

## INFLUENCIA DE LA SUBDIVISIÓN DEL CALLO EMBRIOGÉNICO EN LA FORMACIÓN DE EMBRIONES SOMÁTICOS DE COCOTERO\*

### INFLUENCE OF EMBRYOGENIC CALLUS SUBDIVISION ON COCONUT SOMATIC EMBRYO FORMATION

Alfonso Azpeitia Morales<sup>1§</sup>, José Luis Chan<sup>2</sup>, Luis Sáenz Carbonell<sup>2</sup> y Carlos Oropeza Salin<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Programa de Biotecnología, Campo Experimental Huimanguillo, INIFAP. Km 1, carretera Huimanguillo-Cárdenas, A. P. Núm. 17, C. P. 86400. Tel. 01 917 3750396 Huimanguillo, Tabasco. <sup>2</sup>Unidad de Biotecnología, Centro de Investigación Científica de Yucatán, CICY. Calle 43 No. 130 Col. Chuburna de Hidalgo, C. P. 97200 Mérida, Yucatán. (chanro@cicy.mx), (vyca@cicy.mx), (cos@cicy.mx). Tel. 01 999 9813966. <sup>§</sup>Autor para correspondencia: azpeitia.alfonso@inifap.gob.mx.

#### RESUMEN

El presente estudio tuvo como objetivo determinar la influencia de la subdivisión del callo embriogénico primario de cocotero en la formación de embriones somáticos. El estudio se llevó a cabo en el laboratorio de biotecnología del Centro de Investigaciones Científicas (CICY-Yucatán), México. Se utilizaron callos embriogénicos de tres meses de cultivo procedentes del cultivo de plúmulas en condiciones de obscuridad por tres meses del genotipo de cocotero Enano Malayo Verde, cultivados previamente en un medio Y3 y adicionado con 0.55 mM de 2,4-D. Los resultados permitieron observar que con callos embriogénicos subdivididos en cuatro partes se incrementa en 3.36 veces el número de embriones somáticos tipo torpedo con respecto al control en los primeros 15 días de cultivo. En un segundo ensayo en el que se utilizó mayor número de muestras la respuesta fue similar, aunque en menor cantidad (2.7 veces) y el peso fresco se incrementó 2.36 veces en subdivisiones de callo embriogénico cultivadas sin fitohormonas, con respecto al control con fitohormonas durante los primeros 15 días de cultivo en condiciones de luminosidad. Los resultados obtenidos son prometedores y establecen las bases para incrementar el número de embriones somáticos

y eventualmente la multiplicación de callos embriogénicos en cocotero, lo cual podrá facilitar la propagación a gran escala de palmas híbridas o palmas élite.

**Palabras clave:** *Cocos mucifera* L., embriogénesis somática, subdivisión de callo.

#### ABSTRACT

The objective of this study was to determine the influence of primary embryogenic callus subdivision on the formation of somatic embryos. The research was carried out at the biotechnology laboratory of the Centro de Investigación Científica de Yucatán, Mexico. Three months old embryogenic callus from plumules cultivated during three months under dark conditions in Y3 medium added with 0.55 mM of 2,4-D of the cultivar Enano Malayo Verde, were used. The subdivision in four parts of the embryogenic callus showed after fifteen days in culture a 3.36 times increase in the number of torpedo type somatic embryos compared to the control. In a second experiment, using a

\* Recibido: Febrero, 2008  
Aceptado: Marzo, 2009

larger number of samples, the results were similar although in smaller amount (2.7 times more somatic embryos) and 2.36 times increase in fresh weight with the subdivision of callus cultured without phytohormones in relation to the control with phytohormones after fifteen days under light culture conditions. These results are promising and could be useful to increase the number of somatic embryos and eventually facilitate large-scale propagation of hybrids or elite coconut palms.

**Key words:** *Cocos mucifera* L., somatic embryogenesis, callus subdivision.

## INTRODUCCIÓN

En los últimos años la demanda de palmas de cocotero resistentes a enfermedades se ha incrementado en México, debido a que las plantas de grandes superficies están siendo afectadas y devastadas principalmente por la enfermedad conocida como “amarillamiento letal”. Esta enfermedad ha ocasionado la desaparición de aproximadamente 15 mil ha en la península de Yucatán y su avance continúa hacia los estados del Golfo de México (Tabasco y Veracruz) y del Pacífico (Chiapas, Oaxaca, Guerrero). Aunado a este problema el 80% de las plantaciones son improductivas porque rebasan los 40 años de establecidas (Piña, 1998), por lo que es necesario establecer nuevas plantaciones para lo cual se requiere producir alrededor de 50 millones de nueces de cocotero para propagar 32 millones 200 mil palmas. La escasez de material, hace necesario contar con un método de multiplicación masiva de palmas seleccionadas o mejoradas, lo cual podría efectuarse a través de la micropropagación.

Desde los años setenta se han realizado intentos para clonar *in vitro* el cocotero, en ellos se han evaluado diferentes tipos de explantes: hojas inmaduras, raíces, embriones e inflorescencias inmaduras con diferentes grados de éxito, siendo posible la inducción de la embriogénesis y regeneración a partir de inflorescencias inmaduras (Verdeil y Buffard-Morel, 1995) y de plúmula (Hornung, 1995; Oropeza y Chan, 1995).

Con la finalidad de mejorar la eficiencia en el proceso de propagación *in vitro* de esta especie se han realizado estudios sobre diferentes aspectos que incluyen: la asimilación de nutrimentos en callos de cocotero (Dussert *et al.*, 1995; Magnaval *et al.*, 1997), estudios sobre condiciones de cultivo (Chan *et al.*, 1998), evaluación de los cambios en los niveles

del 2,4-D en el medio de cultivo en presencia de carbón activado y la respuesta en el crecimiento en explantes de inflorescencias (Ebert y Taylor, 1990). Recientemente, se ha demostrado que la respuesta embriogénica en cocotero varía con el uso de diferentes fuentes de carbón activado (Herrera, 2002).

En el caso particular de plúmula es posible obtener embriones somáticos y regeneración de plantas en forma reproducible y con una eficiencia mayor a la alcanzada con otros tipos de explantes (Chan *et al.*, 1998), pero su magnitud es todavía baja en relación a lo necesario para una aplicación práctica. En general, la baja capacidad embriogénica de esta especie se ha asociado a diversas causas: intenso necrosamiento del tejido, heterogeneidad en la respuesta, fuerte capacidad de enraizamiento, alta formación de tejido tipo haustorial (Verdeil y Buffard Morel, 1995), así como la formación anormal de embriones somáticos (ES). De acuerdo a Blake (1990), las anomalías en el desarrollo de los ES, son provocados probablemente por niveles sub óptimos o supra óptimos de las auxinas y/o citocininas.

El cocotero es una especie recalcitrante debido a que presenta una baja capacidad embriogénica atribuida a diversas causas. En esta especie, la formación de embriones somáticos a partir de callos embriogénicos (CE) ocurre cuando el callo es cultivado íntegramente sin sufrir fragmentación o división. Los ES crecen fusionados y su desarrollo no es sincronizado, lo que limita la individualización de éstos así como su desarrollo independiente hasta la formación de una planta completa. Una práctica común en algunas especies como *Begonia*, *Saintpaulia* y *Streptocarpus* es la de causar heridas en la superficie de las hojas o éstas son cortadas en pequeñas piezas, conduciendo a un significativo incremento de brotes adventicios (George, 1993). Los embriones cigóticos de zanahoria inducen a la formación de ES cuando se les causa una herida y son cultivados en un medio libre de fitohormonas (Smith y Krikorian, 1989). Una observación similar fue hecha en *Dysosma pleiantha* por Meng-Jin y Wei-Chin (1987), quienes a partir de embriones cigóticos heridos, indujeron callos embriogénicos mientras que los embriones intactos no respondieron.

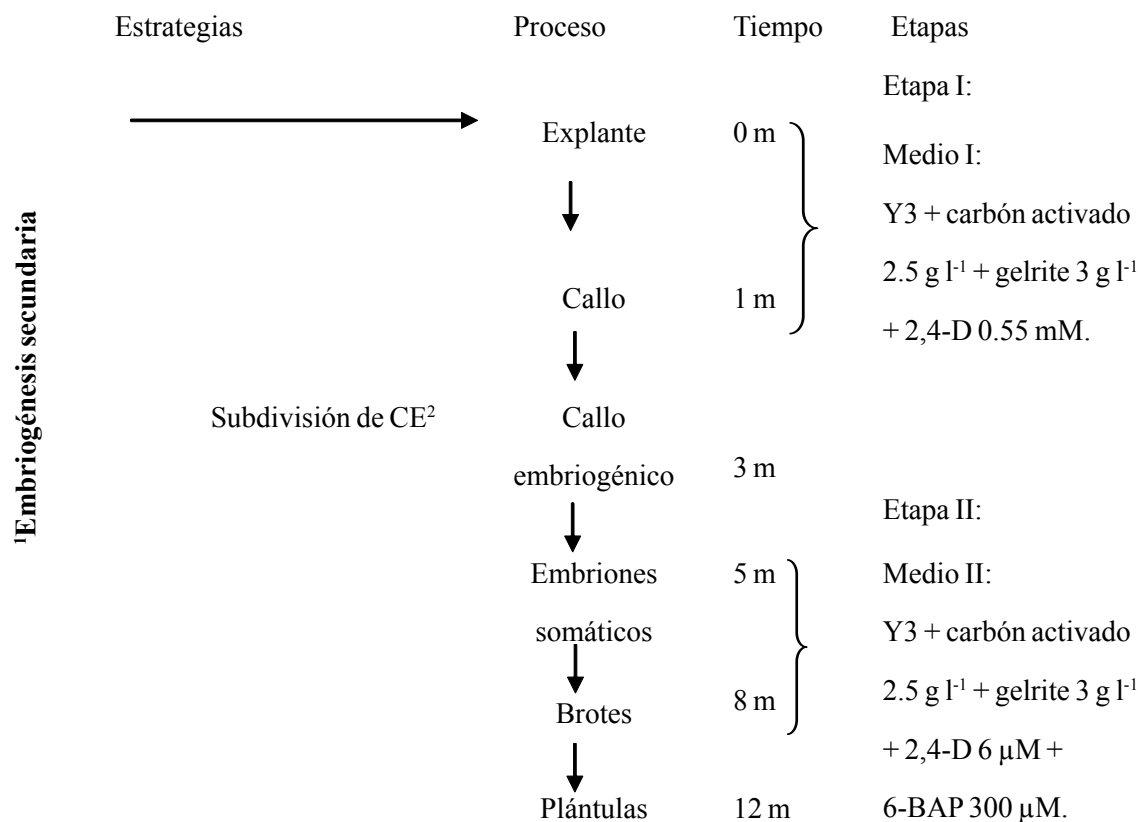
En el protocolo de embriogénesis somática a partir de plúmula es de uso común la auxina 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y la citocinina bencil aminopurina (BAP) en fase de inducción de callo embriogénico y en la formación de embriones somáticos (100 veces menor cantidad) (Chan *et al.*, 1998). No obstante, probablemente la utilización del

2,4-D en esta segunda fase no sea necesaria, dado que puede ejercer un efecto negativo en la embriogénesis somática. En zanahoria por ejemplo, el proceso de ES se inhibe cuando se adiciona 2,4-D después del estado de corazón por lo que los embriones somáticos se deforman. Se postula que la adición de la auxina al medio de cultivo interrumpe el gradiente endógeno adquirido en el embrión y por dicha razón se inhibe su desarrollo (Kawahara y Komamine, 1995). La regeneración *in vitro* de cocotero es un proceso relativamente largo, además de que la producción de ES es baja, por lo anterior el objetivo de la presente investigación fue determinar la influencia de la subdivisión de callos embriogénicos en la formación de embriones somáticos,

así como determinar si la adición de las fitohormonas 2,4-D y la citocinina BAP favorecen la formación de embriones somáticos.

MATERIALES Y MÉTODOS

**Material vegetal.** En este estudio se utilizaron callos embriogénicos de tres meses de cultivo procedentes del cultivo de plúmulas en condiciones de obscuridad por tres meses del genotipo de cocotero Enano Malayo Verde (EMV), cultivados previamente en un medio Y3 (Eeuwens, 1976) adicionado con 0.55 mM de 2,4-D (Figura 1).



<sup>1</sup>Estrategia en desarrollo por el grupo de cocotero en el CICY; <sup>2</sup>estrategias utilizada en esta investigación.

**Figura 1. Estrategia utilizada para incrementar la eficiencia de regeneración de cocotero *in vitro* mediante embriogénesis somática.**

**Condiciones de cultivo.** Se utilizaron dos condiciones de cultivo: a) cultivo de callos embriogénicos (CE) con un peso de entre 0.1 y 0.14 g, y b) de los CE se realizaron subdivisiones (SCE) con ayuda de un bisturí con porciones de un peso de entre 0.1 y 0.14 g. Para determinar el número de subdivisiones adecuado para la formación de embriones somáticos se estableció un experimento, con cuatro tratamientos: 1) cultivo de CE (Control), 2) subdivisión del CE en 2 secciones (SCE), 3) CE subdividido en 4 SCE, y 4) CE subdividido en 8 SCE; y todos cultivados en un frasco de cultivo, con cinco repeticiones por tratamiento. Este experimento se desarrolló en etapa II, utilizando un medio Y3 con 2,4-D (6  $\mu$ M) y BAP (300  $\mu$ M), así como condiciones II: fotoperíodo de 16 h de iluminación (45-60  $\mu$ mol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> PPFD)/ 8 h de oscuridad a 27  $\pm$  2 °C y subcultivo cada dos meses (Figura 1). En un segundo experimento se utilizó el mejor tratamiento anterior e incluyó las fitohormonas 2,4-D y BAP y un control, sin fitohormonas, los cuatro tratamientos fueron: a) callo embriogénico + fitohormonas (CE+F) como testigo, b) callo embriogénico sin fitohormonas (CE-F), y c) CE subdividido en 4 SCE + F y d) CE subdividido en 4 SCE-F. Se utilizaron cuatro repeticiones con 10 frascos de cultivo. Los cultivos se establecieron en etapa II en un medio de acuerdo a Chan *et al.* (1998) conteniendo las fitohormonas 2,4-D (6  $\mu$ M) y BAP (300  $\mu$ M) y un testigo sin estas (Figura 1). Las variables a medir fueron: a) número de embriones somáticos, y b) peso fresco. En ambos experimentos las variables se registraron a los 15 y 30 días de cultivo.

**Histología.** El procedimiento histológico fue realizado de acuerdo a Buffard Morel *et al.* (1992), con modificaciones. Las muestras de tejido fueron fijadas en paraformaldehído 4% en buffer fosfato (pH 7.2) por 24 h bajo presión

negativa. Las muestras fueron deshidratadas con etanol al 30, 50, 70, 80, 90, 95 y 100% durante 60 min cada una. Posteriormente se realizó la impregnación con resina JB-4 (Polyscience, USA). De los tejidos impregnados en resina se hicieron cortes histológicos de 3 micras y fueron teñidos con PAS-Naphtol blue black.

**Análisis estadístico.** Los experimentos se establecieron bajo un diseño experimental completamente al azar con un arreglo factorial y los resultados de las variables se sometieron a análisis de varianza (ANAVA) y la prueba de medias diferencia mínima significativa ( $p < 0.05$ ) para diferenciar los tratamientos, para lo cual se utilizó el paquete de diseños experimentales FEUANL, versión 2.5 (Olivares, 1994).

## RESULTADO Y DISCUSIÓN

**Influencia del número de subdivisiones en la formación de embriones somáticos.** En el análisis de varianza se observó significancia entre tratamientos. El análisis realizado para el factor A formado por 15 y 30 días se encontraron diferencias estadísticas (DMS  $p < 0.05 = 1.19$ ) entre períodos, siendo superior 15 días, con valor promedio de 8.48 ES contra 6.40 ES a 30 días. En cuanto al factor B correspondiente al número de subdivisiones de callo embriogénico, se observó que el mayor número de ES se obtuvo con el tratamiento con cuatro subdivisiones de callo embriogénico (SCE)/frasco con 13.58 ES tipo torpedo, mientras que con 2 y 8 SCE el número de ES fue de 7.16 y 5.01 respectivamente. El número de ES en SCE fue mayor a los observados en el tratamiento control, en el cual solamente se presentaron 4.01 ES del tipo globular principalmente (Cuadro 1).

**Cuadro 1. Número de embriones somáticos observados en función del número de veces que el callo embriogénico fue subdividido a los 15 y 30 días de cultivo (n= 5, cada repetición se estableció con cinco callos embriogénicos).**

Factor A (días de cultivo)	Factor B (núm. de subdivisiones)			
	Control	2	4	8
15	4.56	8.0	15.66	8.48
30	3.46	6.33	11.50	6.40
Valor promedio	4.01 c	7.16 b	13.58 a	5.01 c

Los valores con la misma letra son iguales estadísticamente, DMS  $p < 0.05 = 1.69$ .

En todos los tratamientos se observó a los 30 días una pérdida de ES ocasionada principalmente por una fuerte desdiferenciación del tejido embriogénico; sin embargo, durante este período de cultivo, se continuó observando un efecto favorable cuando el CE es subdividido respecto al control, sobresaliendo con 11 ES el tratamiento con 4 SCE por frasco, mientras que el control solamente presento 3.8 ES por CE. La interacción de ambos factores no fue estadísticamente significativa.

De acuerdo con Chan *et al.* (1998) la formación de embriones somáticos generados a partir de plúmula parte de la formación de callos iniciales que conducen a la formación de callos embriogénicos, estos CE pueden ser cultivados íntegramente sin sufrir fragmentación o división posterior. Los ES crecen

fusionados y su desarrollo no es sincronizado, lo cual limita su individualización, así como su desarrollo independiente hasta la formación de una planta completa, por lo que se decidió evaluar la posibilidad de que al subdividir callos embriogénicos (CE) se pudiera promover la formación de embriones somáticos (ES), tomando en cuenta el aumento de la superficie en contacto con el medio de cultivo. Los resultados permitieron observar que cuando un callo embriogénico es subdividido en 4 partes, el número de ES fue favorecido y se incrementó en 3.36 veces con respecto al control en los primeros 15 días de cultivo (Figura 1) y cuando este ensayo se efectuó de nuevo con mayor número de repeticiones, la respuesta fue similar aunque en una cantidad menor, obteniendo 2.7 veces más ES y 2.36 veces su peso fresco en SCE -F con respecto al control (CE +F) durante los primeros 15 días en condiciones II (Cuadro 2).

**Cuadro 2. Número de embriones somáticos por callo embriogénico a los 15 y 30 días en cultivo en condiciones II n= 4, donde cada repetición se estableció con 40 callos embriogénicos y CE subdividido.**

Factor A (días de cultivo)	Factor B			
	Control CE+F	Control CE -F	SCE +F	SCE -F
15	4.0	6.50	9.0	12.35
30	3.70	5.80	8.80	9.90
Valor promedio	3.85 d	6.15 c	8.90 b	11.12 z

Factor B= callos embriogénicos en medio de cultivo con fitohormonas; CE +F= desprovisto de éstas; CE-F= subdivisiones de callo embriogénico; SCE= en medio con fitohormonas; +F= sin fitohormonas; -F. Valores con la misma letra son estadísticamente iguales DMS  $p<0.05=2.0$ .

**Cultivo de callos embriogénicos y subdivisión de callos embriogénicos en un medio con y sin fitohormonas 2,4-D (6 µM) y BAP (300 µM)**

**Número de embriones somáticos.** El análisis de varianza mostró significancia en los tratamientos y en la prueba de comparación de medias DMS ( $p<0.05$ ) para el factor A correspondiente a los 15 y 30 días, éstos fueron iguales estadísticamente con 7.96 ES a los 15 días, mientras que el valor promedio a los 30 días fue de 7.0 (DMS  $p<0.05=2.30$ ). En cuanto al factor B correspondiente al número de subdivisiones de callo embriogénico se encontraron diferencias estadísticas entre tratamientos. El mayor número de ES se observó en los tratamientos con subdivisiones de callo embriogénico con fitohormonas (SCE +F) y subdivisiones de callo embriogénico sin fitohormonas (SCE -F) presentando mayor número de ES (12.35 ES) en comparación a los controles (CE +F y CE -F). Sin embargo,

es importante señalar que cuando los CE y las SCE son cultivados en un medio desprovisto de fitohormonas fue mayor el número de ES (Cuadro 2).

Durante los 15 días de cultivo se presentó mayor número de ES en todos los tratamientos, sobresalió el tratamiento con SCE -F con 12.35 ES que en su mayoría fueron del tipo torpedo (EST); con 9.0 ES en el SCE +F y 6.50 ES en el tratamiento control -F, mientras que el control con fitohormonas (CE +F) se observaron 4.0 ES del tipo globular y muy pocos EST. A los 30 días se observó una disminución de ES en todos los tratamientos, siendo sobresaliente el SCE -F con 9.90 ES, superior al control (CE +F) que indujo 3.70 ES (Cuadro 2). En la interacción de ambos factores, no se observó significancia estadística.

**Peso fresco.** El análisis de varianza para esta variable fue significativo y en la prueba de comparación de medias

DMS ( $p<0.05$ ) se encontraron diferencias entre tratamientos. El factor A (días de cultivo) fue superior a los 30 días con un incremento de 0.62 g contra 0.26 g a los 15 días. Los tratamiento con SCE con + F y - F presentaron mayor peso fresco y fueron iguales estadísticamente y superiores a los tratamientos con

CE + F y - F (Cuadro 3). Se observó un incremento en 10 veces su peso fresco inicial en el tratamiento con SCE -F y un incremento de 2.36 veces respecto al control (CE + F, a los 30 días). La interacción entre los factores A (días de cultivo) y B (CE o SCE con o sin fitohormonas) no mostró significancia.

**Cuadro 3. Peso fresco en los tratamientos con cultivo de callos embriogénicos (CE) y subdivisiones de callo embriogénico (SCE) en medio conteniendo fitohormonas (+F) y sin fitohormonas (-F) a los 15 y 30 días de cultivo (n= 4, cada repetición se formó con 4 CE y CE subdividido).**

Factor A (días de cultivo)	Factor B			
	Control CE+F	Control CE -F	SCE +F	SCE -F
15	0.18	0.16	0.30	0.40
30	0.39	0.40	0.80	0.90
Valor promedio	0.28 b	0.28 b	0.55 a	0.65 a

Factor B= callos embriogénicos en medio de cultivo con fitohormonas; CE + F= sin ellas; CE - F= subdivisiones de callo embriogénico; SCE= en medio con fitohormonas; +F= sin -F. Valores con la misma letra son iguales estadísticamente (DMS 0.05).

Con la inclusión o exclusión de las fitohormonas en etapa II, se observó que no es necesario incluir las fitohormonas 2,4-D (6 µM) y BAP (300 µM) durante los primeros 30 días de cultivo como fue reportado por Chan *et al.* (1998); sin embargo, Chan (com. pers.) mencionó que es más conveniente incluirlas debido a que su exclusión tiende a afectar el proceso de germinación.

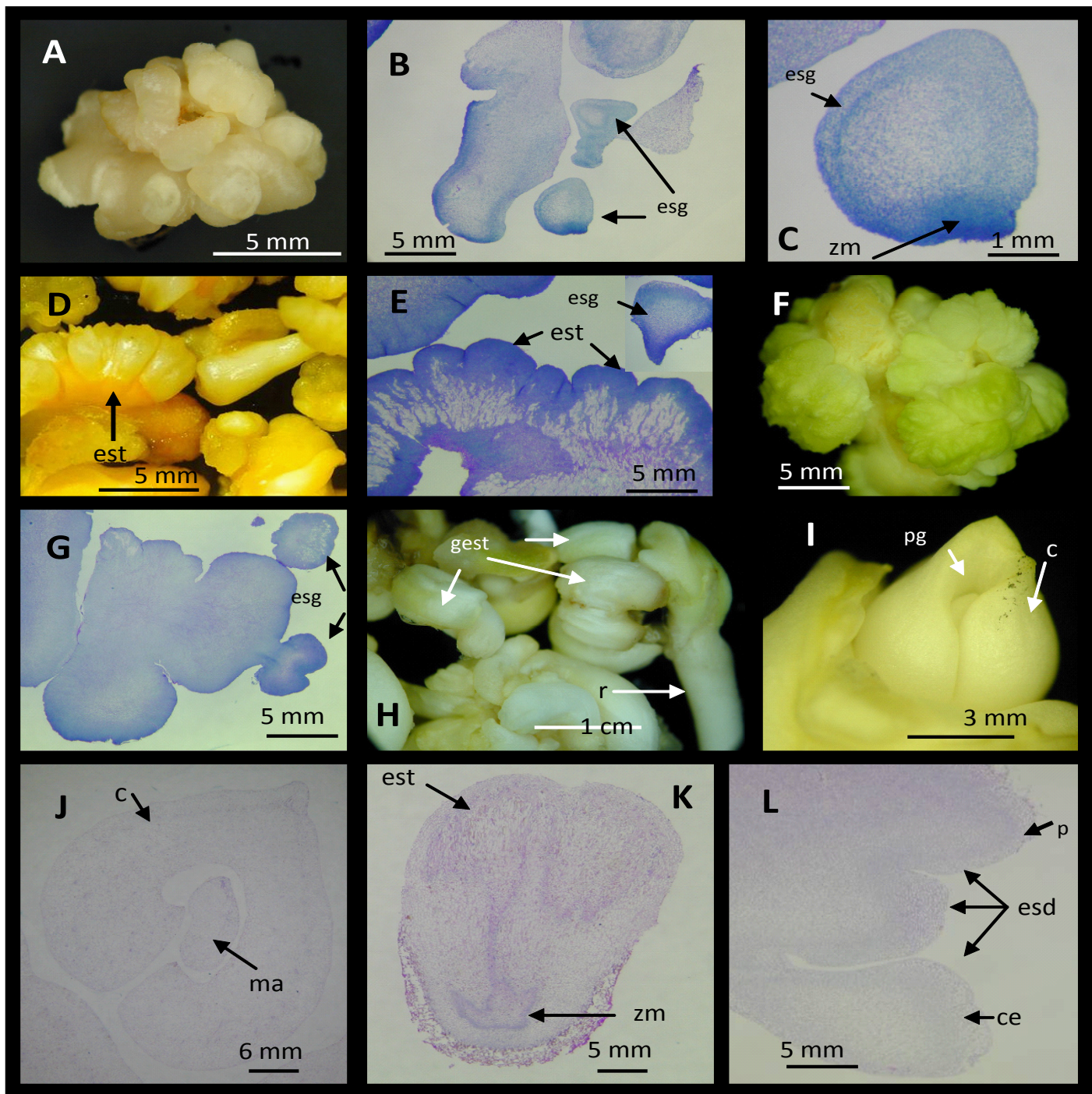
Se ha propuesto que la inducción de heridas puede incrementar principalmente la formación de fitohormonas, mayor accesibilidad de nutrimentos así como la promoción de la división celular (Mariotti y Arcioni, 1983; Park y Son, 1988; Ambrozic-Dolinsek *et al.*, 2001). Es importante mencionar que los CE así como las SCE mostraron diferencias en la formación de ES. Los CE hasta los 30 días presentaron ES tipo globular y esporádicamente los ES tipo torpedo, mientras que al utilizar SCE a los 15 y 30 días se observaron ES tipo torpedo y mayor sincronización entre ellos, además se observó un desarrollo y diferenciación más acelerado con respecto al CE. La SCE también estimuló una mayor ganancia en peso fresco, lo cual puede deberse a que la herida estimula la división celular (Mariotti y Arcioni, 1983) y una mayor síntesis endógena de fitohormonas en el explante (Park y Son, 1988). Asimismo, se ha reportado que la inducción de heridas en un tejido vegetal pueden estimular la organogénesis en condiciones *in vitro* (Ambrozic-Dolinsek *et al.*, 2001); por ejemplo, cuando las hojas de *Platycerium bifurcatum* son heridas se

incrementa significativamente el potencial de formación de gametofitos en comparación con hojas intactas. Los gametofitos se originaron de áreas entre las heridas (Ambrozic-Dolinsek *et al.*, 2001). Los autores mencionan que la síntesis o un cambio en el sitio de localización de síntesis de las fitohormonas dentro de la hoja herida podrían contribuir a la inducción de los gametofitos.

Por otra parte en cotiledones de *Pyrus malus* previamente seccionados a la mitad, en la región del corte se formó callo que dio origen a múltiples brotes adventicios (Browning *et al.*, 1987), mientras que lo mismo no ocurrió con los callos embriogénicos subdivididos de cocotero. En las partes del corte del callo embriogénico no se observaron formaciones de embriones somáticos, estos ES se formaron en la periferia de las subdivisiones de los callos embriogénicos, zonas donde se forman normalmente aun sin realizar subdivisiones.

El aumento de ES en SCE cultivados en medio sólido, puede estar asociado a un mayor contacto con el medio de cultivo, dado que existe una mayor entrada de nutrimentos a las subdivisiones del CE. En trébol (*Lotus corniculatus* L.) se ha reportado que cuando un callo embriogénico es homogeneizado (macerado) se incrementan los embriones globulares en comparación con callos no homogeneizados (Orshinsky *et al.*, 1983), por lo que se presume un aumento del contacto de las células maceradas con el medio de cultivo.





**Figura 2.** Formación de embriones somáticos (ES) a los 15 y 30 días de cultivo en callos embriogénicos (CE) y en subdivisiones de callos embriogénicos (SCE). En A se presenta un CE a los 15 días de cultivo e histología del CE en B, observándose ES globulares (esg) y en C una zona meristemática (zm) de un ES donde se origina la raíz. En D se muestra un grupo de ES torpedo (est) originados de SCE a los 15 días de cultivo, los cuales se observan sincronizados y en el corte histológico se observan ES tipo torpedo (est) elongados y fusionados (E) así como ES globulares (esg) observados en menor cantidad. En F se muestra el CE a los 30 días de cultivo y en G el corte histológico mostrando ES globulares (esg). En H se presentan grupos de ES tipo torpedo en SCE a los 30 días de cultivo. En algunos casos fue visible la raíz (r), un poro germinativo (pg) y coleóptilo (c) (I). En J se observa un corte histológico de un ES con meristemo apical (ma). En la Figura K se muestra un corte histológico de un ES tipo torpedo (est) a los 30 días, observándose solamente la zm donde se origina la raíz. Por último en L se presenta un grupo de ES en dediferenciación (esd) y una zona de células formando protodermis (p) en la superficie de los ES. L muestra el desarrollo anormal de éstos.

## Evaluación histológica y morfológica de los callos embriogénicos y subdivisiones

**Observaciones a los 15 días de cultivo.** Los callos embriogénicos mostraron sobre su superficie embriones somáticos del tipo globular (sólo visibles bajo microscópico estereoscópico) y en los cortes histológicos se observaron embriones somáticos en formación y del tipo globular (esg) sin presentarse el meristemo apical, pero si se observó una zona meristemática (zm) donde se origina la raíz (Figura 2 A, B y C). En cuanto a las subdivisiones de callo embriogénico (SCE) se observaron secciones con ES con un estado de desarrollo sincronizado con ES tipo torpedo (est) como se puede observar en la Figura 2D, estos ES fueron visibles a simple vista; sin embargo, los cortes histológicos mostraron formación de ES fusionados en desarrollo y también del tipo globular (Figuras 2 E). Durante este período de cultivo no fue visible el meristemo apical en los cortes histológicos de los ES originados de las SCE.

**Observaciones a los 30 días de cultivo.** Durante este período de cultivo los CE se tornaron de color verde claro (Figura 2F) y no se observaron embriones tipo torpedo, pero si un crecimiento de tejido haustorial. En los cortes histológicos se observaron pocos ES globulares (Figura 2G) y tejido desdiferenciado conocido generalmente como haustorio con ES fusionados y poco definidos. Además, es importante mencionar que fue raro observar embriones somáticos tipo torpedo. En cuanto a las SCE, éstas presentaron grupos de ES tipo torpedo, con aparente buena conformación (Figura 2H) con color blanco y en pocos casos con sistema radicular (r). En algunos casos se encontraron ES con poro germinativo (Figura 2 I y J) observándose un coleóptilo (c) protegiendo al meristemo apical (ma). La mayor parte de los ES fueron bien definidos sin observarse el meristemo apical (Figuras 2 K), solamente fue posible observar una zona meristemática donde se origina la raíz. Además, los cortes histológicos también mostraron grupos de ES fusionados (Figura 2 L) con una capa de células bien definida formando protodermis en la periferia, zona donde se observó tejido haustorial por lo que estas células localizadas en esta zona dan origen a este tipo de tejido.

Como ha sido indicado, el cocotero es una especie recalcitrante debido a que presenta baja capacidad embriogénica (Verdeil y Buffard Morel, 1995) y por lo tanto poca respuesta morfogénica. En este estudio se presentaron principalmente dos respuestas morfogénicas:

1) diferenciación de embriones somáticos de 15 a los 30 días, y 2) desdiferenciación de ES después de los 30 días, con crecimiento de callo tipo haustorial en la periferia de los ES formados por lo que esta desdiferenciación del CE, lo que ocasiona la disminución de ES. Esta disminución de ES ocurre después de 30 días de cultivo en callos embriogénicos así como en subdivisiones de callo embriogénico, lo anterior es debido a que se promueve una proliferación rápida de células en la superficie de los ES o del CE, que conduce a la formación de callo o tejido tipo haustorial. En los cortes histológicos realizados fue posible observar una capa de células formando protodermis bien definida en la periferia de los ES, los cuales presentaron un ligero crecimiento de tejido tipo haustorial, ya que estas células dan origen a este tipo de tejido (Figura 2 L).

Aunque fue posible observar ES bien formados (SCE -F) a los 15 días de cultivo, en los cortes histológicos no se observó el meristemo apical (Figura 2 F), sólo en algunos casos los ES mostraron las partes características que conforman un embrión como: poro germinativo, coleóptilo y meristemo apical, pero sólo después de los 30 días de cultivo (Figura 2 J). En la actualidad se desconocen las causas que influye en la fuerte heterogeneidad presentada en el desarrollo de los ES formados de cocotero. De acuerdo a Blake (1990), estas anomalías en el desarrollo de ES son atribuidas a diversos factores, pero probablemente provocadas por niveles sub o supra óptimos de auxinas y/o citocininas.

Indudablemente, la formación del meristemo apical en un embrión somático es importante, debido a que las células no diferenciadas de esta estructura son las responsables de la iniciación de órganos en las plantas superiores (Clark et al., 1997). La ausencia del meristemo apical en los ES formados esta probablemente asociado, a cambios en el nivel de expresión de genes, por ejemplo, se conoce que la expresión de los genes *cdc2* y *cdc2a* son un factor crítico en la regulación de la actividad meristemática y el establecimiento de la competencia proliferativa en *Arabidopsis thaliana* y pueden contribuir a la regulación temporal y espacial de la división celular en plantas (Martínez et al., 1992; Hemerly et al., 1993).

## CONCLUSIONES

La subdivisión del callo embriogénico del cocotero favoreció la obtención de embriones somáticos tipo torpedo a los 15 días de cultivo en medio Y3 sin fitohormonas en condiciones de luminosidad.



Los resultados son prometedores y establecen las bases para incrementar el número de embriones somáticos y eventualmente la multiplicación de callos embriogénicos en cocotero, lo cual podrá permitir la propagación a gran escala de palmas híbridas o palmas élite.

## AGRADECIMIENTOS

Alfonso Azpeitia Morales agradece al Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY) por haber llevado a cabo en sus instalaciones el trabajo de investigación de la tesis de doctorado, así como al Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas, Forestales y Pecuarias (INIFAP) y al CONACYT (beca 119335) por el apoyo económico para su manutención. El presente artículo es parte de la tesis doctoral. Este proyecto fue financiado por el CONACYT-SISIERRA (proyecto número 990130).

## LITERATURA CITADA

- Ambrozic-Dolinsek, J. M.; Camloh, B. B. and Zel, J. 2001. Apospory in leaf culture of staghorn fern (*Platycerium bifurcatum*). Plant Cell Reports (on line), file://A:\Plant%20Cell%20Rep%20-%20Full%20Text%20DOI%2010\_1007-s00299-001-.
- Blake, J. 1990. Coconut (*Cocos nucifera* L.): Micropropagation. In: Bajaj, Y. P. S. (ed.). Biotechnology in agriculture and forestry. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Vol. 10, pp. 538-554.
- Browning, G. V. O.; Passey, A. J. and James, D. J. 1987. Multiple Shoot and root regeneration from pear embryo cotyledon explants *in vitro*. J. Hortic. Sci. 62:305-311.
- Buffard-Morel, J.; Verdeil, J. L. and Pannetier, C. 1992. Embryogenèse somatique du cocotier (*Cocos nucifera* L.) à partir de tissus foliaires: étude histologique. Can J. Bot. 70:735-741.
- Clark, E. S.; Robert, W. W. and Meyerowitz, E. M. 1997. The *CLAVATA1* gene encodes a putative receptor kinase that controls shoot and floral meristem size in *Arabidopsis*. Cell 89:575-585.
- Chan, L. J.; Saénz, L.; Talavera, C.; Hornung, R.; Robert, M. and Oropeza, C. 1998. Regeneration of coconut (*Cocos nucifera* L.) from plumule explants through somatic embryogenesis. Plant Cell Reports. 17:515-521.
- Dussert, S.; Verdeil, J. L.; Rival, A. M. N. and Buffard-Morel, J. 1995. Nutrient uptake and growth of *in vitro* coconut (*Cocos nucifera* L.) calluses. Plant Sci. 106:185-193.
- 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.
- Ebert, A. and Taylor, H. F. 1990. Assessment of the changes of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid concentrations in plant tissue culture media in the presence of activated charcoal. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 20:165-172.
- George, F. E. 1993. Plant growth regulators. Micropropagation in practice. In: George, E. F. (ed.) Plant Propagation by Tissue Culture (Part 2). pp. 834-1122.
- Hemerly, A. S.; Ferreira, P.; De Almeida, J. E.; Van Montagu, M.; Engler, G. and Inzé, D. 1993. cdc2a expression in *Arabidopsis* is linked with competence for cell division. Plant Cell. 5:1711-1723.
- Herrera, H. G. A. 2002. Caracterización fisicoquímica del carbón activado y su efecto en el cultivo *in vitro* de *Cocos nucifera* L. Tesis de Licenciatura. Instituto Tecnológico Agropecuario Núm. 2. 49 p.
- Hornung, R. 1995. Micropropagation of *Cocos nucifera* L. from plumular tissue excised from mature zygotic embryos. Plantations, Recherche, Development. 2:38-41.
- Kawahara, R. and Komamine, A. 1995. Molecular basis of somatic embryogenesis. In: Bajaj, Y. P. S. (ed). Biotechnology in agriculture and forestry, Vol. 30, Somatic embryogenesis and synthetic seed I. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, Alemania. pp. 30-39.
- Magnaval, C.; Noirot, M.; Verdeil, J. L.; Blattes, A.; Huet, C.; Grosdemange, F.; Beule, T. and Buffard-Morel, J. 1997. Specific nutritional requirements of coconut calli (*Cocos nucifera* L.) during somatic embryogenesis induction. J. Plant Physiol. 150:719-728.
- Mariotti, D. and Arcioni, S. 1983. *Coronilla varia* L. (Crown vetch): plant regeneration through somatic embryogenesis. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 2:103-110.
- Martinez, C. M.; Jan-Elo, J.; Lawton, M. A.; Lamb, C. J. and Doerner, P. W. 1992. Spatial pattern of *cdc2* expression in relation to meristem activity and cell proliferation during plant development. Proc. Natl. Acad. Sci. 89:7360-7364.

- Meng-Jin, C. and Wei-Chin, C. 1987. Somatic embryogenesis and plant regeneration in callus culture derived from immature seeds and mature zygotic embryos of *Dyosma pleiantha* (Hance) Woodson. *Plant Cell Reports*. 6:484-485.
- Olivares, S. E. 1994. Paquete de diseños experimentales FEUANL. Versión 2.5. Facultad de Agronomía Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL). Marín, Nuevo León, México.
- Oropeza, C. and Chan, J. L. 1995. Protocol for the formation of somatic embryos from coconut plumule explants. In: *Compendium of protocols*. Verdeil, J. L. (ed.). STD3(ERTBTS3\*CT940298). ORSTOM-CIRAD, Montpellier, Francia 280 p.
- Orshinsky, B. R.; Swanson, E. B. and Tomes, D. T. 1983. Enhanced shoot regeneration from homogenized callus cultures of birdsfoot trefoil (*Lotus corniculatus* L.). *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 2:341-347.
- Park, Y. G. and Son, S. H. 1988. *In vitro* organogenesis and somatic embryogenesis from punctured leaf of *Populus nigra* x *P. maximowiczii*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 15:95-105.
- Piña, R. J. 1998. Programa nacional de investigación del cocotero. Memoria de la 1ra. Reunión Nacional de Palma de Coco, Acapulco, Guerrero, México. pp 5-17.
- Smith, D. L. and Krikorian, A. D. 1989. Release of somatic embryogenic potential from excised zygotic embryos of carrot and maintenance of polyembryonic cultures in hormone-free medium. *Plant Sci*. 58:1832-1843.
- Verdeil, J-L. and Buffard-Morel, J. 1995. Somatic embryogenesis in coconut (*Cocos nucifera* L.): In: Bajaj, Y. P. S. (ed) *Biotechnology in agriculture and forestry*, Vol. 30. Somatic embryogenesis and synthetic seed I. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, Alemania pp. 299-317.