

INDUCCIÓN DE EMBRIONES SOMÁTICOS EN EXPLANTES DE PLÚMULA DE COCOTERO POR ÁCIDO ABCSÍCSICO Y POLIETILENGLICOL

INDUCTION OF SOMATIC EMBRYOS IN PLUMULE EXPLANTS OF COCONUT BY ABSCISIC ACID AND POLYETHYLENE GLYCOL

Alfonso Azpeitia Morales*, Luis Sáenz Carbonell, José Luis Chan y Carlos Oropeza Salin

Unidad de Biotecnología, Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY). Calle 43 No. 130, Col. Chuburna de Hidalgo, C.P. 97200 Mérida, Yucatán, Tel 01 (999) 981-3966. Dirección Actual: Programa de Biotecnología, Campo Experimental Huimanguillo, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Km 1 Carr. Huimanguillo-Cárdenas, Apdo. Postal No. 17, C.P. 86400, Correo electrónico: azpeitia20032003@yahoo.com.mx Tel 01 (917) 375-0396.

* Autor responsable

RESUMEN

El incremento en la demanda de palmas de cocotero (*Cocos nucifera* L.) mejoradas o seleccionadas requiere de su multiplicación masiva. Esto podría ser alcanzado a través de la micropropagación. Existe un protocolo de regeneración reproducible vía embriogénesis somática con explantes de plúmula, pero su eficiencia es todavía baja. Por tanto, el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto del ácido abscísico (ABA) y polietilenglicol (PEG) a diferentes concentraciones (0, 22.5, 45 y 90 μM y 0, 15, 30, 60 g L⁻¹, respectivamente) en la formación de embriones somáticos y su conversión a plantas, a partir de explantes de plúmula de cocotero. La respuesta fue evaluada a los 30, 60, 90, 150 y 210 días después de la adición de ABA o PEG, en el medio II Y3. El mejor tratamiento fue 90 μM de ABA + 15 g L⁻¹ de PEG, que produjo 10.6 embriones somáticos/callos embriogénicos a los 150 días y la formación de tres plántulas bien desarrolladas por callos embriogénicos a los 210 días. En cambio, los callos embriogénicos testigo solamente formaron 6.2 embriones somáticos y 0.7 plántulas, respectivamente. Las plantas obtenidas con el tratamiento 90 μM ABA + PEG 15 g L⁻¹ y el control fueron aclimatadas y presentaron una supervivencia de 90 % después de un año. Este tratamiento incrementó en 71 % la formación de los embriones somáticos y cuadruplicó la formación de plántulas, lo que mejora la eficiencia total del sistema, que eventualmente podría tener una aplicación práctica. Éste es el primer reporte del efecto de ABA y PEG al utilizar plúmula de cocotero como explante.

Palabras clave: *Cocos nucifera* L., embriogénesis somática, plúmula, ácido abscísico, polietilenglicol.

SUMMARY

The increasing demand for coconut palms (*Cocos nucifera* L.) requires massive multiplication of improved or selected plants. This could be achieved through micropropagation. A reproducible regeneration protocol by somatic embryogenesis from plumule explants has already been reported, although its efficiency is still low. Therefore the objective of the present research was to evaluate the effect of different concentrations of abscisic acid (ABA) (0, 22.5, 45 and 90 μM) and polyethylene glycol (PEG) (0, 15, 30, 60 g L⁻¹) on the formation of somatic embryos and their conversion into plants using plumule explants of coconut palm. The response was evaluated at 30, 60, 90, 150 and 210 days after the addition of ABA or PEG to the medium II Y3. The best treatment was 90 μM ABA + 15 g L⁻¹ of PEG with the formation of 10.6 somatic embryos per embryogenic callus at 150 days of culture and the formation of three well developed plantlets per embryogenic callus after 210 days of culture.

Instead, only 6.2 somatic embryos and 0.7 plantlets were obtained from untreated embryogenic calli. Plantlets obtained from 90 μM of ABA + 15 g L⁻¹ PEG and from controls were acclimated in a greenhouse, having a 90 % plant survival after one year. This treatment increased both the yield of somatic embryos (by 71 %) and the plantlet formation (4 times), thus enhancing the system overall efficiency which eventually may have a practical application. This is the first report on the use of ABA and PEG when coconut plumules are utilized as explants.

Index words: *Cocos nucifera* L., somatic embryogenesis, plumule, abscisic acid, polyethylene glycol.

INTRODUCCIÓN

El cocotero (*Cocos nucifera*) es un cultivo que representa una fuente de ingresos importante en las zonas tropicales húmedas debido a que cada una de sus partes tienen múltiples aplicaciones como la fruta fresca y su empleo industrial. Desafortunadamente el cocotero está siendo afectado en México por una enfermedad denominada amarillamiento letal (AL), para la cual no existe forma alguna de control efectivo (Oropeza, 1998) y amenaza con acabar con las plantaciones de cocotero, excepto aquéllas con germoplasma resistente. La lenta propagación a través de semillas y la escasa disponibilidad de palmas de cocotero resistentes, son limitantes para la replantación en zonas devastadas por el AL y en general de todo el país, pues la mayoría de las palmas son muy viejas y requieren sustituirse. Una alternativa es la propagación clonal del cocotero, mediante la cual se podrían multiplicar los individuos élite en cantidad suficiente para los futuros programas de replantación.

Sin embargo, el cocotero es una planta recalcitrante para ser cultivada *in vitro*, y los reportes muestran resultados inconsistentes (Verdeil y Buffard-Morel, 1995). Verdeil *et al.* (1994) generaron un protocolo de micropropagación que utiliza explantes de inflorescencias,

que es reproducible pero con una eficiencia muy baja. Afortunadamente, en el Centro de Investigación Científica de Yucatán, en colaboración con instituciones como Wye College (Inglaterra), se lograron avances importantes al desarrollar un protocolo altamente reproducible para la obtención de embriones somáticos y plántulas que pueden ser exitosamente establecidas *ex vitro* con base en el uso de plúmula como explante (Hornung, 1995; Chan *et al.*, 1998; Sáenz *et al.*, 1999); tal protocolo dista mucho de ser eficiente para una aplicación práctica. Por tanto, es necesario contar con diferentes estrategias para incrementar el rendimiento de la embriogénesis somática. En la literatura se ha reportado que la adición de fitohormonas como el ácido abscísico (ABA) y de agentes osmóticos como el polietilenglicol (PEG) permiten incrementar la formación y maduración de los embriones somáticos.

