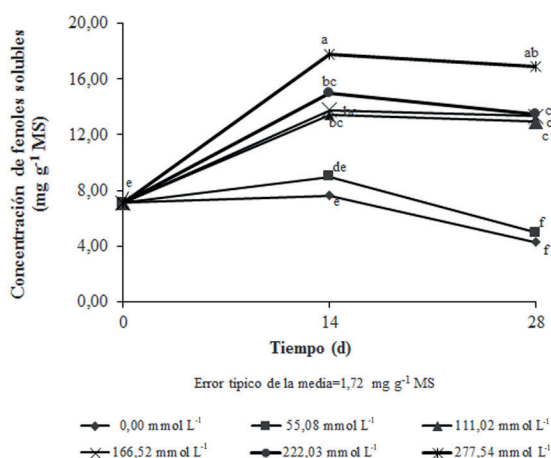
En las Figuras 1, 2 y 3 se muestran los resultados relacionados con el efecto de la concentración de glucosa (Figura 1), la luz (Figura 2) y la agitación (Figura 3) en la concentración de fenoles solubles (A) y en el incremento de la masa seca de los callos con estructuras embriogénicas (B).

La concentración de fenoles solubles (Figura 1 A) tuvo un máximo ( $17,79$  y  $16,87 \text{ mg g}^{-1}\text{MS}$ ) a los 14 y 28 días, para el tratamiento de mayor concentración de glucosa ( $277,54 \text{ mmol L}^{-1}$ ), sin diferencias significativas a iguales tiempos con  $222,03 \text{ mmol L}^{-1}$  del azúcar. En tanto que a  $55,08 \text{ mmol L}^{-1}$  la concentración de fenoles fue baja, sin diferencias con el control. Mientras que, el incremento de masa se favoreció con la mayor concentración de glucosa ( $277,54 \text{ mmol L}^{-1}$ ), sin diferencia con la menor ( $55,08 \text{ mmol L}^{-1}$ ), con

0,3 g por encima del resto de los tratamientos y 0,56 g superior al control. Estos resultados pueden estar relacionados con el estrés osmótico provocado por altas concentraciones de azúcares, que pudieron favorecer la síntesis y acumulación de los compuestos fenólicos. Sin embargo, el incremento de la masa se puede asociar tanto con el aumento de la síntesis de fenoles como con la diferenciación de los embriones para el tratamiento con más glucosa. Este comportamiento no fue igual con la menor concentración, donde el incremento de masa no se correspondió con un aumento en la diferenciación de los embriones.

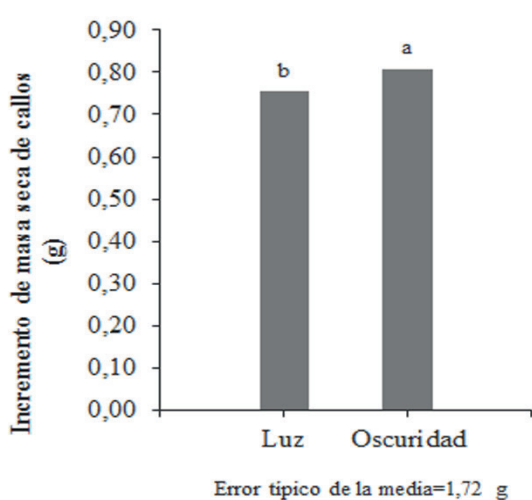
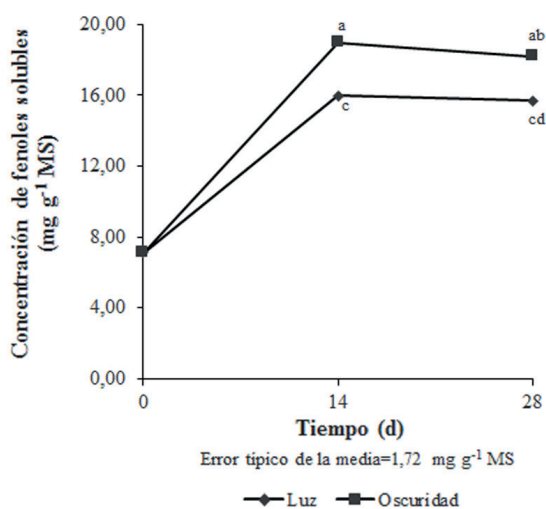
La producción de algunos fenoles está estrechamente relacionada con los azúcares (29). Su síntesis incrementa con el uso de glucosa durante el

cultivo *in vitro* de *Vitis vinifera* L., en concentraciones de 58,00; 234,00 y 468,00 mmol L<sup>-1</sup> (30). Lo que se asoció con que estos azúcares alteran la expresión de genes estructurales y regulatorios, especialmente UDP-glucosa:antocianidin 3-O-glucosiltransferasa, junto a una reprogramación masiva en rutas de señales de transducción. Este gen se correlacionó con el contenido de antocianinas en frutos de *Vitis vinifera* L. (31). Se comprobó que la síntesis de antocianinas y de algunos flavonoides se favorece con el incremento de glucosa (30). Por lo que el incremento de compuestos fenólicos que se obtuvo en el presente experimento (Figura 1A) podría estar relacionado con la síntesis de diferentes fenoles, entre los que deben encontrarse antocianinas y flavonoides.



