

Inducción de la embriogénesis somática en *Cocos nucifera* L. a partir de inflorescencias inmaduras

Juan Carlos Pérez*, Rafael Gómez Kosky y Juan Pérez Ponce. *Autor para correspondencia.

Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Carretera a Camajuaní Km 5¹/₂. Santa Clara. Villa Clara. Cuba. e-mail: jcgreen@uclv.edu.cu

RESUMEN

Dentro de los métodos de multiplicación vegetativa, la embriogénesis somática se considera el más prometedor para la multiplicación del cocotero (*Cocos nucifera* L.). Se tomaron inflorescencias inmaduras de diferentes edades de árboles Malayo Cobrizo induciéndose la embriogénesis somática con tres concentraciones de ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D) (70, 90 y 110 mg.l⁻¹) en el medio de cultivo. Se observaron diferencias en la fenolización de los explantes en dependencia de la edad de las espatas, los explantes de las espatas entre 1.0 y 2.5 cm no se fenolizaron mientras que las mayores que 17.0 cm se fenolizaron provocando la muerte del explante. A los 45 días aproximadamente de la siembra comenzaron a observar los embriones somáticos sin previa formación de callos, encontrándose diferencias significativas en la respuesta embriogénica en función de la edad de las espatas y las concentraciones de 2,4-D. Los mayores porcentajes de explantes con embriones somáticos se obtuvieron entre las inflorescencias de 7.0 y 13.5 cm de longitud de la espata, los cuales estuvieron entre 41.6 y 48.6 %. Las dosis de 2,4-D más efectivas fueron las más elevadas (90 y 110 mg.l⁻¹), con 36 y 38 % de explantes embriogénicos respectivamente.

Palabras clave: edad del explante, fenolización, 2,4D

ABSTRACT

Including all the methods of vegetative multiplication, the somatic embryogenesis is the most promising for coconut multiplication. Immature inflorescences of Coppery Malay from different ages trees were used. Three concentrations of 2,4-D were used (70, 90 and 110 mg.l⁻¹) in the culture medium. Differences were observed in the browning (phenolic compounds) of the explants depending on the age of the spathe, explants from spathe between 1.0 to 2.5 cm not show browning while more than 17.0 cm show browning until death. The somatic embryos began to be observed approximately from 45 days of the start the experiment without previous calli formation. Significant differences were observed in the somatic embryogenesis formation in order of the age of the spathe and the concentrations of 2,4-D. The biggest percents of embryogenic explants were obtained among the inflorescences between 7.0 and 13.5 cm of spathe long, which were between 41.6 and 48.6%. The most effective doses of 2,4-D were the highest (90 and 110 mg.l⁻¹ of 2,4-D) with 36 and 38% of embryogenic explants respectively.

Keywords: age of explants, Browning, 2,4D

INTRODUCCIÓN

Con el objetivo de multiplicar agámicamente especies de importancia económica se ha trabajado a nivel mundial sobre diferentes técnicas biotecnológicas. En el cocotero algunas de estas no son aplicables producto de las características propias del cultivo (altamente recalcitrante, lento desarrollo *in vitro*, imposibilidad de aplicar multiplicaciones por yemas axilares, adventicias, etc). Es por eso que se considera la embriogénesis somática, como la alternativa más prometedora para este fin (Verdeil *et al.*, 1995).

La clonación de palmas por cultivo de tejidos se encuentra más avanzada en palmas datileras y palmas de aceites (Buffard-Morel *et al.*, 1992). En el cocotero se han realizado trabajos utilizando callos a partir de embriones cigóticos (Gupta *et al.*, 1984), hojas inmaduras (Raju *et al.*, 1984; Buffard-Morel *et al.*, 1992) e inflorescencias (Branton y Blake, 1984; Verdeil *et al.*, 1994).

En el presente trabajo se pretendió inducir la embriogénesis somática en el cocotero, evaluando los porcentajes de fenolización y la aparición de estructuras embriogénicas a partir de explantes de inflorescencias inmaduras.

MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo se realizó en el laboratorio de Biorreactores del Instituto de Biotecnología de las Plantas, Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas, Cuba.

Material vegetal

Se utilizaron cocoteros de más de seis años en producción del tipo enano Malayo Cobrizo de diferentes zonas del país. Debido a la profundidad en que se encontraban los tejidos de interés, hubo que sacrificar en todos los casos las plantas donadoras. Se extrajeron las espatas cerradas y se almacenaron a 4°C hasta la implantación *in vitro*.

Para la extracción de las inflorescencias las espatas se lavaron con agua y detergente, luego con hipoclorito de sodio (NaOCl) al 1.5% para después introducirlas en la cabina de flujo laminar. Posteriormente se abrieron las espatas y se extrajeron las inflorescencias estériles.

Las inflorescencias se seccionaron en explantes de 0.5 a 1.0 cm de longitud. Estas manipulaciones se realizaron manteniendo los tejidos inmersos en una solución estéril de L-Cisteína a razón de 90 mg.l⁻¹ para evitar la rápida fenolización.

Efecto del 2,4-D sobre la inducción de la embriogénesis somática

Las inflorescencias utilizadas se clasificaron en función de la edad fisiológica a partir de la longitud de la espata (a mayor longitud la espata, más viejo el tejido). Se utilizaron 13 edades distintas y consecutivas (Tabla 1). Se evaluó el porcentaje de fenolización de los explantes en función del tiempo (semanalmente), así como la aparición y desarrollo de la embriogénesis somática en los distintos tratamientos. Fueron analizados alrededor de 25 explantes por tratamiento.

Tabla 1. Nomenclatura de las distintas inflorescencias de *Cocos nucifera* L. (D) utilizadas en función de la longitud (cm) de la espata.

D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10	D11	D12	D13
1	1.5	2	2.5	3.5	5	7	9	13.5	17	30	44	56

Se estudiaron tres dosis de 2,4-D (70, 90 y 110 mg.l⁻¹), manteniendo un medio de cultivo basal constante (Tabla 2). Se colocaron los explantes sobre dicho medio de cultivo y se incubaron a 26°C de temperatura en condiciones de oscuridad durante un período de 60 días. Se repitió el experimento tres veces y se utilizó el paquete estadístico SPSS para

el análisis de los resultados y el software Statistix versión 1.0 para el análisis estadístico de los porcentajes.

El medio de cultivo fue esterilizado en autoclave a 121°C de temperatura y 1.2 atmósferas de presión por un tiempo de 15 minutos.

Tabla 2. Medio de cultivo basal utilizado para la inducción embriogénica de los explantes de *Cocos nucifera* L.

Medio de cultivo basal	Macro MS Modificado		
Macro MS Modificado.	100 %	KNO ₃	48 g.l ⁻¹
Micro MS.	100 %	KH ₂ PO ₄	28 g.l ⁻¹
Vitaminas Morel y Wetmore (1951)	100 %	NH ₄ NO ₃	52 g.l ⁻¹
CaCl ₂	215 mg.l ⁻¹	MgSO ₄ · 7H ₂ O	12 g.l ⁻¹
Adenina.	40 mg.l ⁻¹		
Carbón activado.	2 g.l ⁻¹		
Sacarosa	40 g.l ⁻¹		
Myo-inositol.	100 mg.l ⁻¹		
pH	4.5		

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A pesar de la ausencia visual de fenoles en el momento de la siembra, a los dos días comenzaron a aparecer síntomas en los explantes. Los efectos más negativos se apreciaron en las edades más maduras de las espatas donde los explantes provenientes de las espatas entre D11 - D13 se fenolizaron completamente provocando la muerte del tejido en un tiempo de 15 - 20 días aproximadamente. Por el contrario en las inflorescencias más jóvenes entre D1 - D4, la fenolización fue casi nula, encontrándose relación entre la edad fisiológica de los tejidos y las afecciones por procesos fenolizantes. El grado de fenolización de los explantes de una misma espata varió en función de la concentración de 2,4-D. Los

tratamientos con mayores concentraciones de la auxina mostraron por lo general, índices de fenolización mayores que los de menores concentraciones (Fig. 1, 2 y 3). En las inflorescencias D11, D12 y D13 estas diferencias se vieron más marcadas debido a la rapidez del proceso.

Los resultados obtenidos en la formación de embriones somáticos fueron satisfactorios. Se desarrolló una embriogénesis somática sin previo desarrollo de estructuras callosas, tomando apariencia de una embriogénesis directa, a partir de yemas o tejidos meristemáticos florales. Estos resultados son interesantes pues se reducirían los índices de variación somaclonal, sobre todo en estos casos donde se emplean concentraciones tan altas de 2,4-D.

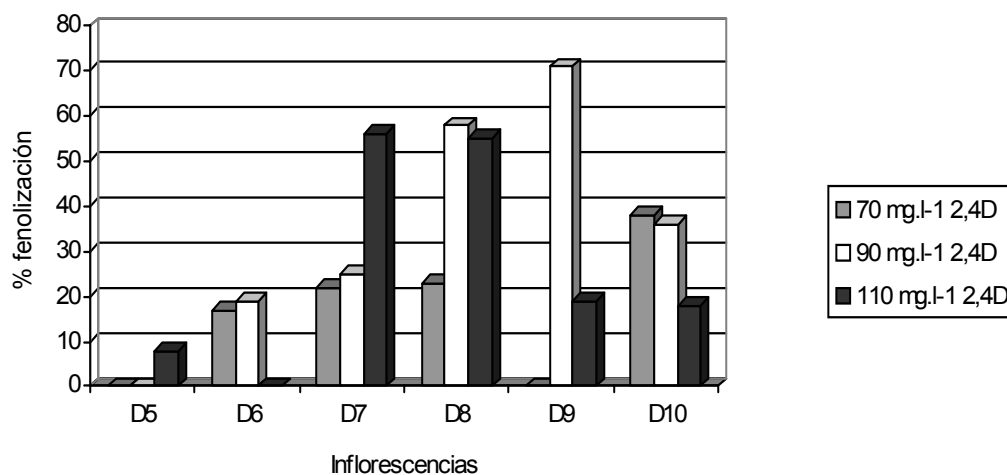


Figura 1. Porcentajes de fenolización de los explantes de *Cocos nucifera* L. con diferentes concentraciones de 2,4-D en el medio de cultivo a los 15 días de cultivo.

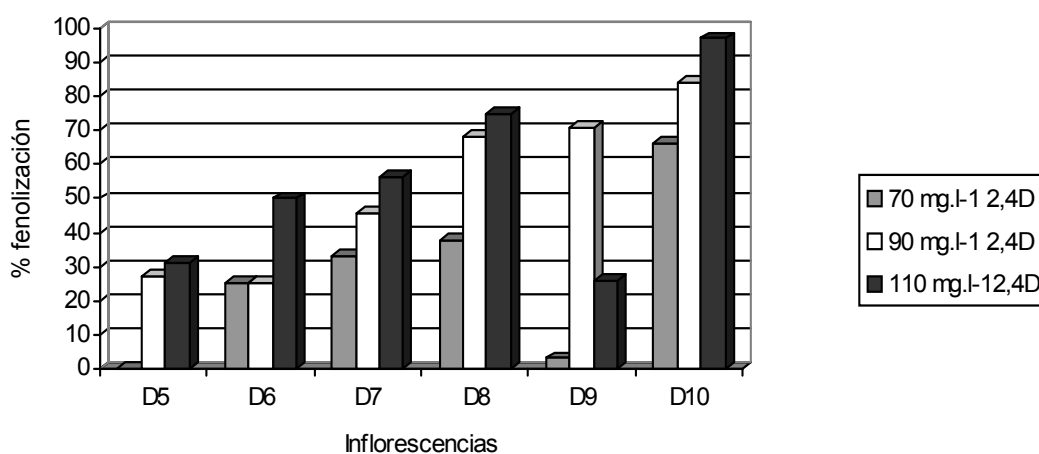


Figura 2. Porcentajes de fenolización de los explantes de *Cocos nucifera* L. con diferentes concentraciones de 2,4-D en el medio de cultivo a los 35 días de cultivo

