

Formación de callos y embriones somáticos de *Cocos nucifera* L. cv. Indio Amarillo en medio de cultivo semisólido

Igor Bidot^{1*}, Manuel de Feria², Alina Capote², Maité Chávez², Elisa Quiala², Raúl Barbón², Naivy Pérez² y Juan C. Pérez. *Autor para correspondencia.

¹ Facultad Agroforestal, Centro Universitario de Guantánamo. Carretera a El Salvador Km. 6, Guantánamo, Cuba. e-mail: ibidot@cug.co.cu

² Instituto de Biotecnología de las Plantas, Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Carretera de Camajuaní Km 5.5, Santa Clara, Villa Clara, Cuba. e-mail: mdeferia@uclv.edu.cu

RESUMEN

El presente trabajo tuvo como objetivos evaluar el efecto de la concentración de 2,4-D y el tipo de explante sobre la formación de callos de *Cocos nucifera* L. cv. Indio Amarillo. Los mayores porcentajes de explantes con callos se obtuvieron con las secciones 1 en todas las concentraciones de 2,4-D, con una disminución gradual del mismo a medida que la sección se correspondía con una región más externa de la zona caulinar del embrión cigótico. Los mejores resultados en el proceso de formación de callos se obtuvieron con las concentraciones de 28.0 mg.l⁻¹ y 35.0 mg.l⁻¹ de 2,4-D, con un 90% y un 70% de explantes que formaron callos y un grado promedio de desarrollo de estos según la escala utilizada de 3.5 y 2.2 a las diez semanas de cultivo. Con el objetivo de lograr la formación de embriones somáticos, los callos obtenidos con 28.0 mg.l⁻¹ de 2,4-D se colocaron en un medio de cultivo de similar composición al de formación de callos, pero con una concentración menor de 2,4-D (21.0 mg.l⁻¹) y transcurridas cinco semanas de cultivo se observó como promedio la presencia de siete embriones somáticos por callos, algunos de los cuales se encontraban germinados.

Palabras clave: callogénesis, cocotero, embriogénesis somática, reguladores del crecimiento

SUMMARY

The objective of this work was evaluated the effect of the concentration of 2,4-D and the type of explant in the formation of callus of *Cocos nucifera* L. cv. Indio Amarillo. The biggest percentages of explants with callus were obtained with the sections 1 in all the 2,4-D concentration, with a gradual decrease when the section belongs to the most external region of the somatic embryo caulinar zone. The best results in the callus formation process was obtained with the 2,4-D concentrations of 28.0 mg.l⁻¹ and 35.0 mg.l⁻¹, with 90% and 70% of the explants with callus and an average level of development according to the scale of 3.5 and 2.2 at ten weeks of culture. With the objective of to form somatic embryos, the callus obtained with 28.0 mg.l⁻¹ of 2,4-D were put in a culture medium of similar composition to the callus formation medium, but with a lower concentration of 2,4-D (21.0 mg.l⁻¹) and at five weeks of culture was observed as average seven somatic embryos per callus, some of them germinated.

Key words: callogenesis, coconut tree, somatic embryogenesis, plant grow regulators

INTRODUCCIÓN

El cocotero (*Cocos nucifera* L.) es un cultivo muy importante en la zona tropical. Prácticamente toda la planta puede ser aprovechada por el hombre, aunque su uso más importante radica en la obtención de aceite a partir de la copra (Hoher, 1998). Sin embargo, debido a que esta especie no puede ser propagada de forma asexual y los métodos de cruzamiento convencionales requieren de mucho tiempo, se precisa el desarrollo de otras herramientas para su propagación como puede ser la embriogénesis somática, lo cual permitiría disponer de un sistema de regeneración para el mejoramiento genético de esta especie mediante técnicas como la ingeniería genética. Sin embargo, se conoce que hasta el presente no se ha

desarrollado un protocolo mediante el uso de la embriogénesis somática en el cual se obtenga de manera eficiente la repetibilidad del proceso (Hornung y Verdeil, 1999).