A: ANOVA bifactorial B: ANOVA simple Tukey, p<0,05, n=9 Medias con letras distintas difieren significativamente

**Figura 1. Efecto de la concentración de glucosa (277,54; 222,03; 166,52; 111,02; 55,08 y 0,00 mmol L<sup>-1</sup>) en la concentración de fenoles solubles (mg g<sup>-1</sup> MS) (A) y el incremento de la masa seca de los callos con estructuras embriogénicas (g) (B)**



A: ANOVA bifactorial B: T-test Tukey, p<0,05, n=9 Medias con letras distintas difieren significativamente

**Figura 2. Efecto de la luz (277,54; 222,03; 166,52; 111,02; 55,08 y 0,00 mmol L<sup>-1</sup>) en la concentración de fenoles solubles (mg g<sup>-1</sup> MS) (A) y el incremento de la masa seca de los callos con estructuras embriogénicas (g) (B)**

La concentración de fenoles solubles (Figura 2A) y el incremento de la masa seca de los callos (Figura 2B) fueron mayores en condiciones de oscuridad que a la luz. La concentración de fenoles tuvo un máximo (18,97 mg g<sup>-1</sup> MS) a los 14 d que se mantuvo, sin diferencias significativas, a los 28 d (18,21 mg g<sup>-1</sup> MS). El incremento de masa seca en los callos cultivados a la oscuridad fue ligeramente superior (0,05 g) a los que se encontraban a la luz, no obstante esta diferencia de masa aportó a la diferencia encontrada en la concentración de fenoles.

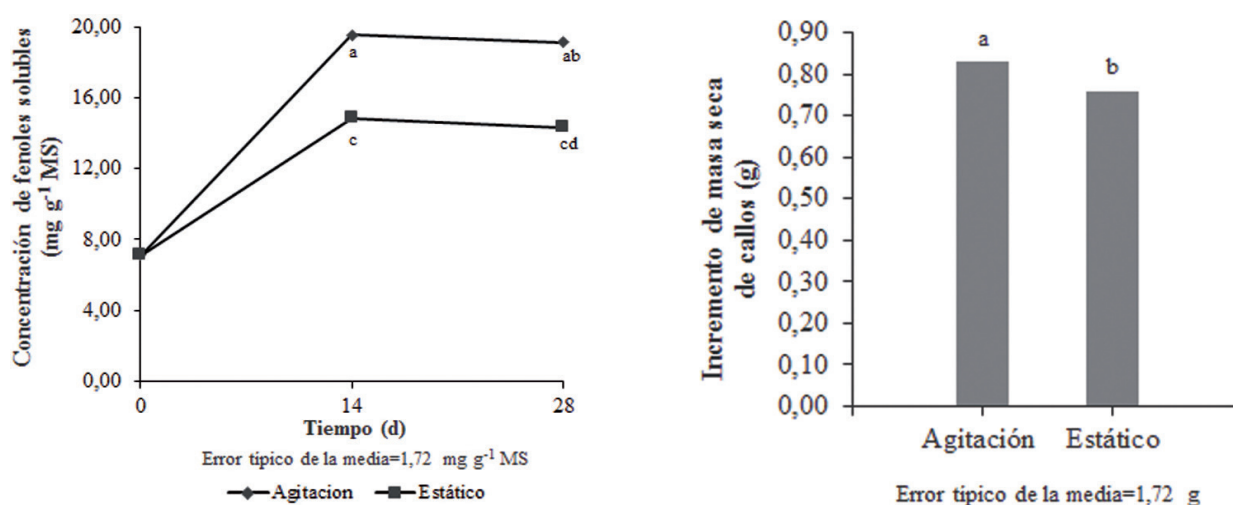
El efecto de la luz en el desarrollo de estructuras embriogénicas y tejidos se ha estudiado a profundidad en los últimos años, como es el caso de la influencia de la luz en la embriogénesis de cultivos como *Campanula punctata* var. *rubriflora* (32) y *Agave tequilana* var. *Azul* (33). Sin embargo, son menores los estudios realizados sobre la influencia de la luz en la síntesis de metabolitos secundarios. En este sentido, se conoce que la ausencia de luz puede hacer que los cultivos se estresen, y por consiguiente se active la síntesis de algunos metabolitos secundarios. Por ejemplo, la producción furanocumarinas se estimula a la oscuridad durante el cultivo *in vitro* de brotes de *Ruta graveolens* ssp. *divaricata* (34); sin embargo, la síntesis de ácidos fenólicos se estimuló en presencia de las luces blanca y azul. Para el caso de la concentración de fenoles solubles en callos de *T. cacao*, los mejores resultados fueron en condiciones de oscuridad; no obstante, en condiciones de luz también se obtuvieron compuestos fenólicos, lo que indica que en cada condición podrían estar acumulándose diferentes grupos de compuestos fenólicos, lo que habría que comprobar en futuras investigaciones.

Al analizar el efecto de la agitación en la concentración de fenoles solubles (Figura 3A) y el incremento de la masa seca de los callos (Figura 3B), se encontró que la agitación influyó de manera positiva en ambos parámetros. La concentración de fenoles fue mayor en agitación a partir de los 14 d (19,57 mg g<sup>-1</sup> MS), sin diferencias significativas con los 28 d (19,13 mg g<sup>-1</sup> MS), con un incremento además, de la masa seca a los 28 d, que supera al cultivo estático en 0,1 g. La agitación es un factor que puede influir también en la obtención de fenoles.

En el cultivo *in vitro* de embriones de *Manguifera indica* L. se encontró presencia de fenoles tanto en condiciones de cultivo estática como con agitación (35) y esta última favoreció el crecimiento de los embriones somáticos, sin que estos se afectaran por la presencia de compuestos tóxicos, como es el caso de algunos fenoles.

En la Figura 3 se puede observar también que el aumento en la concentración de fenoles no afectó el incremento de masa en el tratamiento de agitación. Esto se ve reflejado también en la Figura 4, donde se pueden observar los callos con estructuras embriogénicas (fundamentalmente embriones globulares) (A, B y C) y diferentes estados en la formación de los embriones (embrión acorazonado (D), torpedo (E) y cotiledonar (F)), a los 28 d de estar en agitación, oscuridad y con glucosa a 50 g L<sup>-1</sup>.

En resumen, las condiciones de cultivo juegan un papel fundamental, no solo en el establecimiento del cultivo *in vitro*, sino también en la producción de metabolitos en cultivos ya establecidos. La fuente de carbono, la luz y la agitación son los factores que se evaluaron en el presente trabajo.



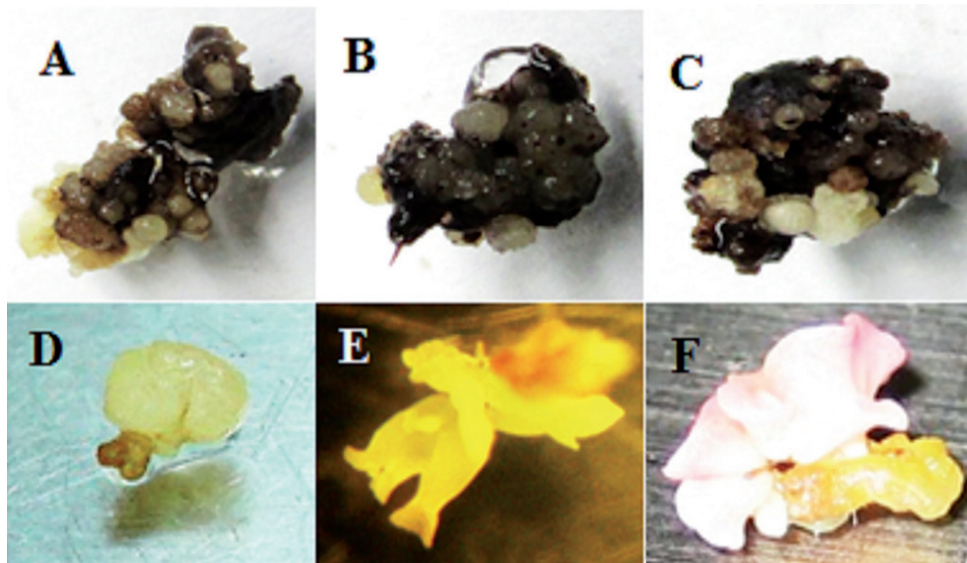
A: ANOVA bifactorial

B: T-test

Tukey,  $p \leq 0,05$ ,  $n=9$ 

Medias con letras distintas difieren significativamente

**Figura 3. Efecto de la agitación (277,54; 222,03; 166,52; 111,02; 55,08 y 0,00 mmol L<sup>-1</sup>) en la concentración de fenoles solubles (mg g<sup>-1</sup>MS) (A) y el incremento de la masa de los callos con estructuras embriogénicas (g) (B)**



**Figura 4. Callos con estructuras embriogénicas (fundamentalmente embriones globulares) (A, B y C) y diferentes estadios en la formación de los embriones: embrión acorazonado (D), torpedo (E) y cotiledonar (F), a los 28 d de estar en agitación, oscuridad y con glucosa a 50 g L<sup>-1</sup>**

Los mejores resultados se obtuvieron para 50 g L<sup>-1</sup> de glucosa, en la oscuridad y con agitación. Estos tratamientos incrementaron tanto la masa seca como el contenido de fenoles. No obstante, hasta este momento solo se obtuvo aumento en el contenido de fenoles en los callos, por lo que se ensayaron diferentes elicitores para estimular su excreción al medio de cultivo.

Los resultados del efecto de los tratamientos de elicitación probados, el incremento de la masa seca y la concentración de fenoles solubles en los callos con estructuras embriogénicas de *T. cacao* L. se muestran en las Figuras 5 y 6, respectivamente. Todos los elicitores estimularon el incremento de masa seca de callos (Figura 5) en comparación con el control. La combinación CDMA+Biojas fue la que estimuló en mayor medida el incremento de masa de callos con estructuras embriogénicas con 1,83 veces el incremento del control. El elicitor que estimuló menor incremento de masa fue CDHA, con solo 1,22 veces el valor del control.

El efecto de los elicitores en la producción de fenoles durante el cultivo de callos con estructuras embriogénicas de *T. cacao* fue positivo (Figura 6). La concentración de fenoles en los callos con estructuras embriogénicas incrementó en todos los casos, excepto para el tratamiento con Biojas, que mantuvo la concentración de fenoles por debajo del control.

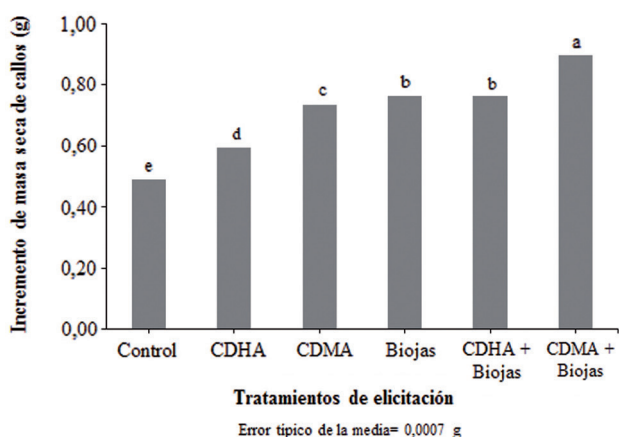
La mayor concentración de fenoles en callos y medio de cultivo se obtuvo con el tratamiento CDHA (18,50 y 4,82 mg g<sup>-1</sup> MS respectivamente).

Sin embargo, la excreción de fenoles al medio de cultivo, no mostró diferencias significativas con CDHA+Biojas (4,05 mg g<sup>-1</sup> MS). Los menores valores se encontraron en el control y Biojas. Por lo que en las condiciones de elicitación probadas el tratamiento de CDHA mostró el mejor resultado, solo y combinado con Biojas.

La adición de elicitores es una práctica común para incrementar el contenido de metabolitos secundarios que tienen baja o nula concentración en el cultivo *in vitro* comparado con plantas intactas (14). Se ha comprobado que las ciclodextrinas tienen una fuerte actividad elicitando cultivos celulares de *V. vinifera* para la producción de resveratrol y esta actividad se logra solo con ciclodextrinas y con la combinación de éstas con metiljasmonato (36, 37).

En suspensiones celulares *Silybum marianum* L., el metil jasmonato y las ciclodextrinas CDHA y CDMA estimularon la síntesis y excreción al medio de cultivo de flavolignan y alcohol coniferílico (15), los mejores resultados se obtuvieron con la combinación de CDMA a 50 mmol L<sup>-1</sup> + metiljasmonato 100 µmol L<sup>-1</sup>. Sin embargo, en el cultivo de callos con estructuras embriogénicas de *T. cacao* (Figura 6) se obtuvo mayor excreción de compuestos fenólicos al medio de cultivo con el tratamiento de CDHA 50 mmol L<sup>-1</sup> sin diferencias con el de CDHA a 50 mmol L<sup>-1</sup> + Biojas 100 µmol L<sup>-1</sup>.

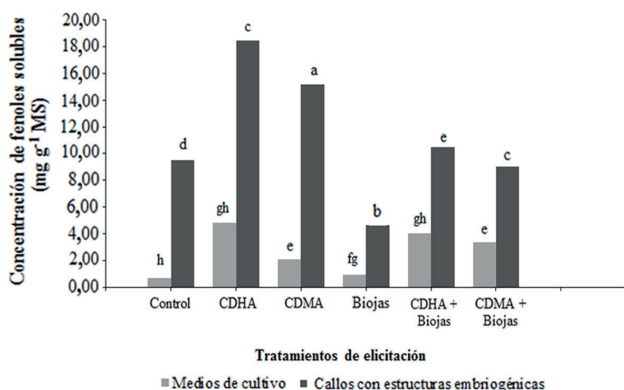
En el presente trabajo, la acumulación de compuestos fenólicos en callos se favoreció con el suplemento adicional de glucosa, el crecimiento en agitación y a la oscuridad.