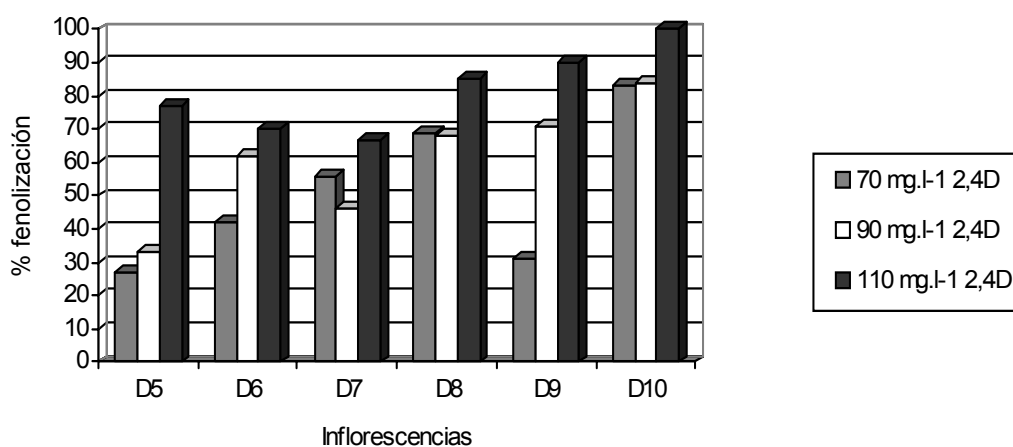
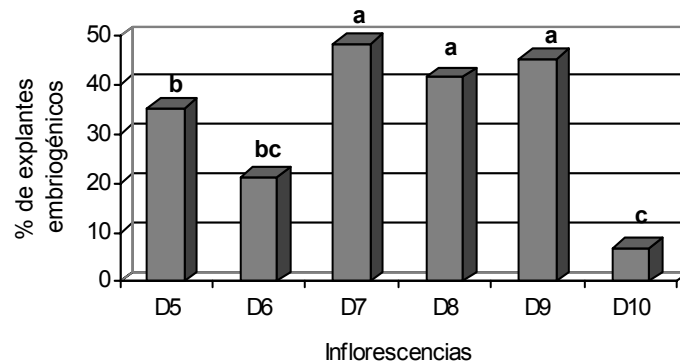


Figura 3. Porcentajes de fenolización de los explantes de *Cocos nucifera* L. con diferentes concentraciones de 2,4-D en el medio de cultivo a los 50 días de cultivo.

Los explantes de las espatas D1 – D4 (1.0 – 2.5 cm) no mostraron formación de embriones somáticos a pesar de la ausencia de fenoles en los mismos. En los demás explantes se encontraron diferencias en la formación de embriones somáticos (Fig. 4). Entre

ellas las de mejores resultados fueron las inflorescencias D7, D8 y D9, las cuales alcanzaron valores entre 41.6 y 48.6 % de explantes embriogénicos sin diferencias significativas entre ellas.



Letras iguales difieren estadísticamente para $p < 0.05$

Figura 4. Porcentaje de explantes embriogénicos de *Cocos nucifera* L. en relación con las edades de las inflorescencias utilizadas.

Las concentraciones de 2,4-D que indujeron la mejor respuesta embriogénica fueron 90 y 110 mg.l⁻¹ sin existir diferencias significativas entre ellas, con

valores entre 36.33 y 38.23 % de explantes que formaron estructuras embriogénicas (Fig. 5).

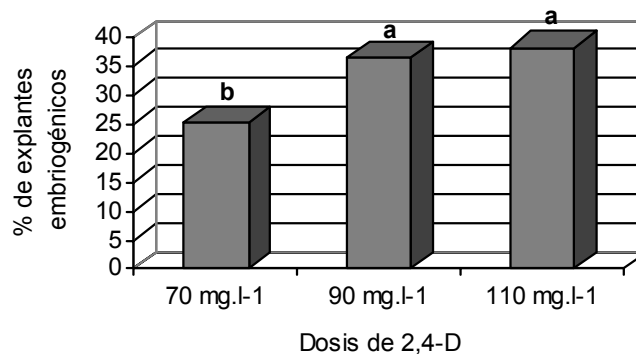


Figura 5. Porcentaje de explantes embriogénicos de *Cocos nucifera* L. en función de las concentraciones de 2,4-D en el medio de cultivo.

El potencial embriogénico de las inflorescencias inmaduras de cocotero varió en función de la edad fisiológica del tejido, además de la concentración de 2,4-D en el medio de cultivo. Esta relación se obtuvo también al evaluar la capacidad de formación de callos friables en condiciones similares también con explantes de inflorescencias (Verdeil *et al.*, 1994), demostrándose la capacidad embriogénica de los tejidos más jóvenes.

En ninguno de los casos se logró la maduración y regeneración de los embriones somáticos obtenidos. La inducción de la embriogénesis somática y regeneración en el cocotero, aunque con muy baja eficiencia, con una reducción gradual de la concentración de 2,4-D se ha descrito empleando embriones cigóticos (Fernando *et al.*, 2000), así como inflorescencias inmaduras como explantes iniciales

(Dussert *et al.*, 1995), aunque en ambos casos inducen primeramente la formación de callos friables. Al mantener constante la concentración de 2,4-D se pudo afectar la posterior maduración y germinación de los mismos embriones somáticos obtenidos.

El carácter recalcitrante del cocotero en el cultivo de tejidos ha hecho difícil el desarrollo de técnicas de propagación masiva *in vitro*, aunque se han obtenido excelentes resultados sobre todo empleando tejidos de embriones cigóticos (Chan *et al.*, 1998; Fernando *et al.*, 2000).

CONCLUSIONES

Se evidenció una vez más el carácter recalcitrante que posee el cocotero en el cultivo *in vitro*, así como

la alta incidencia de procesos oxidativos y presencia de fenoles en los explantes durante al cultivo. Los explantes provenientes de espatas de más de 17.0 cm se fenolizaron hasta la muerte no siendo así con los de menos de 3.5 cm.

Se encontró relación entre le edad fisiológica de los tejidos y la capacidad de formar embriones somáticos determinándose la edad óptima en espatas entre 7.0 – 13.5 cm de longitud. Los mejores resultados en cuanto a la obtención de embriones somáticos se obtuvieron con las concentraciones 90 y 110 mg.l⁻¹ de 2,4-D,

REFERENCIAS

- Branton RL y Blake J (1984) Clonal propagation of coconut palm. En: Pushparajah E, Chew Poh Soon (eds) Proc. Int. Cocoa/Coconuts. Kuala Lumpur, pp. 1-8
- Buffard-Morel J, Verdeil JL, Pannetier C (1992) Embryogénese somatique du cocotier (*Cocos nucifera* L.) à partir d'explants foliaires: étude histologique. Can. J. Bot. 70 : 735-741
- Chan JL, Saézn L, Talavera C, Hornung R, Robert M, Oropeza C (1998) Regeneration of coconut (*Cocos nucifera* L.) from plumule explants through somatic embryogenesis. Plant Cell Reports 17:515 – 521
- Dussert S, Verdeil JL, Rival A, Noirot M, Buffard-Morel J (1995) Nutrient uptake and growth of *in vitro* coconut (*Cocos nucifera* L.) calluses. Plant Science 106 : 185 – 193
- Fernando, SC y Gamage, CKA (2000) Abscisic acid induced somatic embryogenesis in immature embryo explants of coconut (*Cocos nucifera* L.) Plant Science 151 : 193 – 198
- Gupta PK, Kendurka SV, Kulkarni VM, Shirgurkar MV, Mascarenhas AF (1984) Somatic embryogenesis and plants from zygotic embryos of coconut (*Cocos nucifera* L.) Plant Cell Rep 3 : 222-225
- Morel G y Wetmore RH (1951) Tissue culture of monocotyledones. Am. J. Bot. 38:138 – 140
- Raju CR, Prakash Kumar P, Chandramohan M, Iyer RD (1984) Coconut plantlets from leaves tissue cultures. Journal of Plantation Crops 12 : 75-81
- Verdeil JL, Baudoin L, N'Cho Yavo P (1995) Perspectives de la multiplication végétative du cocotier par embryogénese somatique. La Filiere Aujourd'hui Demain 2 : 92 – 97
- Verdeil JL, Huet Ch, Grosdemange F, Buffard-Morel J (1994) Plant regeneration from cultured immature inflorescences of coconut (*Cocos nucifera* L.): evidence for somatic embryogenesis. Plant Cell Reports 13 : 218-221