En los últimos años se han desarrollado diferentes protocolos con el empleo de embriones cigóticos inmaduros y maduros como explante, con los cuales se obtienen mejores resultados en un período de tiempo mucho más corto que al emplear hojas jóvenes o inflorescencias inmaduras, explantes también muy utilizados en esta especie. El presente trabajo se desarrolló con el objetivo de obtener la formación de callos utilizando como explante secciones longitudinales de la zona apical de embriones cigóticos germinados y evaluar el efecto del 2,4-D en este proceso.

MATERIALES Y MÉTODOS

Como material vegetal se utilizaron cocos maduros cv. Indio Amarillo, provenientes de la Empresa Integral Agropecuaria de Caibarién, Villa Clara. Los embriones fueron extraídos rodeados por un disco de endospermo sólido para reducir las posibles pérdidas por contaminación microbiana. Estos discos fueron desinfectados con Hipoclorito de Sodio al 2.0% (p/v) durante 20 minutos, se enjuagaron tres veces con agua desionizada estéril y se extrajeron los embriones cigóticos. Estos se desinfectaron en Hipoclorito de sodio al 0.5% (p/v) durante 10 minutos, se enjuagaron tres veces con agua desionizada estéril y se colocaron para su germinación en tubos de ensayo sobre un soporte de papel de filtro, en un medio de cultivo líquido compuesto por las sales inorgánicas propuestas por Eeuwens (1976) a las que se les añadieron las vitaminas propuestas por Morel y Wetmore (1951), 100 mg.l⁻¹ de mioinositol, 2.5 g.l⁻¹ de carbón activado, 30 g.l⁻¹ de sacarosa y pH ajustado a 5.8.

Formación de callos

A los embriones cigóticos germinados se les eliminó el haustorio y la raíz y el tejido resultante (zona apical) se dividió por el eje embrionario en dos partes iguales y de cada mitad se obtuvieron cinco secciones cortadas longitudinalmente, menores de 1.0 mm de grosor, las cuales se agruparon de acuerdo con su posición original con respecto al eje embrionario y se enumeraron desde la sección uno hasta la sección cinco, comenzando desde el centro del eje embrionario hasta la parte más externa.

Con el objetivo de evaluar el efecto del 2,4-D, los explantes obtenidos se colocaron en un medio de cultivo para la formación de callos de similar composición al descrito anteriormente, al cual se le agregaron además 1.13 mg.l⁻¹ de 6-BAP, 1.0 mg.l⁻¹ de 2iP, 3.0 g.l⁻¹ de Gelrite y pH ajustado a 5.8.

Se conformaron cinco tratamientos compuestos por las siguientes concentraciones de 2,4-D: 14.0, 21.0, 28.0, 35.0 y 42.0 mg.l⁻¹. A las diez semanas de cultivo se evaluó que secciones habían formado callos y el porcentaje del área del explante cubierta por callos en cada sección. Para esta última evaluación, se confeccionó una escala de cinco grados que se muestra a continuación:

0: Explante que no formó callos.

1: Explante con callos que cubren hasta el 25% del área.

2: Explante con callos que cubren del 26% al 50% del área.

3: Explante con callos que cubren del 51% al 75% del área.

4: Explante con callos que cubren del 75% al 100% del área.

Formación de embriones somáticos

Con el objetivo de formar embriones somáticos los callos obtenidos en el mejor de los tratamientos evaluados se subcultivaron en un medio de cultivo para la formación de embriones somáticos, de composición similar al medio de cultivo de formación de callos pero con una concentración menor de 2,4-D (21.0 mg.l⁻¹). Después de cinco semanas de cultivo se evaluó el número de embriones somáticos obtenidos por callo.