Medias con letras distintas difieren significativamente (ANOVA simple, Tukey,  $p \leq 0,05$ ,  $n=9$ )

Control (sin elicitor); Biojas  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ ; CDHA  $50 \text{mmol L}^{-1}$ ; CDMA  $50 \text{mmol L}^{-1}$ ; CDHA ( $50 \text{mmol L}^{-1}$ )+Biojas ( $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ )  
CDMA ( $50 \text{mmol L}^{-1}$ )+Biojass ( $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ )

**Figura 5. Efecto de los elicitores en el incremento de la masa seca (g) de callos con estructuras embriogénicas de *T. cacao* L.**



Medias con letras distintas difieren significativamente (ANOVA bifactorial, Tukey,  $p \leq 0,05$ ,  $n=9$ )

Control (sin elicitor); Biojas  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ ; CDHA  $50 \text{mmol L}^{-1}$ ; CDMA  $50 \text{mmol L}^{-1}$ ; CDHA ( $50 \text{mmol L}^{-1}$ ) + Biojas ( $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ )  
CDMA ( $50 \text{mmol L}^{-1}$ ) + Biojass ( $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ )

**Figura 6. Efecto de los elicitores en la concentración de fenoles solubles ( $\text{mg g}^{-1}$  MS) en callos con estructuras embriogénicas de *T. cacao* L. y excretados al medio de cultivo**

## CONCLUSIONES

- El uso de elicitores provocó un incremento significativo de compuestos fenólicos y los valores que se obtuvieron en callos ( $9,02$ - $18,50 \text{mg g}^{-1}$  MS) con todos los tratamientos, excepto Biojas, están por encima de los que se obtuvieron en estudios anteriores (datos no mostrados) para las flores de plantas en ambiente natural ( $7,44 \text{mg g}^{-1}$  MS) y cercanos a los de hojas ( $19,98 \text{mg g}^{-1}$  MS).

- La excreción al medio de cultivo se mantuvo por debajo de lo encontrado en los extractos de órganos de plantas en ambiente natural y se desconoce cuáles son los compuestos fenólicos presentes en cada caso.
- Para futuras investigaciones, se hace necesario incrementar los niveles de excreción de los fenoles al medio de cultivo así como identificar su composición química.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecemos al banco de germoplasma de la Estación Experimental de Cacao de Baracoa, Instituto de Investigaciones Agro-Forestales, Baracoa, Cuba, por donar el material vegetal para el establecimiento del cultivo *in vitro*, y a los proyectos nacionales "Obtención e identificación de compuestos fenólicos a través de la aplicación de las técnicas de cultivo de células y tejidos en *Theobroma cacao* L." y "Obtención de extractos vegetales bioactivos, ricos en metabolitos secundarios para el control de plagas y enfermedades de cultivos de importancia agrícola", que permitieron realizar esta investigación.

## BIBLIOGRAFÍA

- Vanisree, M.; Lee, C.-Y.; Lo, S.-F.; Nalawade, S. M.; Lin, C. Y. y Tsay, H.-S. "Studies on the production of some important secondary metabolites from medicinal plants by plant tissue cultures". *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, vol. 45, no. 1, 2004, pp. 1–22, ISSN 0006-8063.
- Ávalos, G. A. y Pérez-Urria, C. E. "Metabolismo secundario de plantas". *REDUCA (Biología)*, vol. 2, no. 3, 5 de octubre de 2011, pp. 119-145, ISSN 1989-3620.
- Kelebek, H. y Selli, S. "Identification of phenolic compositions and the antioxidant capacity of mandarin juices and wines". *Journal of Food Science and Technology*, vol. 51, no. 6, 15 de diciembre de 2011, pp. 1094-1101, ISSN 0022-1155, 0975-8402, DOI 10.1007/s13197-011-0606-7.
- Esquivel, G. E.; Noriega, C. R.; Bello, G. M.; Saavedra, M. A. y Salgado, G. R. "Plantas utilizadas en la medicina tradicional mexicana con propiedades antidiabéticas y antihipertensivas". *Biológicas*, vol. 14, no. 1, 2012, pp. 45–52, ISSN 2007-705X, 2007-8145.
- Li, Y.; Feng, Y.; Zhu, S.; Luo, C.; Ma, J. y Zhong, F. "The effect of alkalization on the bioactive and flavor related components in commercial cocoa powder". *Journal of Food Composition and Analysis*, vol. 25, no. 1, febrero de 2012, pp. 17-23, ISSN 0889-1575, DOI 10.1016/j.jfca.2011.04.010.

6. Céspedes, C. L.; Muñoz, E.; Lamilla, L.; Molina, S. F. y Alarcon, J. "Insect growth regulatory, molting disruption and insecticidal activity of *Calceolaria talcana* (Calceolariaceae: Scrophulariaceae) and *Condalia microphylla* Cav. (Rhamnaceae)". En: Céspedes C. L., Sampietro D. A., Seigler D. S., y Rai M., *Natural Antioxidants and Biocides from Wild Medicinal Plants*, edit. CABI, Wallingford, UK, 2013, pp. 214-238, ISBN 978-1-78064-233-8.
7. Abdelnabby, H. M. y Abdelrahman, S. M. "Nematicidal activity of selected flora of Egypt". *Egyptian Journal of Agronomy*, vol. 11, no. 1, 2012, pp. 106-124, ISSN 1110-6158.
8. Céspedes, C. L.; Salazar, J. R.; Ariza-Castolo, A.; Yamaguchi, L.; Ávila, J. G.; Aqueveque, P.; Kubo, I. y Alarcón, J. "Biopesticides from plants: *Calceolaria integrifolia* s.l.". *Environmental Research*, vol. 132, julio de 2014, pp. 391-406, ISSN 0013-9351, DOI 10.1016/j.envres.2014.04.003.
9. dwards, H. G.; Villar, S. E. J.; de Oliveira, L. F. C. y Hyaric, M. L. "Analytical Raman spectroscopic study of cacao seeds and their chemical extracts". *Analytica Chimica Acta*, vol. 538, no. 1-2, 4 de mayo de 2005, pp. 175-180, ISSN 0003-2670, DOI 10.1016/j.aca.2005.02.039.
10. Quiñones, G. J.; Trujillo, S. R.; Capdesuñer, R. Y.; Quirós, M. Y. y Hernández, T. M. "Potencial de actividad antioxidante de extractos fenólicos de *Theobroma cacao* L. (cacao)". *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, vol. 18, no. 2, junio de 2013, pp. 201-215, ISSN 1028-4796.
11. Onomo, P. E.; Niemenak, N.; Djocgoue, P. F.; Ondobo, M. L. y Ndoumou, D. O. "Heritability of polyphenols, anthocyanins and antioxidant capacity of Cameroonian cocoa (*Theobroma cacao* L.) beans". *African Journal of Biotechnology*, vol. 14, no. 36, 2015, pp. 2672-2682, ISSN 1684-5315, DOI 10.4314/ajb.v14i36.
12. Rojas, L. F.; Gallego, A.; Gil, A.; Londoño, J. y Atehortúa, L. "Monitoring accumulation of bioactive compounds in seeds and cell culture of *Theobroma cacao* at different stages of development". *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, vol. 51, no. 2, 3 de abril de 2015, pp. 174-184, ISSN 1054-5476, 1475-2689, DOI 10.1007/s11627-015-9684-y.
13. Bourgaud, F.; Gravot, A.; Milesi, S. y Gontier, E. "Production of plant secondary metabolites: a historical perspective". *Plant Science*, vol. 161, no. 5, octubre de 2001, pp. 839-851, ISSN 0168-9452, DOI 10.1016/S0168-9452(01)00490-3.
14. Ramachandra, R. S. y Ravishankar, G. A. "Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites". *Biotechnology Advances*, vol. 20, no. 2, mayo de 2002, pp. 101-153, ISSN 0734-9750, DOI 10.1016/S0734-9750(02)00007-1.
15. Belchi, N. S.; Pedreño, M. A. y Corchete, P. "Methyl jasmonate increases silymarin production in *Silybum marianum* (L.) Gaernt cell cultures treated with  $\beta$ -cyclodextrins". *Biotechnology Letters*, vol. 33, no. 1, 25 de septiembre de 2010, pp. 179-184, ISSN 0141-5492, 1573-6776, DOI 10.1007/s10529-010-0406-6.
16. Pérez, A. N. L.; Labrada, F. A.; Pérez, A. C. y Pérez, A. "Estimulación de cardenólidos en brotes de *Digitalis purpurea* L. cultivados *in vitro* mediante elicitores". *Revista Colombiana de Biotecnología*, vol. 16, no. 1, 2014, pp. 51-61, ISSN 0123-3475.
17. Riedel, H.; Akumo, D. N.; Saw, N.; Kütük, O.; Neubauer, P. y Smetanska, I. "Elicitation and precursor feeding influence phenolic acids composition in *Vitis vinifera* suspension culture". *African Journal of Biotechnology*, vol. 11, no. 12, 2014, pp. 3000-3008, ISSN 1684-5315, DOI 10.4314/ajb.v11i12.
18. Esan, E. B. "Tissue culture studies on cacao (*Theobroma cacao* L.). A supplementation of current research" [en línea]. En: *5th International Cocoa Research Conference*, edit. Ibadan, Nigeria, 1975, pp. 116-125, [Consultado: 11 de enero de 2016], Disponible en: <<http://www.sidalc.net/cgi-bin/wxis.exe/?IsisScript=ARTIC.xis&method=post&formato=2&cantidad=1&expresion=mfn=001018>>.
19. Pence, V. C.; Hasegawa, P. M. y Janick, J. "Asexual embryogenesis in *Theobroma cacao* L". *Journal American Society for Horticultural Science*, vol. 104, 1979, pp. 145-148, ISSN 0003-1062.
20. Pancaningtyas, S. "Study on the presence and influence of phenolic compounds in callogenesis and somatic embryo development of cocoa (*Theobroma cacao* L.)". *Pelita Perkebunan (Coffee and Cocoa Research Journal)*, vol. 31, no. 1, 2015, pp. 14-20, ISSN 0215-0212.
21. Alemanno, L.; Ramos, T.; Gargadene, A.; Andary, C. y Ferriere, N. "Localization and Identification of Phenolic Compounds in *Theobroma cacao* L. Somatic Embryogenesis". *Annals of Botany*, vol. 92, no. 4, 10 de enero de 2003, pp. 613-623, ISSN 0305-7364, 1095-8290, DOI 10.1093/aob/mcg177, PMID: 12933367.
22. Li, Z.; Traore, A.; Maximova, S. y Guiltinan, M. J. "Somatic embryogenesis and plant regeneration from floral explants of cacao (*Theobroma cacao* L.) using thiazuron". *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, vol. 34, no. 4, octubre de 1998, pp. 293-299, ISSN 1054-5476, 1475-2689, DOI 10.1007/BF02822737.
23. Maximova, S. N.; Alemanno, L.; Young, A.; Ferriere, N.; Traore, A. y Guiltinan, M. J. "Efficiency, genotypic variability, and cellular origin of primary and secondary somatic embryogenesis of *Theobroma cacao* L.". *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, vol. 38, no. 3, mayo de 2002, pp. 252-259, ISSN 1054-5476, 1475-2689, DOI 10.1079/IVP2001257.
24. Driver, J. A. y Kuniyuki, A. H. "In vitro propagation of Paradox walnut rootstock (*Juglans hindsii* x *Juglans regia*, tissue culture)". *Hortscience*, vol. 19, 1984, pp. 507-509, ISSN 0018-5345.
25. Lloyd, G. y McCown, B. "Commercially-feasible micropropagation of *Mountain laurel*, *Kalmia latifolia* by use of shoot-tip culture". *Acta Horticulturae*, vol. 30, 1981, pp. 421-427, ISSN 0567-757.
26. Ahmad, A.; Alkarkhi, A. F.; Hena, S.; Siddique, B. M. y Dur, K. W. "Optimization of Soxhlet extraction of *Herba Leonuri* using factorial design of experiment". *International Journal of Chemistry*, vol. 2, no. 1, 2010, pp. 198-205, ISSN 1916-9698.



27. Friend, J. "Lignin and associated phenolic acids in cell walls". En: Gurr S. J., McPherson M. J., y Bowles D. J., *Molecular plant pathology: a practical approach*, edit. IRC Press at Oxford University Press, 1992, pp. 51- 59, ISBN 978-0-19-963351-7.
28. IBM SPSS Statistics [en línea]. versión 20, [Windows], edit. IBM Corporation, U.S, 2011, Disponible en: <http://www.ibm.com>.
29. Castellarin, S. D.; Gambetta, G. A.; Wada, H.; Shackel, K. A. y Matthews, M. A. "Fruit ripening in *Vitis vinifera*: spatiotemporal relationships among turgor, sugar accumulation, and anthocyanin biosynthesis". *Journal of Experimental Botany*, 16 de mayo de 2011, p. err150, ISSN 0022-0957, 1460-2431, DOI 10.1093/jxb/err150, PMID: 21586429.
30. Dai, Z. W.; Meddar, M.; Renaud, C.; Merlin, I.; Hilbert, G.; Delrot, S. y Gomès, E. "Long-term *in vitro* culture of grape berries and its application to assess the effects of sugar supply on anthocyanin accumulation". *Journal of Experimental Botany*, vol. 65, no. 16, 8 de enero de 2014, pp. 4665-4677, ISSN 0022-0957, 1460-2431, DOI 10.1093/jxb/ert489, PMID: 24477640.
31. Zheng, Y.; Li, J. h.; Xin, H. p.; Wang, N.; Guan, L.; Wu, B. h. y Li, S. h. "Anthocyanin profile and gene expression in berry skin of two red *Vitis vinifera* grape cultivars that are sunlight dependent versus sunlight independent". *Australian Journal of Grape and Wine Research*, vol. 19, no. 2, 1 de junio de 2013, pp. 238-248, ISSN 1755-0238, DOI 10.1111/ajgw.12023.
32. Sivanesan, I.; Lim, M. Y. y Jeong, B. R. "Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf and petiole explants of *Campanula punctata* Lam. var. *rubriflora* Makino". *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, vol. 107, no. 2, 3 de junio de 2011, pp. 365-369, ISSN 0167-6857, 1573-5044, DOI 10.1007/s11240-011-9983-x.
33. Rodríguez, S. A.; Acevedo, H. G.; Rodríguez, D. J. M.; Rodríguez, G. B.; Cervantes, M. J. y Castellanos, H. O. A. "Effect of light quality and culture medium on somatic embryogenesis of *Agave tequilana* Weber var. Azul". *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, vol. 104, no. 2, 25 de agosto de 2010, pp. 271-275, ISSN 0167-6857, 1573-5044, DOI 10.1007/s11240-010-9815-4.
34. Szopa, A.; Ekiert, H.; Szewczyk, A. y Fugas, E. "Production of bioactive phenolic acids and furanocoumarins in *in vitro* cultures of *Ruta graveolens* L. and *Ruta graveolens* ssp. *divaricata* (Tenore) Gams. under different light conditions". *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, vol. 110, no. 3, 7 de abril de 2012, pp. 329-336, ISSN 0167-6857, 1573-5044, DOI 10.1007/s11240-012-0154-5.
35. Pérez, H. J. B. y Grajal, M. M. J. "In Vitro Culture of Immature Zygotic Mango Embryos and Plantlet Development". *HortScience*, vol. 46, no. 11, 11 de enero de 2011, pp. 1528-1532, ISSN 0018-5345, 2327-9834.
36. Belchí, N. S.; Almagro, L.; Lijavetzky, D.; Bru, R. y Pedreño, M. A. "Enhanced extracellular production of *trans-resveratrol* in *Vitis vinifera* suspension cultured cells by using cyclodextrins and methyljasmonate". *Plant Cell Reports*, vol. 31, no. 1, 7 de septiembre de 2011, pp. 81-89, ISSN 0721-7714, 1432-203X, DOI 10.1007/s00299-011-1141-8.
37. Belchí, N. S.; Almagro, L.; Sabater, J. A. B.; Fernández, P. F.; Bru, R. y Pedreño, M. A. "Early signaling events in grapevine cells elicited with cyclodextrins and methyl jasmonate". *Plant Physiology and Biochemistry*, vol. 62, enero de 2013, pp. 107-110, ISSN 0981-9428, DOI 10.1016/j.plaphy.2012.11.001.

Recibido: 15 de mayo de 2015

Aceptado: 18 de enero de 2016

## NÚMERO ESPECIAL

*Este número de la revista está dedicado  
al X Congreso Internacional de Biotecnología Vegetal (BioVeg2015)*

### Nota:

Durante el proceso de edición no se pudo acceder al trabajo de retoque y mejoramiento de imágenes, por lo que estas han sido insertadas con la misma calidad con la que enviaron sus autores.

La Editorial

# TUTORIAL

## NÚMERO ESPECIAL

*Este número de la revista está dedicado  
al X Congreso Internacional de Biotecnología Vegetal (BioVeg2015)*

*El Centro de Bioplantas es una institución de investigaciones científicas, adscrita a la Universidad de Ciego de Ávila “Máximo Gómez Báez” del Ministerio de Educación Superior de Cuba. El mismo surge en 1987 como un laboratorio de investigaciones y micropropagación de plantas frutales. Desde 1992, tiene como misión desarrollar, aplicar y ofrecer tecnologías, productos, asistencia técnica y servicios académicos de excelencia en el marco de la Biotecnología Vegetal.*

*El grupo de investigadores, técnicos de laboratorio y otro personal auxiliar altamente calificados, han sido galardonados con premios relevantes de la Academia de las Ciencias de Cuba y con reconocimientos por la labor que realizan en la transferencia de resultados científicos y tecnológicos, la producción de vitroplantas para el comercio internacional, y la educación postgraduada. Para el trabajo científico cuenta con seis laboratorios: Cultivo de Células y Tejidos Vegetales, Agrobiología, Interacción Planta-Patógeno, Ingeniería Metabólica, Mejoramiento Genético de Plantas y Computación Aplicada. Todos con las mejores facilidades y un equipamiento de alta calidad para asegurar resultados relevantes.*

*El Centro de Bioplantas desde 1997 y, como bienal, desarrolla su Congreso Internacional de Biotecnología Vegetal (BioVeg), el cual constituye un marco excepcional para el intercambio de conocimientos y experiencias entre científicos, docentes y productores. En este se debaten en forma de Conferencia Magistrales, Talleres y Mesas Redondas durante sesiones de trabajo, los resultados más relevantes y los problemas más acuciantes que enfrenta la biotecnología vegetal cubana y mundial.*

*Por todo lo anterior, el Comité Organizador de BioVeg2015 en su décima edición se complace en presentarles una muestra representativa de 19 trabajos científicos completos recibidos y siente profunda satisfacción en invitarlos para el próximo BioVeg2017 que se desarrollará en la fecha 22-26 del mes de mayo.*

---

### Nota:

Durante el proceso de edición no se pudo acceder al trabajo de retoque y mejoramiento de imágenes, por lo que estas han sido insertadas con la misma calidad con la que enviaron sus autores.

La Editorial