El ABA está involucrado en procesos fisiológicos como el crecimiento de plantas y el desarrollo de embriones, que incluyen su maduración y la de las semillas (Dunstan *et al.*, 1998). Esta fitohormona promueve la síntesis de proteínas de almacenamiento, inhibición de la germinación precoz, tolerancia a la deshidratación, supresión de la movilización de reservas e inducción de la latencia (Gaspar *et al.*, 1996). La maduración *in vitro* de embriones somáticos (ES) en forma sincrónica, se puede lograr por adición de ABA (Ryan, 1999) o de sustancias con actividad osmótica como sacarosa, trehalosa, manitol y PEG, las cuales pueden estimular la síntesis de ABA en el embrión, presumiblemente debido al simular un estrés hídrico (Takahata *et al.*, 1993; Attree *et al.*, 1995). La promoción de la maduración de los ES puede favorecer la eficiencia de este proceso al aumentar el número de embriones formados adecuadamente (Bornman, 1993). Por tanto, el ABA y los agentes osmóticos se han utilizado en diferentes especies para mejorar protocolos de micropropagación vía embriogénesis somática.

En el caso de cocotero, Samosir *et al.* (1999) reportaron el uso de ABA y PEG para mejorar la sincronización y el número de embriones somáticos a partir de embriones cigóticos; encontraron que la combinación con 45 μM ABA y 30 g L⁻¹ de PEG produjeron mayor desarrollo sincronizado y número de brotes que el control, además de permitir disminuir el crecimiento de callos no embriogénicos y de tejido tipo haustorial. En un reporte más reciente, Fernando y Gamage (2000) mostraron un efecto favorable del ABA, al obtener 67.4 % de embriogénesis somática mediante aplicación de 5 μM de ABA durante cinco semanas en callos nodulares de dos meses de iniciados a partir de embriones cigóticos inmaduros de *Cocos nucifera*; la

regeneración de brotes fue de 9.4 % pero el desarrollo de plantas fue esporádico.

Si bien esta estrategia se ha utilizado en cocotero (en embriones cigóticos) con resultados alentadores, sería importante probarla en explantes de plúmula, por ser el explante con mayor probabilidad de tener una aplicación práctica. Otras estrategias como la adición de poliaminas se han utilizado en embriones cigóticos con resultados satisfactorios (Adkins *et al.*, 1999); sin embargo, en cultivos *in vitro* derivados de plúmula no han mostrado ningún efecto.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto del ácido abscísico y polietilenglicol en la formación de embriones somáticos y su conversión a plantas, a partir de explantes de plúmula de cocotero. Se partió de la hipótesis de que la formación de embriones somáticos en explantes de embriones cigóticos inmaduros de cocotero es promovida por el uso de ácido abscísico en combinación con el polietilenglicol, por lo que el uso de estos compuestos en explantes de plúmula de cocotero podría incrementar la formación de embriones somáticos y su capacidad de conversión a plantas a partir de callos embriogénicos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal y condiciones de cultivo

Para el desarrollo de este trabajo se colectaron nueces de cocotero Malayo Enano Verde en Dzidzantun, Yucatán durante el mes de octubre de 1999. Los embriones cigóticos fueron desinfectados en condiciones asépticas, de acuerdo con Chan *et al.* (1998). Las plúmulas fueron cultivadas en etapa I, que comprende la fase de formación de callo o callo inicial y callo embriogénico. Durante esta etapa se utilizó el medio I, constituido del medio de cultivo Y3, de acuerdo con Eeuwens (1976), adicionado con sacarosa (5 %), gelrite® (0.3 %), carbón activado lavado ácido (0.25 %) y la fitohormona ácido diclorofenoxiacético (2, 4-D) 0.65 mM. El pH del medio fue ajustado a 5.75 antes de la esterilización por autoclave por 20 min a 120 °C. Todos los explantes (plúmulas) fueron cultivados en frascos de vidrio 35 mL que contenían 10 mL del medio de cultivo y se establecieron en las condiciones I, que consistieron en un periodo de oscuridad de tres meses a 27 \pm 2 °C para inducir la formación de callo embriogénico (CE).

Posteriormente, los CE fueron subcultivados en etapa II, en la cual se originan los embriones somáticos a partir de los callos embriogénicos. Los cultivos se establecieron en un medio II, que consiste del medio básico Y3 antes

mencionado más las fitohormonas 6-bencilaminopurina (6-BAP) 300 μM y 2,4-D 6 μM . Las condiciones II consistieron en fotoperiodo de 16 h de iluminación (45-60 μmol de fotones $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$) / 8 h de oscuridad, a 27 ± 2 °C, con subcultivos cada dos meses. Todos los callos embriogénicos fueron cultivados en frascos de vidrio de 100 mL que contenían 30 mL de medio de cultivo.

Experimentos con ABA y PEG

Diferentes concentraciones de ABA esterilizadas por filtración (Millipore 0.22 μm) fueron agregadas al medio II estéril antes de que solidificara, para dar una concentración final de 0, 22.5, 45 y 90 μM . En el caso de PEG (peso molecular 3 350), 0, 15, 30, 60 g L^{-1} fueron agregados al medio II y se esterizaron por autoclave. Resultaron 16 tratamientos, que incluyen al ABA y PEG solos o en forma combinada. Los callos embriogénicos obtenidos del medio I se subcultivaron en estos tratamientos durante 30 días. Al finalizar este periodo los CE fueron transferidos al mismo medio II sin incluir ABA o PEG. Esta etapa se realizó en las condiciones II, con subcultivos cada dos meses hasta 210 días. El control consistió en CE cultivados en medio II sin ABA o PEG, subcultivados de igual forma que los otros tratamientos.

Todos los reactivos empleados en la formulación de los macronutrientes, micronutrientes y componentes orgánicos, así como el 2,4-D y 6-BAP, fueron suplementados por Sigma®. Específicamente, el carbón activado lavado ácido (plant cell culture tested, C-6289), polietilenglicol (peso molecular 3 350, P4338) y el ácido abscísico (plant cell culture tested, A 1049).

Las variables medidas fueron: 1) Número de embriones somáticos por callo embriogénico; 2) Morfología de los embriones somáticos obtenidos; 3) Número de plántulas por CE. Las tres variables anteriores fueron evaluadas a los 30, 60, 90, 150 y 210 d después de haberse transferidos los CE a medio II, condiciones II, al inicio de los tratamientos; y 4) Supervivencia de plantas, evaluada después de un año de haber transferido las plántulas al nebulizador.

Histología

El procedimiento histológico fue realizado de acuerdo con Buffard-Morel *et al.* (1992), con ligeras modificaciones. Las muestras de tejido fueron fijadas en paraformaldehído 4 % en amortiguador de fosfatos (pH 7.2) por 24 h bajo presión negativa. Las muestras fueron deshidratadas con etanol a 30, 50, 70, 80, 90, 95 y 100 %, por 60 min cada una. Posteriormente se hizo la impregnación con resina JB-4 (Polyscience, EEUU). De

los tejidos impregnados en resina se hicieron cortes histológicos de 3 μm y éstos fueron teñidos con PAS-Naphtol blue black.

Aclimatación

Las plantas con un sistema radicular bien desarrollado (sin un tratamiento de enraizamiento) fueron transferidas al nebulizador en bolsas de polietileno con capacidad de 5 kg de un sustrato formado por suelo franco mezclado con arena en una relación 1:1. Para una mejor adaptación las plántulas fueron cubiertas con una bolsa transparente de polietileno durante 60 d. Las plantas fueron regadas cada 15 d.

Análisis estadístico

Este experimento se estableció bajo un diseño completamente al azar con arreglo factorial 4x4, más un testigo. Los resultados de las variables se sometieron a análisis de varianza (ANOVA) y a la prueba de comparación de medias conocida como Diferencia Mínima Significativa ($P \leq 0.05$). Cada tratamiento consistió en 10 callos embriogénicos replicado tres veces.

RESULTADOS

Número de embriones somáticos por callo embriogénico

Los callos embriogénicos fueron obtenidos en el medio I con condiciones I después de tres meses de cultivo. Su tamaño fue de 6 a 10 mm de largo y de 150 a 300 mg (Chan *et al.*, 1998; Sáenz *et al.*, 1999). En la periferia de los callos se forman los nódulos meristemáticos, que son estructuras translúcidas que darán origen a los embriones somáticos. Estos callos se subcultivaron en el medio II con condiciones II adicionado con ABA o PEG, o ambos.

Los resultados mostraron que, en general, el tratamiento control (sin ABA ni PEG) obtuvo su máxima formación de ES por CE a los 30 d (cerca de 5.2 ES/CE); esta respuesta se mantuvo hasta los 150 d (6.2 ES/CE), y después la respuesta disminuyó drásticamente en todos los casos (Cuadro 1). En los tratamientos donde sólo se agregó PEG al medio de cultivo, ninguna de las concentraciones probadas superó al control (Cuadro 1A). Por el contrario, todos los tratamientos con ABA mostraron una baja respuesta desde el principio del subcultivo; sin embargo, la formación de ES/CE se fue incrementando lentamente hasta alcanzar en todos los casos su mejor respuesta a los 150 d. En este sentido, por ejemplo, en el tratamiento con 22.5 μM de ABA + 15-30 g L^{-1} PEG se produjeron entre 8 y 9 ES/CE (Cuadro 1B); en 45 μM de ABA + 60 g L^{-1} PEG se alcanzaron a formar aproximadamente 8.7 ES/CE

Cuadro 1. Número de embriones somáticos/callos embriogénico durante 210 días de cultivo en presencia de: (A) PEG en 0, 15, 30 y 60 g L⁻¹, (B) 22.5 μM de ABA, (C) 45 μM de ABA y (D) 90 μM de ABA, con diferentes combinaciones de PEG por 30 días (n=3, donde cada repetición estuvo formada con 10 callos embriogénicos).

Tratamientos		Número de embriones somáticos por callos embriogénico					
ABA (μM)	PEG (g L ⁻¹)	Días de cultivo					
		0	30	60	90	150	210
(A)							
0	0	0	5.2 ± 0.7	5.4 ± 0.5	5.6 ± 0.5	6.2 ± 0.08	3.5 ± 0.5
0	15	0	3.5 ± 0.5	4 ± 0.3	4.5 ± 0.5	6.0 ± 0.4	2.4 ± 0.5
0	30	0	2.9 ± 0.4	3.1 ± 0.6	4 ± 0.5	4.5 ± 0.4	3.9 ± 0.8
0	60	0	2.7 ± 0.8	2.8 ± 0.6	3.7 ± 0.5	4 ± 0.4	1.9 ± 0.5
(B)							
0	0	0	5.2 ± 0.7	5.4 ± 0.5	5.6 ± 0.5	6.2 ± 0.08	3.5 ± 0.5
22.5	0	0	1.8 ± 0.6	3.5 ± 0.5	4.8 ± 0.5	7.1 ± 0.8	3.2 ± 0.5
22.5	15	0	1.3 ± 0.8	3.9 ± 0.6	5.6 ± 0.5	9.3 ± 0.8	4.5 ± 0.5
22.5	30	0	1.4 ± 0.5	4.3 ± 0.4	4.8 ± 0.6	9 ± 0.9	3.7 ± 0.5
22.5	60	0	0.9 ± 0.4	3 ± 0.6	3.3 ± 0.5	4.4 ± 0.2	1.9 ± 0.4
(C)							
0	0	0	5.2 ± 0.7	5.4 ± 0.5	5.6 ± 0.5	6.2 ± 0.08	3.5 ± 0.5
45	0	0	1.2 ± 0.6	3.8 ± 0.8	4.4 ± 0.5	5.9 ± 0.6	2.8 ± 0.5
45	15	0	1.5 ± 0.5	3.3 ± 0.6	3.7 ± 0.4	7.2 ± 0.6	4.3 ± 0.5
45	30	0	0.9 ± 0.5	4.1 ± 0.4	4.7 ± 0.3	7.2 ± 0.5	2.7 ± 0.4
45	60	0	0.5 ± 0.4	4.7 ± 0.8	4.7 ± 0.5	8.7 ± 0.6	4.1 ± 0.5
(D)							
0	0	0	5.2 ± 0.7	5.4 ± 0.5	5.6 ± 0.5	6.2 ± 0.08	3.5 ± 0.5
90	0	0	0.5 ± 0.6	3.9 ± 0.4	4.8 ± 0.4	9 ± 0.4	5.8 ± 0.6
90	15	0	1.2 ± 0.5	4.9 ± 0.8	6 ± 0.6	10.6 ± 0.4	6.3 ± 0.6
90	30	0	0.6 ± 0.4	3.3 ± 0.5	4.3 ± 0.4	8.3 ± 0.5	5.6 ± 0.5
90	60	0	0.5 ± 0.4	2.5 ± 0.6	3.7 ± 0.6	7.1 ± 0.5	4.5 ± 0.4

(Cuadro 1C), mientras que con 90 μM ABA + 15 g L⁻¹ PEG se formaron más de 10.6 ES/CE, lo que significó un incremento de 71 % en comparación con el control (Cuadro 1D).

Embriones somáticos a los 30 y 150 días

En la Figura 1 se presentan los resultados del número de ES tipo globular y torpedo a los 30 y 150 d. Durante los primeros 30 d de observación, el control presentó 5.2 ES/CE del tipo globular (Figura 1A), mientras que con PEG se observaron entre 2.4 y 3.5 ES. En todas las combinaciones ABA/PEG no se obtuvieron más de 2 ES, debido a que el proceso de la formación de ES se retardó en estos tratamientos, mientras que en el control no fue importante este incremento. La mayor formación de ES en todos los tratamientos se presentó a los 150 d de cultivo (Figura 1B), cuando se encontró el mayor número de ES tipo torpedo y más escaso el de los ES globulares, de los que sobresalen el tratamiento con ABA 90 μM + 15 g L⁻¹ PEG con 10.6 ES/CE y con más de 90 % del tipo torpedo.

Morfología de los ES obtenidos a los 30 y 150 días

En todos los tratamientos se encontraron diferentes estados de desarrollo en los embriones somáticos. Los ES observados se clasificaron de la siguiente forma: (a) Embriones globulares, que se observaron en pequeños grupos de color blanco translúcido, de 1 a 2 mm de largo (Figura 2A) y presentes desde los 30 a los 150 d en todos

los tratamientos. (b) Embriones tipo torpedo, que se caracterizan por ser alargados, con terminación en punta y ensanchados en la parte basal del ES, con color blanco translúcido o verde claro (dentro del contenedor); sin embargo, al manipularse *ex vitro* tienden a necrosarse, como ocurrió durante el proceso de toma de fotografías (Figura 2B); fueron visibles en mayor cantidad durante los 150 d (Figura 1B). Después de 150 d los embriones residuales se perdían al convertirse en estructuras tipo haustorio y con formación de raíces (Figura 2E).

No todos los embriones formados mostraron una conformación regular, particularmente en el estado torpedo. Algunos aparecieron fusionados, con un cuerpo más elongado o más corto de lo esperado (Figura 2F). Al mismo tiempo, las alteraciones morfológicas estuvieron acompañadas de cambios en el desarrollo interno, como se pudo observar en cortes histológicos de ES fusionados, donde estuvo ausente el meristemo apical (Figura 2G); estas alteraciones morfológicas e histológicas fueron más notorias en el tratamiento control que en aquéllos con ABA/PEG. Los ES cultivados en medio que contenía ABA 90 μM + PEG 15 g L⁻¹ estuvieron mejor formados y desarrollados (Figura 2H), y en el corte histológico fue posible observar el meristemo apical con sus primordios foliares (Figura 2I). Si bien los otros tratamientos que contenían ABA/PEG presentaron embriones somáticos bien desarrollados, el mejor tratamiento fue el de ABA 90 μM + PEG 15 g L⁻¹, aunque también en los tratamientos ABA/PEG hubo presencia de embriones anormales.

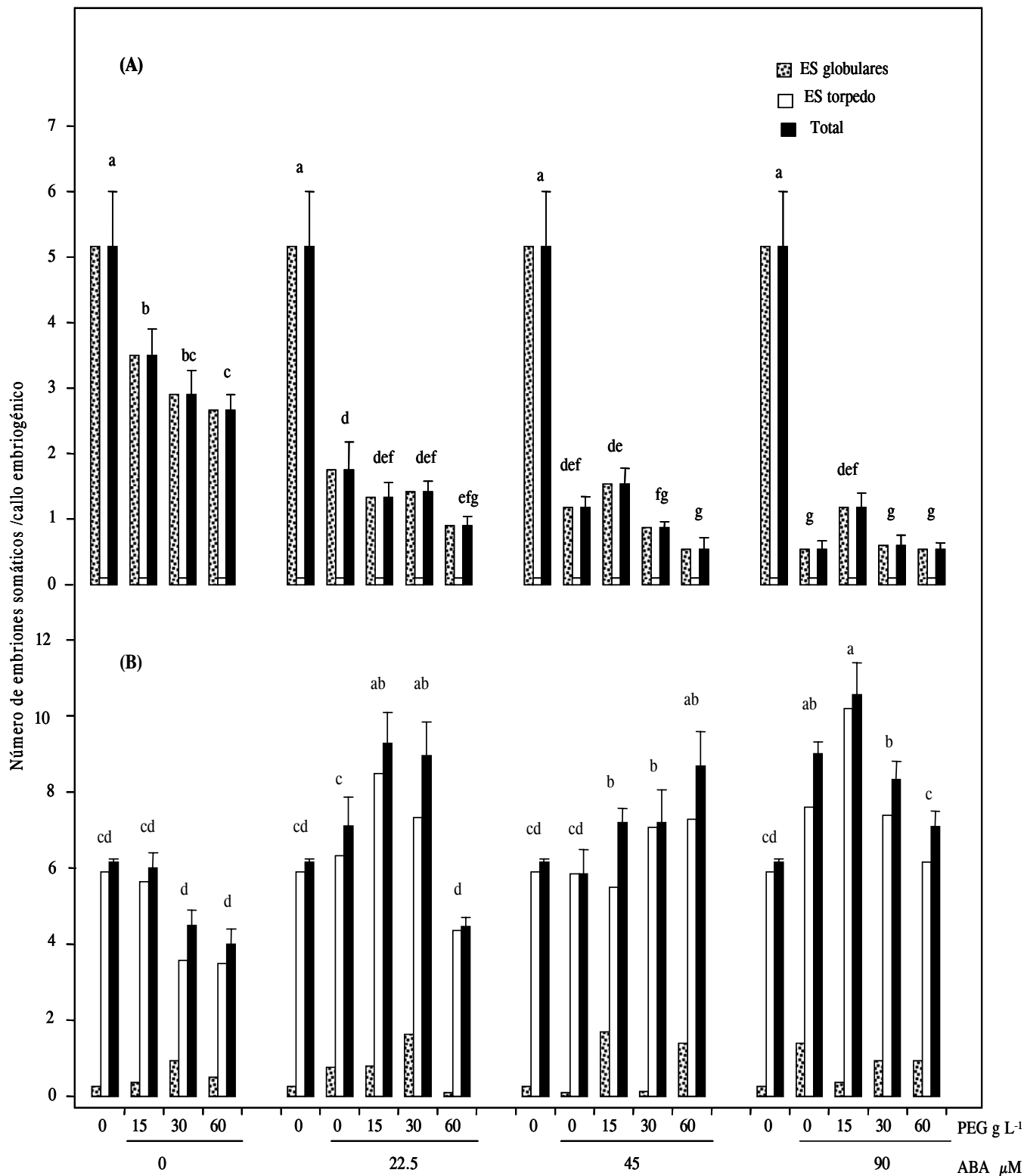


Figura 1. Embriones somáticos globulares y torpedo observados después de ser tratados con ácido abscísico (ABA) y polietilenglicol (PEG 3350) por 30 días con material Malayo Enano Verde. Los resultados corresponden a los 30 días (A) y 150 días (B) de cultivo (n=3, donde cada repetición estuvo formada con 10 callos embriogénicos). Medias con letras iguales no son estadísticamente diferentes (DMS, 0.05).

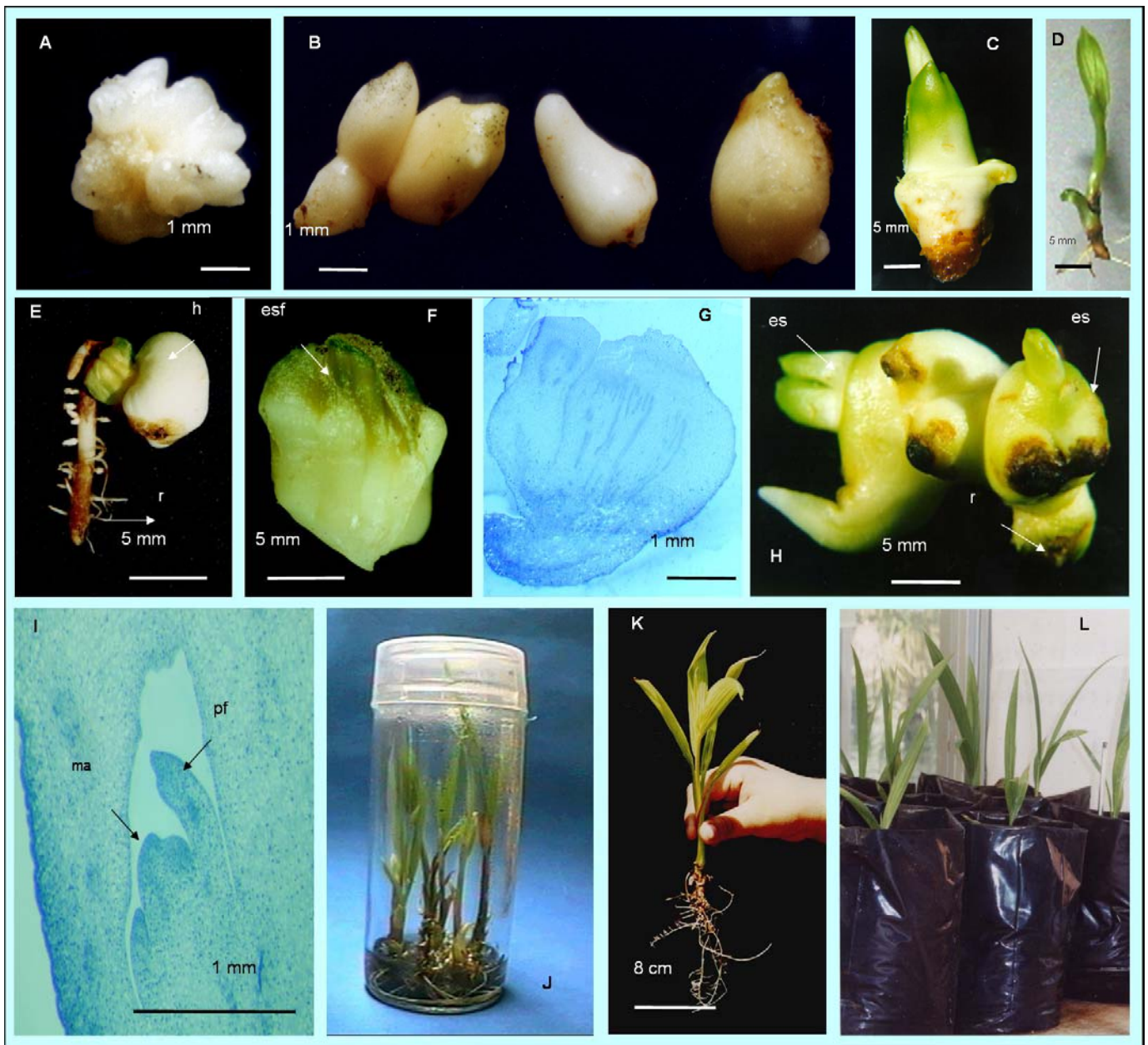


Figura 2. Embriones somáticos con diferente grado de diferenciación. Embriones globulares (A). Embriones tipo torpedo (B), Brote (C), Plántula (D). Embrión somático que presenta raíz (r) y tejido haustorial (h) en la superficie de los embriones somáticos (E). Grupo de embriones somáticos fusionados (esf) alargados y cortos observados en el tratamiento control (F). Corte histológico del tratamiento control, donde se observa un grupo de embriones somáticos fusionados (G). Embriones somáticos (es) desarrollados con raíz (r) en ácido abscísico 90 μM + 15 g L⁻¹ de polietilenglicol (H). Corte histológico de (H) donde se observa un embrión somático con sus primordios foliares (pf) y meristemo apical (ma) (I). Vitroplantas de cocotero después de 210 días de cultivo con ácido abscísico 90 μM + 15 g L⁻¹ de polietilenglicol (J). Planta retirada del medio de cultivo para su establecimiento ex vitro (K). Plantas adaptadas después de un año en condiciones de invernadero (L).

Posterior a los 150 d, los ES formaron brotes, con un promedio de 3 a 6 por CE con ES en todos los tratamientos (Figura 2C). Pero no todos los tratamientos formaron plántulas bien desarrolladas (Figura 2D).

Número de plántulas por CE

Para determinar el efecto de los tratamientos de ABA y PEG sobre la producción de plántulas, se procedió a

evaluar la formación de plántulas por callo embriogénico después de 210 d de cultivo en la Etapa II. Solamente se presentan resultados de los tratamientos: ABA 90 μM + PEG 15 g L⁻¹, ABA 90 μM , ABA 45 μM + PEG 60 g L⁻¹, ABA 22.5 μM + PEG 15 g L⁻¹ así como al control, debido a que los demás tratamientos formaron plántulas mal desarrolladas que carecían principalmente de sistema radicular o que forman tejido haustorial (Figura 2E). El control presentó menos de una plántula por CE (0.7). El

mejor tratamiento fue el de 90 μM de ABA + 15 g L^{-1} de PEG con 3 plántulas/CE (4 veces más que el control), seguidos por los tratamientos con 90 μM de ABA sin PEG (2.6 plántulas/CE), 45 μM ABA + 60 g L^{-1} de PEG (2.6 plántulas/CE), y 22.5 μM ABA + 15 g L^{-1} PEG (1.9 plántulas/CE) (Cuadro 2).

Cuadro 2. Número de plántulas observadas en los tratamientos que presentaron plántulas después de ser tratados con ácido abscísico (ABA) y polietilenglicol (PEG 3350) por 30 días con material Malayo Enano Verde Dzidzantun. Los resultados corresponden a 210 días de cultivo en etapa II ($n=3$, donde cada repetición estuvo formada con 10 callos embriogénicos).

Tratamientos		Número de plántulas por callo embriogénico
Acido abscísico (μM)	Polietilenglicol (g L^{-1})	
0	0	0.7 ± 0.18 c
22.5	15	1.9 ± 0.24 b
45	60	2.6 ± 0.47 a
90	0	2.6 ± 0.18 a
90	15	3.0 ± 0.16 a

Medias con letras iguales no son estadísticamente diferentes (DMS, 0.05).

Supervivencia de plantas

Por motivo de espacio en el nebulizador se escogieron las plantas obtenidas *in vitro* en los tratamientos control y 90 μM de ABA + 15 g L^{-1} de PEG, para evaluar la supervivencia (Figura 2J); las plántulas seleccionadas para ser establecidas *ex vitro* tenían 10 ± 2 cm de longitud del tallo hasta las hojas, con 4 ± 1 hojas, 5 ± 2 cm de longitud del sistema radicular, y generalmente 2 raíces (Figura 2K). Se estableció un lote de 30 plantas, de las cuales 10 correspondieron al control y 20 al tratamiento con ABA 90 μM + PEG 15 g L^{-1} . Después de un año en condiciones de invernadero las plántulas provenientes de estos tratamientos presentaron una supervivencia de 90 % (Figura 2L). Lo anterior indica que una vez que se forman plántulas bien desarrolladas, no hay efecto del tratamiento.

DISCUSIÓN

En el presente trabajo se muestran, en forma detallada, los resultados del efecto de ABA y PEG (aplicados solos o en combinación) sobre el número de ES/CE en cultivos *in vitro*, así como número de plántulas por tratamiento obtenidas de explantes de plúmula. Se ha reportado que la calidad de los ES se mejora cuando se agrega ABA al medio de cultivo, al incrementar la frecuencia de ES normales; por ejemplo, en 10^{-5} M *Hevea brasiliensis* aumentó el número de embriones globulares, corazón y torpedo en relación con el control (Veisseire *et al.*, 1994). En tres genotipos de pino Loblolly (*Pinus taeda* L.) el ABA (151.3 μM) y PEG 6000 (75 g L^{-1}) incrementaron el número de ES de los tipos cotiledonar y precotiledonar (Tang *et al.*, 2001).

Otros estudios sobre el efecto de ABA y PEG en cocotero se hicieron en secciones de embrión cigótico (Samosir *et al.*, 1999) y en embriones inmaduros (Fernando y Gamage, 2000). En estos estudios la respuesta de los callos se observaron a los 50 d de cultivo, mientras que en el presente trabajo se observaron a partir de los 90-150 d, periodo en el cual los tratamientos con ABA/PEG tuvieron mayor efecto en la formación de embriones. Además, en esos reportes sólo se presenta el porcentaje de formación de brotes por tratamientos, mientras que en este caso se llegó hasta la evaluación de plántulas bien desarrolladas *in vitro* por tratamiento, lo cual es importante ya que no todos los tratamientos las produjeron.

Los tratamientos con ABA, PEG o ambos estimularon la formación de ES por callo embriogénico formado en explantes de plúmula; también se observó mayor número de ES tipo torpedo, principalmente en presencia de 90 μM de ABA en combinación con diferentes concentraciones de PEG. En adición, estos tratamientos permitieron que los callos con embriones mostraran una consistencia más friable, lo que favorece la separación mecánica de los embriones de los callos.

Estudios previos con cultivos de tejidos de embriones cigóticos de cocotero demostraron que al combinar ABA (45 μM) y PEG (30 g L^{-1}) se podía obtener un incremento de ES en callos embriogénicos (Samosir *et al.*, 1999). Esta combinación produjo aproximadamente un número total de 42.6 ES nodulares y ovoides por contenedor, con 10 callos embriogénicos (Samosir *et al.*, 1999). De acuerdo con el sistema de Samosir *et al.* (1999) basado en secciones de embriones cigóticos tipo I y II para inducir la formación de CE, las secciones tipo I produjeron 60 % de CE mientras que en las secciones tipo II la producción fue de 16 % (Adkins *et al.*, 1999), por lo que con ambos tipos de explantes se obtuvo un total de 76.2 % de CE. Esto significa que por cada 100 embriones cigóticos se pueden obtener 76.2 CE, con 4.2 ES por cada CE cultivado por contenedor, pero si se estima la cantidad de ES por cada 100 embriones cigóticos, cada CE formaría 3.2 ES.

En los resultados aquí obtenidos con el cultivo de CE originados de plúmulas también se mejoró la formación de ES cuando se incluyeron ABA y PEG en forma combinada; con base en los a 10.6 ES obtenidos en este trabajo y al considerar que es posible obtener al menos 60 % de formación de CE con el protocolo de Chan *et al.* (1998), de cada 100 plúmulas cultivadas se pueden obtener entonces 5.2 ES, valor ligeramente superior al reportado por Samosir *et al.* (1999) en su sistema. En otro estudio con cultivo de embriones cigóticos inmaduros de cocotero se observó un efecto favorable con 5 μM de ABA al

obtener 61.4 % de embriogénesis somática, que permitió mejorar en 11.4 % la generación de brotes (Fernando y Gamage, 2000); sin embargo, estos autores no mencionan el número total de embriones somáticos por callo embriogénico generado a partir de los embriones cigóticos ni el total de plántulas bien formadas obtenidas, por lo que no existen elementos de comparación con el estudio realizado a partir de plúmula. En nuestro estudio, el porcentaje de formación de plántulas bien desarrolladas se incrementó en casi cuatro veces con respecto al control.

El mayor número de ES se formó durante un periodo de tiempo prolongado de 150 d, al considerar que previamente fueron inducidos los CE durante 90 d; entonces, el tiempo total que se requirió para obtener la mayor cantidad de embriones somáticos tipo torpedo fue de aproximadamente 240 d. Con el proceso de formación de un embrión cigótico maduro de una palma de cocotero, éstos tardan entre 420 a 480 d (Islas-Flores *et al.*, 1998), lo que significa un periodo de 180 a 240 d más prolongado que la formación de un embrión somático.

Un mayor número de plantas fueron obtenidas con el tratamiento ABA 90 μM + PEG 15 g L⁻¹, que además fueron aclimatadas exitosamente y continuaron su desarrollo después de un año, con una sobrevivencia de 90 % en invernadero. Samosir *et al.* (1999) y Fernando y Gamage (2000) no reportan datos respecto al número de plántulas obtenidas por CE, ni de la aclimatación de plantas vía embriogénesis somática en esta especie.

De acuerdo con el objetivo planteado y los resultados observados se puede mencionar que ABA y PEG favorecen la formación de ES en explantes de plúmula de cocotero, con el inconveniente que el periodo de regeneración de una planta puede ser muy prolongado. Esto pudo deberse a que solamente se evaluó su efecto en callos embriogénicos durante los primeros 30 d en las condiciones II, cuando se encuentran muy pocos ES en el CE. Además, sería conveniente evaluar PEG de mayor peso molecular, de más de 4 000, en combinación con ABA después de los 15 y 30 d del establecimiento de los callos embriogénicos en condiciones II, ya que existen diferencias en el efecto favorable del ABA para la formación de los ES, pues depende del estado de desarrollo en que se encuentren. Por ejemplo, los ES en zanahoria (*Daucus carota* L.) responden a esta fitohormona en el estado globular (Nickle y Yeung, 1994), mientras que en alfalfa (*Medicago sativa* L.) el estado óptimo para su aplicación es al principio del estado cotiledonar (Senaratna *et al.*, 1989).

CONCLUSIONES

El tratamiento de 90 μM de ABA + 15 g L⁻¹ de PEG favoreció la formación de embriones somáticos, así como la obtención de plántulas bien desarrolladas a partir de explantes de plúmula de cocotero. Dicha combinación permitió obtener 10.6 embriones somáticos a los 150 días y 3 plantas por callo embriogénico a los 210 días; además, los embriones somáticos estuvieron mejor formados y desarrollados en comparación con el control, en el que solamente se obtuvieron 6.2 embriones somáticos y se formaron 0.7 plantas por callo embriogénico. Las plantas obtenidas con el tratamiento de ABA + PEG antes mencionado y el control fueron aclimatadas y continuaron su desarrollo después de un año, con una supervivencia de 90 % en invernadero. Este tratamiento incrementó la formación de los embriones somáticos en 71 % y cuadruplicó la formación de plántulas, lo que mejora la eficiencia total del sistema, que eventualmente podría tener una aplicación práctica.

AGRADECIMIENTOS

A.A. agradece al CONACYT (Beca 119335) por el apoyo económico para su manutención. El presente artículo es parte de su tesis de doctorado. Este proyecto fue financiado por el CONACyT-SISIERRA (Proyecto número 990130).

BIBLIOGRAFÍA

- Adkins S W, Y M S Samoir, I D Godwin (1999) Control of environmental conditions and the use of polyamines can optimise the conditions for the initiation and proliferation of coconut (*Cocos nucifera* L.) somatic embryos. *In: Current Advances in Coconut Biotechnology*. C Oropeza, J-L Verdeil, G R Ashburner, R Cardeña, J M Santamaría (eds). Kluwer Academic Publishers, Netherlands. pp: 321-340.
- Attree S M, M K Pomeroy, L C Fowke (1995) Development of white spruce (*Picea glauca*, Moench. Voss) somatic embryos during culture with abscisic acid and osmoticum, and their tolerance to drying and frozen storage. *J. Exp. Bot.* 46: 433-439.
- Bornman C H (1993) Maturation of somatic embryos. *In: Synseeds: Application of Synthetic Seeds to Crop Improvement*. K Redenbaugh (ed). CRC. Boca Raton, Fl. pp: 105-113.
- Buffard-Morel J, J-L Verdeil, C Pannetier (1992) Embryogénèse somatique du cocotier (*Cocos nucifera* L.) à partir de tissus foliaires: étude histologique. *Can. J. Bot.* 70: 735-741.
- Chan J L, L Saénz, C Talavera, R Hornung, M Robert, C Oropeza (1998) Regeneration of coconut (*Cocos nucifera* L.) from plumule explants through somatic embryogenesis. *Plant Cell Rep.* 17: 515-521.
- Dunstan I, D Jin-Zhuo, D J Carrier, S R Abrams (1998) Events following ABA treatment of spruce somatic embryos. *In vitro Cell Develop. Biol. Plant.* 34: 159-168.
- Eeuwens C J (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*. *Physiol. Plant.* 36: 23-28.

- Fernando S C, C K A Gamage (2000)** Abscisic acid induced somatic embryogenesis in immature embryo explants of *Cocos nucifera* L. *Plant Sci.* 2000: 193-198.
- Gaspar T, T Kevers, C Penel, H Greppin, D M Reid, T Thorpe (1996)** Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture. *In vitro Cell. Develop. Biol. Plant.* 32: 272-289.
- Hornung R (1995)** Micropropagation of *Cocos nucifera* L. from plumular tissue excised from mature zygotic embryos. *Plantations, Recherche, Development* 2: 38-41.
- Islas-Flores I, C Oropeza, S M T Hernandez-Sotomayor (1998)** Protein phosphorylation during coconut (*Cocos nucifera* L.) zygotic embryo development. *Plant Physiol.* 118: 257-263.
- Nickle T C, E C Yeung (1994)** Further evidence of role for abscisic acid in conversion of somatic embryos of *Daucus carota*. *In vitro Cell. Develop. Biol. Plant* 30P: 96-103.
- Oropeza C (1998)** Amarillamiento letal del cocotero. *Investigación y Ciencia* 256: 30-33.
- Ryan A B, A M Castillo, M P Vallés, J M Sanz, L Cistué (1999)** Desiccated doubled-haploid embryos obtained from microspore culture of barley cv. Igri. *Plant Cell Rep.* 18: 924-928.
- Sáenz L, J L Chan, R Souza, R Hornung, R Rillo J-L Verdeil, C Oropeza (1999)** Somatic embryogenesis and regeneration in coconut from plumular explants. *In: Current Advances in Coconut Biotechnology.* C Oropeza, J-L Verdeil, G R Ashburner, R Cardeña, J M Santamaría (eds). Kluwer Academic Publishers, Netherlands. pp: 309-319.
- Samosir Y M S, I D Godwin, S W Adkins (1999)** The use of osmotically active agents and abscisic acid can optimise the maturation of coconut (*Cocos nucifera* L.) somatic embryos. *In: Current Advances in Coconut Biotechnology.* C Oropeza, J-L Verdeil, G R Ashburner, R Cardeña, J M Santamaría. (eds). Kluwer Academic Publishers, Netherlands. pp: 341-354.
- Senaratna T, B McKersie, S Bowley (1989)** Desiccation tolerance of alfalfa (*Medicago sativa* L.) somatic embryos. Influence of abscisic acid, stress pre-treatments and drying rates. *Plant Sci.* 65: 253-259.
- Takahata Y, D C W Brown, W A N Kaitzuma (1993)** Dry artificial seeds and desiccation-tolerance induction in microspora-derived embryos of broccoli. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 35: 121-129.
- Tang W, Z Guo, F Ouyang (2001)** Plant regeneration from embryogenic cultures initiated from mature Loblolly pine zygotic embryos. *In vitro Cell. Develop. Biol. Plant* 37: 558-563.
- Veisseire P, L Linossier, A Coudret (1994)** Effect of abscisic acid and cytokinins on the development of somatic embryos in *Hevea brasiliensis*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 39: 219-223.
- Verdeil J-L, J Buffard-Morel (1995)** Somatic embryogenesis in coconut (*Cocos nucifera* L.). *In: Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol. 30, Somatic Embryogenesis and Synthetic Seed I.* Y P S Bajaj (ed). Springer-Verlag, Berlin Heidelberg. pp: 299-317.
- Verdeil J-L, C Huet, F Grosdemange, J Buffard-Morel (1994)** Plant regeneration from cultured immature inflorescence of coconut (*Cocos nucifera* L.): evidence for somatic embryogenesis. *Plant Cell Rep.* 13: 218-221.