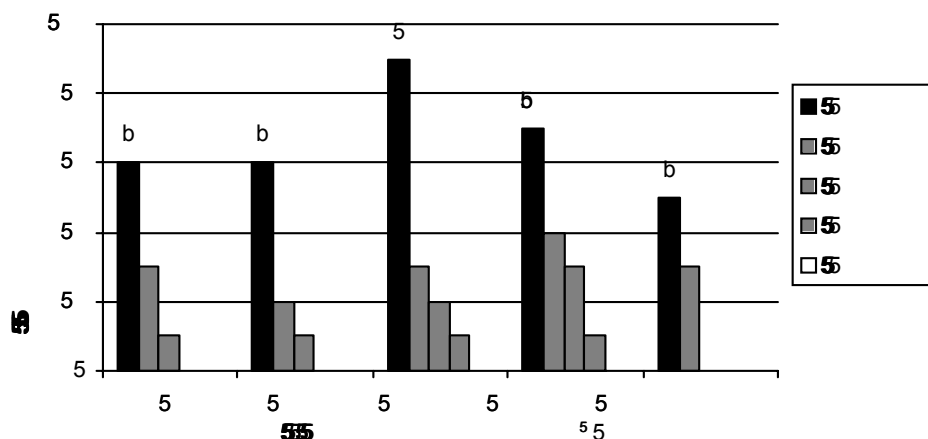
Los resultados expresados en porcentaje se analizaron estadísticamente mediante una regresión logística y la comparación de proporciones. Los datos del desarrollo de los callos se analizaron mediante un test de Kruskal Wallis y una comparación múltiple de medias de rangos con distribución libre. Para estos análisis los paquetes estadístico utilizados fueron Statistix versión 1.0, Analitical Software y Statgraphic plus 2.1, Statistical Graphics Corporation.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Formación de callos

En cuanto a las diferentes secciones según su posición con respecto al eje embrionario, el mayor porcentaje de callos se formó en la sección uno, seguido de las secciones dos y tres en todas las concentraciones de 2,4-D utilizadas, aunque solo se presentaron diferencias estadísticas entre las secciones uno. Los mejores resultados en la formación de los callos se obtuvieron al emplear las concentraciones de 28.0 mg.l⁻¹ y 35.0 mg.l⁻¹ de 2,4-D con un 90% y 70% de secciones del tipo uno que formaron callos a las 10 semanas de cultivo (Figura 1). En las concentraciones de 35.0 y 42.0 mg.l⁻¹ de 2,4-D el 10.0 y 20.0% de los explantes se necrosaron y murieron, probablemente debido a la intensa fenolización producto de la alta concentración de 2,4-D, unido a las características de esta especie que entre sus mayores dificultades para el cultivo *in vitro* se encuentra la intensa fenolización de los explantes.

En la sección cuatro fue donde se obtuvo la menor formación de callos con un 10.0% en 28.0 y 35.0 mg.l⁻¹ de 2,4-D, mientras que en la sección cinco no se formaron callos. Resultados similares fueron obtenidos por Samosir *et al.* (1999), al utilizar este mismo tipo de explante en el cultivar Alto Batu Layar.

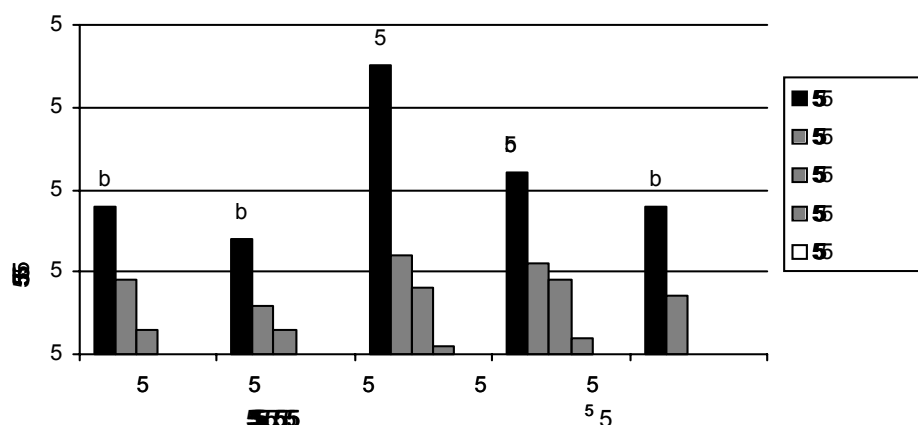


Valores con letras distintas en cada sección difieren estadísticamente para una regresión logística y la comparación de proporciones.

Figura 1. Efecto de la concentración de 2,4-D en la formación de callos de *Cocos nucifera* cv. Indio Amarillo dependiendo de la posición del explante con respecto al eje embrionario a las 10 semanas de cultivo.

En cuanto al porcentaje del área del explante cubierta por callo, fue también en las concentraciones de 28.0 mg.l⁻¹ y 35.0 mg.l⁻¹ de 2,4-D en las que se observaron los mayores

desarrollos de los callos con un grado promedio en la escala utilizada de 3.5 y 2.2 respectivamente en los explantes de la sección 1 a las 10 semanas de cultivo (Figura 2).



Valores con letras distintas en cada sección difieren estadísticamente para un test de Kruskal Wallis y una comparación múltiple de medias de rangos con distribución libre.

Figura 2. Efecto de la concentración del 2,4-D con respecto al desarrollo de los callos de *Cocos nucifera* cv. Indio amarillo según el porcentaje del área del explante cubierta por estos a las 10 semanas de cultivo.

El hecho de que el potencial para producir callos decreció gradualmente desde las secciones centrales a las más externas sugiere que es en el eje embrionario donde se encontraban las células capaces de multiplicarse y formar los callos, las cuales estaban en activa división debido al proceso de germinación antes de que se colocaran los explantes para la obtención de los callos. Estas células pasaron a formar parte de los tejidos de las secciones centrales al dividirse la zona caular del embrión cigótico germinado y por consiguiente fueron las que presentaron una mejor respuesta.

Las diferencias encontradas en el proceso de formación de callos en las diferentes secciones se deben a las características del embrión cigótico

del cocotero. En estos embriones el haustorio constituye el tejido predominante y rodea por completo el ápice caular y la raíz que se encuentran en un extremo (Blake y Hornung, 1995). Debido a esta estructura interna se seccionaron para eliminar el tejido del haustorio que bloquea físicamente el eje del embrión impidiendo su contacto con el medio de cultivo y permitir así una acción más directa de sus diferentes componentes, en especial el 2,4-D, sobre las células que componen la zona caular.

Formación de embriones somáticos

En el medio de cultivo para la formación de embriones somáticos se obtuvo la formación de los mismos a las cinco semanas de cultivo (Figura 3).

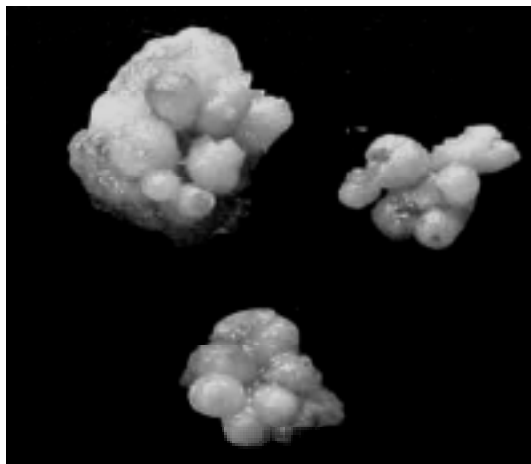


Figura 3. Embriones somáticos de *Cocos nucifera* cv. Indio amarillo obtenidos a las cinco semanas de cultivo.

Se formaron un promedio de siete embriones somáticos por callo en las secciones uno, los cuales presentaron un color blanco amarillento (Figura 4 A y

B) y se observó además el inicio del proceso de germinación de algunos embriones somáticos en este mismo medio de cultivo (Figura 4 C).

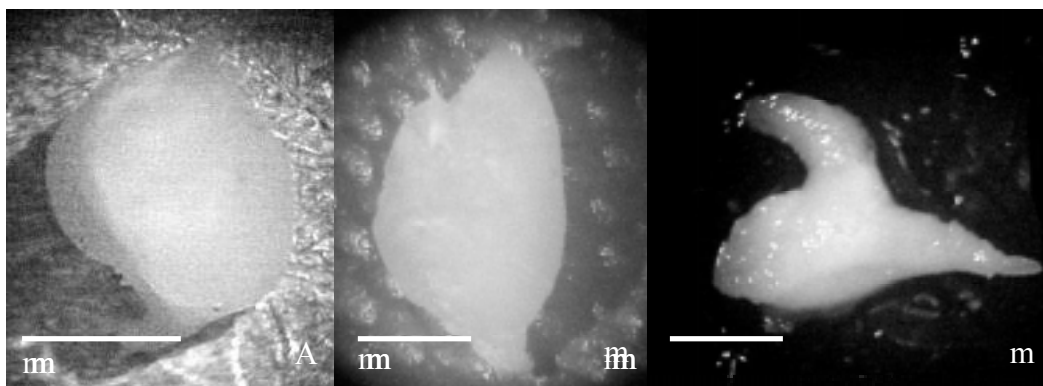


Figura 4. Embriones somáticos de *Cocos nucifera* cv. Indio amarillo (A y B) y embrión somático una vez que ha iniciado el proceso de germinación (C).

La mayoría de los autores inducen la formación y maduración de los embriones somáticos de cocotero mediante el subcultivo de los callos a uno o varios medios de cultivo con disminución progresiva de la concentración de 2,4-D (Hoche *et al.* 1998; Verdeil *et al.*, 1999). Sin embargo, la obtención de embriones somáticos bien formados y capaces de germinar constituye un problema fundamental en los trabajos realizados en esta especie, con solo un 5.0% de embriones somáticos de cocotero que germinan (Hormung y Verdeil, 1999).

CONCLUSIONES

Se logró la formación de callos en todas las concentraciones de 2,4-D estudiadas.

El 2,4-D tuvo un efecto marcado sobre el porcentaje de explantes que formaron callos, el mayor porcentaje (90%) se obtuvo con una concentración de 28.0 mg.l⁻¹ y al utilizar la sección uno.

Se logró la formación y el inicio de la germinación de los embriones somáticos del cultivar Indio amarillo al reducir la concentración del 2,4-D desde 28.0 hasta 21.0 mg.l⁻¹.

REFERENCIAS

- Blake, J y Hornung R (1995). Somatic embryogenesis in coconut (*Cocos nucifera* L.). En: Joint, S, Gupta P y Newton R (Eds). Somatic embryogenesis in woody plants. Vol 2, pp. 270-340. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht
- Euwens, CJ (1976). Mineral requirements for growth and callus initiation of tissue explants excised from mature coconut (*Cocos nucifera*) and date (*Phoenix dactylifera*) palms cultured *in vitro*. Physiologia Plantarum 36: 23-28
- Hoche, V, Verdeil JL, Grosdemange F, Huet C, Bourdeix R, N'Cho Y, Sangare A, Hornung R, Jacobsen H-J, Rillo E, Oropeza C y Hamon S (1998). Collaboration internationale pour la maîtrise de la multiplication végétative *in vitro* du cocotier (*Cocos nucifera* L.). Cahiers Agricultures 7: 499-505
- Hornung, R y Verdeil JL (1999). Somatic embryogenesis in coconut from immature inflorescence explants. En: Oropeza, C, Verdeil JL, Ashburner GR, Cárdena R y Santamaría JM (Eds).

Current Advances in Coconut Biotechnology, pp. 297-308. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht

Morel, G y Wetmore RM (1951). Fern callus tissue culture. American Journal of Botany 38: 141-143

Samosir, YMS, Godwin ID y Adkins SW (1999). The use of osmotically active agents and abscisic acid can optimize the maturation of coconut embryos. En: Oropeza, C, Verdeil JL, Ashburner GR, Cardena R y Santamaría JM (Eds). Current

Advances in Coconut Biotechnology, pp 341-354. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht

Verdeil, JL, Hornung R, Jacobsen HJ, Rillo E, Oropeza C, Bourdeix R, N'Cho Y-P, Hoche V, Hamon S y Sangare A (1999). Recent progress on coconut micropropagation through a joined effort involving different countries. En: Oropeza, C, Verdeil JL, Ashburner GR, Cárdena R y Santamaría JM (Eds). Current Advances in Coconut Biotechnology, pp. 391-405. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht