

ADDITION OF BENZYLADENINE TO COCONUT EXPLANTS CULTURED *In vitro* IMPROVES THE FORMATION OF SOMATIC EMBRYOS AND THEIR GERMINATION

LA ADICIÓN DE BENCILADENINA A EXPLANTES DE COCOTERO CULTIVADOS *In vitro* MEJORA LA FORMACIÓN DE EMBRIONES SOMÁTICOS Y SU GERMINACIÓN

Mayra I. Montero-Cortés, José L. Chan-Rodríguez, Ivan Cordova-Lara,
Carlos Oropeza-Salin, Luis Sáenz-Carbonell*

Unidad de Biotecnología, Centro de Investigación Científica de Yucatán, 97200. Calle 43 No.
130. Colonia Chuburna de Hidalgo, Mérida, Yucatán, México. (vyca@cicy.mx).

ABSTRACT

Coconut (*Cocos nucifera* L.) production has been declining in México and other countries due to deadly diseases; therefore, massive production of palms resistant to diseases is needed for replanting. Production of somatic embryos and micropropagation could be a very useful technique to produce free disease coconut population. Explants (embryogenic-structures) of Pacific Tall 2 ecotype were cultured in an induction medium defined as I (semisolid Y3 medium containing 0.65 mM 2,4-dichlorophenoxyacetic acid) and treated with the cytokinin benzyladenine (BA) at 0, 25, 100 or 200 μM to evaluate its effect on embryogenic callus formation. The BA treatments did not affect the percentage of embryogenic callus formation. In order to evaluate the effect of the BA treatments on the late formation and germination of somatic embryos, the embryogenic calluses obtained in medium I were transferred to medium II (semisolid Y3 medium, containing 6 μM 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and 300 μM BA). The best treatment was obtained from callus treated with 100 μM BA; 72 % of them produced 27 embryos *per* responding callus at 150 d while with 25 μM BA and the control (0 μM BA) only 4 embryos were formed. The highest percentage (50 %) of calluses with germinating embryos occurred with 100 μM BA at 150 d; other treatments produced only 20 %. In this BA concentration, the number of germinating embryos *per* callus was 10, while with the other treatments only 2-3 embryos were formed at 150 d. The total yield of embryos and germinating embryos from 100 explants were 73.6 and 19.0, with 0 μM BA, and 753.2 and 249.0 with 100 μM BA. Pre treatment of coconut explants with BA (100 μM) and further treatment with 6 μM 2,4-D

ABSTRACT

La producción de palmas de cocotero (*Cocos nucifera* L.) ha disminuido en México y otros países debido a enfermedades letales; por tanto, la producción masiva de palmas resistentes a enfermedades es necesaria para replantar. La producción de embriones somáticos y la micropropagación puede ser una técnica muy útil para producir una población de cocoteros libre de enfermedades. Explantes (estructuras embriogénicas) del ecotipo Alto Pacífico 2 se cultivaron en un medio de inducción definido como I (medio Y3 semisólido que contiene 0.65 μM 2,4-diclorofenoxiacético) y tratados con la citocinina benciladenina (BA) a 0, 25, 100 o 200 μM para evaluar su efecto sobre la formación de callos embriogénicos. Los tratamientos BA no afectaron el porcentaje de la formación de callos embriogénicos. Para evaluar el efecto de los tratamientos BA en la formación tardía y germinación de embriones somáticos, los callos embriogénicos obtenidos en el medio de cultivo I se transfirieron al medio II (medio Y3 semisólido que contiene 6 μM 2,4-de ácido diclorofenoxiacético y 300 μM BA). El mejor tratamiento se obtuvo de callos tratados con 100 μM BA; 72 % de ellos produjeron 27 embriones por respuesta del callo a 150 d, mientras que con 25 μM BA y con el testigo (0 μM BA) se formaron sólo 4 embriones. El mayor porcentaje (50 %) de callos con embriones en germinación se produjeron con 100 μM BA en 150 d; los otros tratamientos produjeron sólo 20 %. En esta concentración de BA, el número de embriones en germinación por callo fue 10, mientras que con los otros tratamientos sólo 2-3 embriones se formaron en 150 d. El rendimiento total de los embriones y embriones en germinación de 100 explantes fueron 73.6 y 19.0, con 0 μM BA, y 753.2 y 249.0 con 100 μM BA. El pre-tratamiento de explantes de coco con BA (100 μM) y el tratamiento posterior con 6 μM 2,4-de ácido diclorofenoxiacético y 300 M BA, mejoró la eficiencia de la formación y germinación de embrión somático del coco.

*Author for correspondence ❖ Autor responsable.

Received: January, 2011. Approved: July, 2011.

Published as ARTICLE in *Agrociencia* 45: 663-673. 2011.

and 300 μ M BA, improves the efficiency of coconut somatic embryo formation and germination.

Key words: *Cocos nucifera*, clonal propagation, somatic embryogenesis, cytokinin.

INTRODUCTION

The coconut palm (*Cocos nucifera* L.) is a very important crop in tropical areas, besides its potential use as biodiesel obtained from coconut oil in the Philippines (Tan *et al.*, 2004). Millions of palms are disappearing mainly due to deadly diseases; the main cause in México is the lethal yellowing disease (LY) (Harrison and Oropeza, 2008). Therefore, there is a growing need to produce resistant palms to these diseases for replanting.

In México, a nearly 10-year study screening LY resistant coconut germplasm allowed the identification of highly resistant ecotypes, in particular the Mexican Pacific Tall 2 (MPT2) (Zizumbo *et al.*, 1999). In order to obtain enough selected palms for replanting, more efficient propagation methods are needed since only a small number of seeds per palm are produced annually. Micropropagation and protocols via somatic embryogenesis have been reported using different explants: immature leaf (Raju *et al.*, 1984), immature inflorescence (Verdeil *et al.*, 1994), plumule (Chan *et al.*, 1998) and unfertilized ovary (Perera *et al.*, 2006). The plumule explant when cultured in medium containing the synthetic auxin 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) without any other growth regulator, show a better response for the production of embryogenic calluses and somatic embryos, although embryos yield is very low (Chan *et al.*, 1998). In order to overcome this limitation there is a protocol with a cumulative effect on the number of somatic embryos produced, mainly by subsequent steps of embryogenic callus multiplication, for which embryogenic-structures were used as explants (Perez-Núñez *et al.*, 2006). However, each individual step still shows a low efficiency: only 40-60 % explants form embryogenic callus (EC), 1-7 somatic embryos are formed *per* EC and embryo germination is 12-28 % (Perez-Núñez *et al.*, 2006). Therefore, it is important to improve the protocol to produce more coconut plantlets in order to support the coconut replanting programs in México.

Palabras clave: *Cocos nucifera*, propagación clonal, embriogénesis somática, citocinina.

INTRODUCCIÓN

La palma de coco (*Cocos nucifera* L.) es un cultivo muy importante en las zonas tropicales, además de su uso potencial como biodiesel obtenido del aceite de coco en las Filipinas (Tan *et al.*, 2004). Millones de palmas están desapareciendo debido principalmente a enfermedades mortales; la causa principal en México es la enfermedad del amarillamiento letal (AL) (Harrison y Oropeza, 2008). Por tanto, hay una creciente necesidad de producir palmas resistentes a estas enfermedades para la replantación.

En México, un estudio de casi 10 años que detectó germoplasma de coco resistente al AL permitió identificar ecotipos de alta resistencia, en particular el Alto del Pacífico Mexicano 2 (MPT2) (Zizumbo *et al.*, 1999). Con el fin de obtener suficientes palmas seleccionadas para la repoblación se necesitan métodos de propagación más eficientes ya que sólo un pequeño número de semillas por palma se producen anualmente. Se ha reportado la micropropagación y protocolos vía embriogénesis somática usando diferentes tipos de explantes: hojas inmaduras (Raju *et al.*, 1984), inflorescencias inmaduras (Verdeil *et al.*, 1994), plúmula (Chan *et al.*, 1998) y ovario no fertilizado (Perera *et al.*, 2006). El explante plúmula cultivado en un medio que contiene la auxina sintética 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) sin ningún otro regulador de crecimiento, muestra una mejor respuesta para la producción de callos embriogénicos y embriones somáticos, aunque el rendimiento de embriones es muy bajo (Chan *et al.*, 1998). Para superar esta limitación, hay un protocolo con un efecto acumulativo en el número de embriones somáticos producidos, principalmente por los pasos posteriores de la multiplicación de callos embriogénicos, por lo que las estructuras embriogénicas se usaron como explantes (Perez-Núñez *et al.*, 2006). Sin embargo, cada paso individual muestra una eficiencia baja: sólo 40-60 % de explantes forma callos embriogénicos (CE), 1-7 embriones somáticos se forman por CE y la germinación de embriones es 12-28 % (Pérez-Núñez *et al.*, 2006). Por tanto, es importante mejorar el protocolo para producir más plántulas

Cytokinins such as benzyladenine (BA) are included in media formulations in combination with auxins to induce embryogenic cultures (Gaj, 2004). BA and other cytokinins added to a medium formulation that includes 2,4-D inhibit the formation of EC on plumule explants (Azpeitia, 2003; Chan *et al.*, 1998). However, BA has not been tested on embryogenic-structure explants derived from multiplying calluses. Therefore the objective of the present study was to evaluate the effect of BA on the formation of embryogenic callus, somatic embryos and their germination rate using embryogenic-structures as explants.

MATERIALS AND METHODS

Initial plant material

Coconut fruit were harvested 12-14 months after controlled pollination of Mexican Pacific Tall palms at least 15 year old. Cylinders (1.6 cm diameter) of endosperm containing the embryo were obtained in the field, placed in a 0.6 % NaClO (w/v) solution and rinsed with sterile water. Under aseptic condition, the cylinders were washed 3 min in 70 % ethanol, 20 min in a 6 % NaClO solution and rinsed with sterile water. The embryos were excised from the endosperm, washed 10 min in a 0.6 % NaClO solution and rinsed with sterile water. The plumules were excised from these embryos under a stereoscopic microscope and placed directly on culture medium I.

Media preparation and culture conditions

Media preparation and culture conditions were set up according to Pérez-Núñez *et al.* (2006). Media I and II were each prepared using Y3 medium (Eeuwens, 1976) supplemented with 3 g L⁻¹ gelrite and 2.5 g L⁻¹ charcoal (acid-washed, plant cell culture tested); medium I contained 600 μM 2,4-D, while medium II contained 6 μM 2,4-D and 300 μM BA. All chemicals were supplied by Sigma (USA). The medium pH was adjusted to 5.75 with KOH before autoclaving for 20 min at 120 °C. For callus induction, each explant was cultured in 35 mL glass vessel containing 10 mL of medium I for 90 d. Cultures were kept under complete darkness at 27±2 °C without subculturing. For induction of somatic embryos, calluses were subcultured in a 100 mL glass vessel containing 25 mL of medium II. Cultures were kept in a 16 h photoperiod (45-60 μmol m⁻² s⁻¹ PPF) at 27±2 °C, and explants were subcultured once every 2 months.

de coco y apoyar los programas de replantación de cocoteros en México.

Las citocininas como la benciladenina (BA) se incluyen en las formulaciones de medios de cultivo en combinación con auxinas para inducir cultivos embriogénicos (Gaj, 2004). La BA y otras citocininas adicionadas a la formulación de un medio de cultivo que incluya el ácido 2,4-D inhiben la formación de CE sobre explantes de plúmula (Azpeitia, 2003; Chan *et al.*, 1998). Sin embargo, la BA no se ha probado en explantes de estructura embriogénica derivada de la multiplicación de callos. Por tanto, el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la BA en la formación del callo embriogénico, embriones somáticos y su tasa de germinación usando estructuras embriogénicas como explantes.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal de inicio

La fruta del cocotero se cosechó 12 a 14 meses después de la polinización controlada de palmas Alto del Pacífico Mexicano con mínimo 15 años de edad. En el campo se obtuvieron cilindros (1.6 cm diámetro) de endospermo con el embrión, se colocaron en una solución 0.6 % NaClO (w/v) y enjuagaron con agua esterilizada. Bajo condiciones asépticas, los cilindros se lavaron 3 min en etanol 70 %, 20 min en una solución al 6 % de NaClO y enjuagados con agua esterilizada. Los embriones fueron extirpados del endospermo, lavados 10 min en una solución 0.6 % NaClO y enjuagados con agua esterilizada. Las plúmulas se extirparon de estos embriones bajo un microscopio estereoscópico y se colocaron directamente en el medio de cultivo I.

Preparación y condiciones de los medios de cultivo

La preparación y condiciones de los medios de cultivo se establecieron según Pérez-Núñez *et al.* (2006). Los medios I y II se prepararon cada uno usando un medio Y3 (Eeuwens, 1976) y un suplemento con 3 g L⁻¹ gelrite y 2.5 g L⁻¹ carbón (lavado con ácido, cultivo de células vegetales probado); el medio I contenía 600 μM de 2,4-D, y el medio II 6 μM de 2,4-D y 300 μM BA. Todos los productos químicos fueron suministrados por Sigma (EE.UU.). El medio pH se ajustó a 5.75 con KOH antes de esterilizar por 20 min a 120 °C. Para la inducción de callos, cada explante se cultivó en un

Callus multiplication

Embryogenic-structures, excised from embryogenic callus formed in medium I, were subcultured in medium I. This procedure was repeated twice and the resulting embryogenic calluses were subcultured in medium II for somatic embryo formation and germination. Media and conditions were as described above.

Experiment with BA

The cytokinin BA, benzylaminopurine (0, 25, 50, 100 and 200 μM) was added to medium I (protocol callus multiplication) and the effect of BA treatments was evaluated in the formation of EC. The embryogenic calluses formed under the BA treatments were transferred to medium II (same formulation as above for all treatments) to allow the formation of somatic embryos and their germination. Three repetitions with 20 explants each (60 explants total) were used per treatment in medium I. Then, from each treatment 30 embryogenic calluses were subcultured into medium II (three repetitions with 10 explants).

Quantitative evaluation

Every 30 d, under sterile conditions and using a stereoscopic microscope, the following variables were determined: percentage of explants forming EC, percentage of embryogenic calluses with somatic embryos, number of somatic embryos per EC, percentage of embryogenic calluses with germinating embryos, number of germinating embryos per EC responding, total yield of somatic embryos, and total yield of germinating somatic embryos.

Statistical analysis

The experimental design was completely randomized, data were subjected to analysis of variance and means were compared using LSD test ($p \leq 0.05$) using SPSS version 11.5 software for all statistical analysis.

RESULTS AND DISCUSSION

Morphological development of coconut cultures

Embryogenic-structures derived from embryogenic calluses obtained from plumule explants were used as explants. After 90 d of culture in medium I, embryogenic callus were produced. The embryogenic-structures are protruding characteristic features of

recipiente de vidrio de 35 mL con 10 mL del medio I por 90 d. Los cultivos se mantuvieron en completa oscuridad a 27 ± 2 °C sin subcultivo. Para la inducción de embriones somáticos, los callos se subcultivaron en un recipiente de vidrio de 100 mL con 25 mL del medio II. Los cultivos se mantuvieron en un fotoperiodo de 16 h (45 a $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PPF) a 27 ± 2 °C, y los explantes se subcultivaron una vez cada 2 meses.

Multipliación de callos

Las estructuras embriogénicas, extirpadas de callos embriogénicos formadas en el medio I, se subcultivaron en el medio I. Este procedimiento se repitió dos veces y los callos embriogénicos resultantes se subcultivaron en el medio II para la formación y germinación del embrión somático. Los medios y condiciones eran como ya se describió.

Experimento con BA

La citocinina BA, bencilaminopurina (0, 25, 50, 100 y 200 μM) se añadió al medio I (protocolo de multiplicación de callos) y el efecto de los tratamientos BA se evaluó en la formación de CE. Los callos embriogénicos formados con los tratamientos BA se transfirieron al medio II (misma formulación que la anterior para todos los tratamientos) para permitir la formación y germinación de embriones somáticos. Hubo tres repeticiones con 20 explantes cada uno (total 60 explantes) por tratamiento en el medio I. Luego, de cada tratamiento, 30 callos embriogénicos fueron sub-cultivados en el medio II (tres repeticiones con 10 explantes).

Evaluación cuantitativa

Cada 30 d, en condiciones estériles y con un microscopio estereoscópico, se determinaron las variables: porcentaje de explantes que forman CE, porcentaje de callos embriogénicos con embriones somáticos, número de embriones somáticos por CE, porcentaje de callos embriogénicos con embriones en germinación, número de embriones germinados por respuesta de CE, rendimiento total de embriones somáticos, y rendimiento total de embriones somáticos germinados.

Análisis estadístico

El diseño experimental fue completamente al azar, se hizo análisis de varianza con los datos y las medias se compararon con LSD ($p \leq 0.05$) usando SPSS versión 11.5 para todos los análisis estadísticos.

embryogenic coconut calluses and were described by Sáenz *et al.*, (2006) (Figure 1A). This occurred with media supplemented with the BA treatments. After transfer to medium II, these calluses formed several somatic embryos at 30 d of culture (Figure 1B), which developed through a globular stage (Figure 1C) followed by a scutellar stage showing the coleoptiles and the germinative pore (Figure 1D). Embryos on the calluses were already germinating at 60 d (Figure 1E) and later developed into shoots (Figure 1F) and young plantlets (Figure 1G).

The effect of BA (0, 25, 100 or 200 μM in medium I) on the formation of EC was evaluated after 90 d and no significant differences were observed. The control had 50 % of explants forming EC, whereas with 25, 100 or 200 μM BA the responses were 50, 46 and 53 %. From the developmental and morphological point of view, there were no significant differences between BA treatments and the control. Within 90 d of culture in medium I, 50 % of explants formed EC that first developed translucent structures with ear-like shape. Then, pearly globular structures appeared on the surface of translucent structures, and later they became elongated. This developmental pattern was similar to what was reported by Sáenz *et al.* (2006), who define these elongated structures as embryogenic-structures, since somatic embryos eventually are formed from them. Occurrence of these structures is also found in *Elaeis guinensis* (Schwendiman *et al.*, 1990) and *Hevea brasiliensis* (Michaux-Ferriere and Carron, 1989).

Effect of BA on the formation of somatic embryos

The embryogenic calluses obtained in medium I in presence of BA, were transferred to medium II in order to evaluate the effect of initial BA treatments on the formation of SE over a 150 d of culture. Somatic embryos on embryogenic calluses were observed after 30 d (Figure 2A). The percentages of EC forming embryos ranged from 24 to 36 % for 25 μM and 200 μM BA and control (Figure 2A); afterwards, there were not significant changes. With 100 μM BA the percentage of calluses with embryos was above 50 % and increased up to 72 % at 90 d.

With 100 μM BA, responding calluses had 20 embryos at 30 d (Figure 2B) and it increased to 27 at 150 d. A similar pattern was observed with

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Desarrollo morfológico de cultivos de coco

Las estructuras embriogénicas derivadas de los callos embriogénicos obtenidos de explantes plúmulas se usaron como explantes. Después de 90 d de cultivo en el medio I se produjeron callos embriogénicos. Las estructuras embriogénicas son rasgos característicos que sobresalen de los callos embriogénicos de coco y están descritos por Sáenz *et al.* (2006) (Figura 1A). Esto ocurrió con los medios de cultivo más un suplemento con tratamientos BA. Después de la transferencia al medio II, estos callos formaron varios embriones somáticos a los 30 d de cultivo (Figura 1B), los cuales se desarrollaron a través de una etapa globular (Figura 1C) seguida por una etapa escutelar que muestra los coleóptilos y el poro germinativo (Figura 1D). Los embriones en los callos ya estaban germinando a los 60 d (Figura 1E) y luego se convirtieron en brotes (Figura 1F) y plántulas jóvenes (Figura 1G).

El efecto de BA (0, 25, 100 o 200 μM en el medio I) en la formación de CE se evaluó después de 90 d y no hubo diferencias significativas. El testigo tenía 50 % de explantes que formaban CE, mientras que con 25, 100 o 200 μM BA, las respuestas fueron 50, 46 y 53 %. Desde el punto de vista morfológico y de desarrollo, no hubo diferencias significativas entre tratamientos de BA y el testigo. Dentro de los 90 d de cultivo en el medio I, el 50 % de los explantes formaron CE que primero desarrollaron estructuras translúcidas con forma de oreja. Entonces, aparecieron estructuras globulares aperladas sobre la superficie de estructuras translúcidas, y más tarde se convirtieron en estructuras elongadas. Este patrón de desarrollo fue similar a lo reportado por Sáenz *et al.* (2006), quienes definen estas estructuras elongadas como estructuras embriogénicas, ya que los embriones somáticos eventualmente se forman de ellas. La aparición de estas estructuras también se encuentra en *Elaeis guinensis* (Schwendiman *et al.*, 1990) y *Hevea brasiliensis* (Michaux-Ferriere y Carron, 1989).

Efecto de BA en la formación de embriones somáticos

Los callos embriogénicos obtenidos en el medio I en presencia de BA, se transfirieron al medio II para

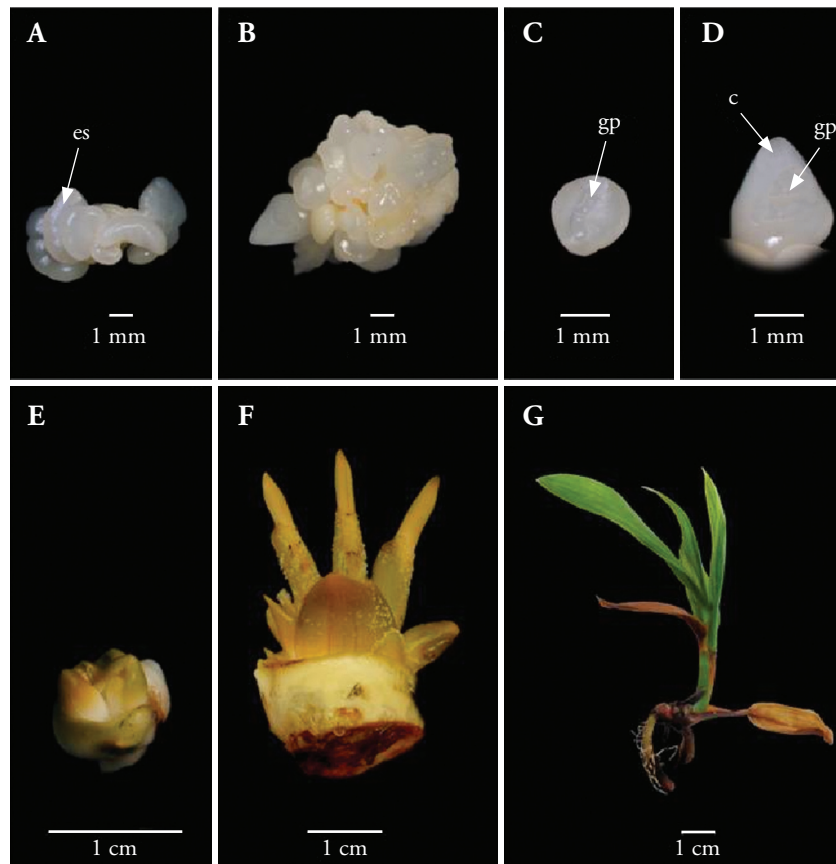


Figure 1. Development and germination of coconut somatic embryos in the presence of $100 \mu\text{M}$ BA. (A) An embryogenic callus showing embryogenic-structures after 90 d of culture in medium I. (B) After transferring embryogenic callus to medium II, callus with somatic embryos at different stages occurred after 30 d of culture. (C) Somatic embryo at the globular stage showing the germinative pore after 15 d of culture. (D) Somatic embryo at the scutellar stage showing the coleoptile and the germinative pore after 30 d of culture. (E) Initial germination of somatic embryos after 60 d of culture. (F) Shoots forming after 90 d of culture. (G) A plantlet forming after 180 d of culture in medium II. gp: germinative pore; es: embryogenic structures; c: coleoptile.

Figura 1. Desarrollo y germinación de embriones somáticos de coco en la presencia de $100 \mu\text{M}$ BA. (A) Un callo embriogénico mostrando estructuras embriogénicas después de 90 d de cultivo en el medio I. (B) Después de transferir el callo embriogénico al medio II, se produjo un callo con embriones somáticos en diferentes etapas después de 30 d de cultivo. (C) Embrión somático en la etapa globular mostrando el poro germinativo después de 15 d de cultivo. (D) Embrión somático en la etapa escutelar mostrando el coleóptilo y el poro germinativo después de 30 d de cultivo. (E) Germinación inicial de embriones somáticos después de 60 d de cultivo. (F) Brotes formándose después de 90 d de cultivo. (G) Una plántula formándose después de 180 d de cultivo en el medio II. gp: poro germinativo; es: estructuras embriogénicas; c: coleóptilo.

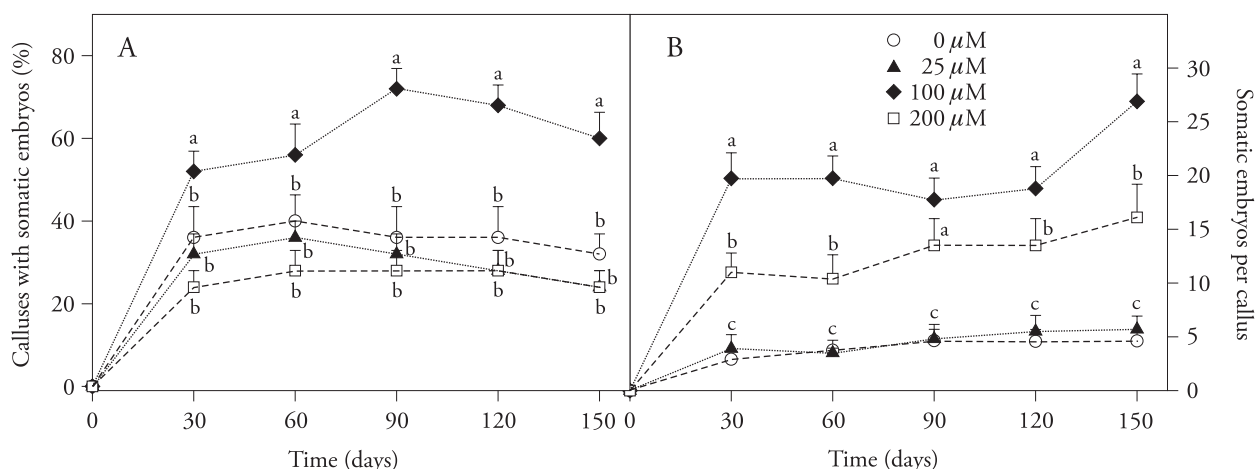


Figure 2. The effect of BA on the formation of somatic embryos (%) in embryogenic calluses. (A) Percentage of embryogenic calluses with somatic embryos. (B) Number of somatic embryos per embryogenic callus. Data shown are means and bars denote standard error. Different letters at each time of culture denote significant differences among treatments ($P \leq 0.05$).

Figura 2. El efecto de la BA en la formación de embriones somáticos (%) en callos embriogénicos. (A) Porcentaje de callos embriogénicos con embriones somáticos. (B) Número de embriones somáticos por callo embriogénico. Los datos mostrados son las medias y las barras denotan el error estándar. Letras diferentes en cada tiempo de cultivo denotan diferencias significativas entre los tratamientos ($p \leq 0.05$).

the other treatments but with lower amounts of embryos per callus: 16 embryos at 150 d with 200 μM BA; 4 embryos at 30 d with 25 μM BA and the control (Figure 2B). In control the numbers of somatic embryos formed from 100 explants at 150 d were 73.6, but the presence of 100 μM BA increased the number increased to 753.2 embryos, improving the efficiency in embryo formation by 923 % (Table 1).

Effect of BA on the germination of somatic embryos

Embryogenic calluses with somatic embryos that germinating were observed at 60 d of culture and the percentages were as follows: 20 % at 60 d and 50 % at 150 d for 100 μM BA; 1 to 10 % at 60 d and about 20 % at 150 d for 25 μM BA, 200 μM BA and control (Figure 3A). The amount of somatic embryos germinating per EC was as follows: for 100 μM BA, responding calluses had 5 embryos germinating at 60 d (Figure 3B), increasing to 10 at 150 d; for 25 μM BA and the control there were less than 2 embryos germinating at 150 d (Figure 3B); for 100 μM BA the amount was three-fold that of the other treatments. The total yield of somatic embryos germinating obtained from 100 non treated explants

evaluar el efecto de los tratamientos iniciales BA en la formación de ES en un cultivo de 150 d. Embriones somáticos en callos embriogénicos se observaron después de 30 d (Figura 2A). Los porcentajes de CE que forman embriones variaron de 24 a 36 % para 25 μM y 200 μM BA y para el testigo (Figura 2A); después no hubo cambios significativos. Con 100 μM BA el porcentaje de callos con embriones fue más de 50 % y aumentó hasta 72 % a 90 d.

Con 100 μM BA, los callos de respuesta tuvieron 20 embriones a los 30 d (Figura 2B) y aumentó a 27 a los 150 d. Un patrón similar se observó con los otros tratamientos pero con menores cantidades de embriones por callo: 16 embriones a los 150 d con 200 μM BA; 4 embriones a los 30 d con 25 μM BA y el testigo (Figura 2B). En el testigo, los números de embriones somáticos formados de 100 explantes en 150 d fueron 73.6, pero la presencia de 100 μM BA aumentó el número a 753.2 embriones, mejorando 923 % la eficiencia en la formación de embriones (Cuadro 1).

Efecto de BA en la germinación de embriones somáticos

A los 60 d de cultivo se observaron callos embriogénicos con embriones somáticos en germinación y

Table 1. Effect of initial BA treatment on *Cocos nucifera* explants (embryogenic-structures) on morphogenic responses (formation of embryogenic callus, somatic embryos, and germinating embryos) after transplant to media II and subculture for 150 d.

Cuadro 1. Efecto del tratamiento BA inicial en explantes de *Cocos nucifera* (estructuras embriogénicas) en las respuestas morfológicas (formación de callo embriogénico, embriones somáticos y embriones en germinación) después de transferir al medio II por 150 d.

Morphogenic response	0 μ M BA	100 μ M BA	% increment
Initial No. of explants	100.0	100.0	0
No. of explants forming EC [†]	49.0 \pm 9.6a	47.0 \pm 11.5a	0
No. of explants forming EC [†] with SE [‡]	16.0 \pm 4.9a	28.0 \pm 6.3b	75
No. of explants forming EC [†] with SEg [§]	12.0 \pm 2.0a	24.0 \pm 2.4b	100
Yields per responding callus:			
nSE [‡] / EC [†] responding	04.6 \pm 1.0a	26.9 \pm 2.5b	484
nSEg [§] / EC [†] responding	01.6 \pm 0.4a	10.2 \pm 2.4b	537
Total yields per 100 explants:			
Total yield SE [‡]	73.6	753.2	923
Total yield SEg [§]	19.0	249.0	1210

Means with different letter in a row are statistically different (LSD, $p \leq 0.05$). [†]EC = embryogenic callus; [‡]SE = somatic embryos; [§]SEg = somatic embryos that germinate. Medias con letra diferente en una hilera son estadísticamente diferentes (LSD, $p \leq 0.05$). [†]CE = callo embriogénico; [‡]ES = embriones somáticos; [§]ESg = embriones somáticos que germinan.

(control) was 19 at 150 d; in contrast, with 100 μ M BA the yield increased to 249 (12 times) (Table 1).

These results differ from reports by Chan *et al.* (1998) who indicate that the formation of embryogenic calluses required a medium

los porcentajes fueron los siguientes: 20 % a los 60 d y 50 % a los 150 d para 100 μ M BA; 1 a 10 % a los 60 d y casi 20 % a 150 d para 25 μ M BA, 200 μ M BA y testigo (Figura 3A). La cantidad de embriones somáticos en germinación por CE fue: para 100 μ M

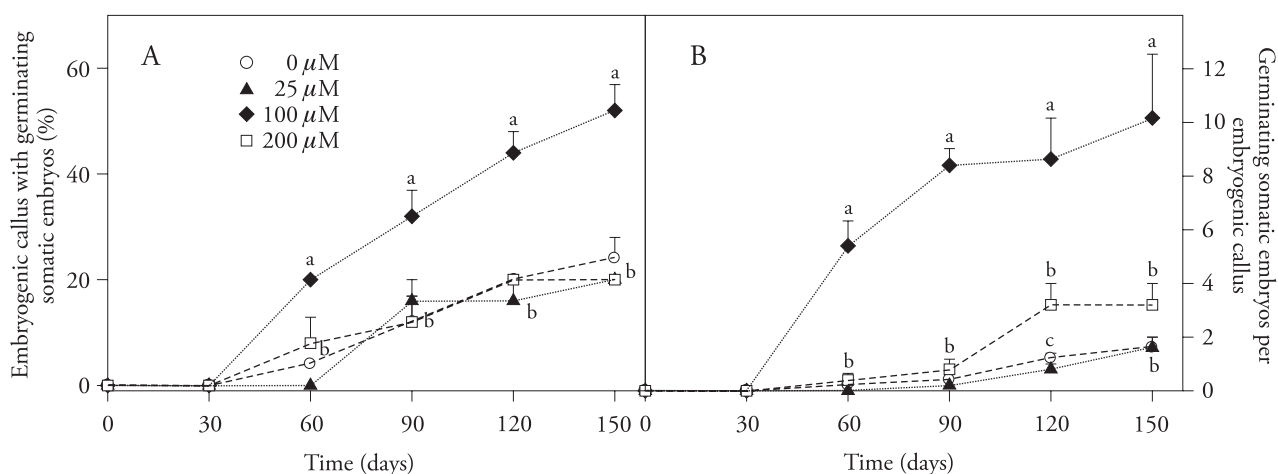


Figure 3. The effect of BA on the germination of somatic embryos. (A) Percentage of embryogenic calluses with germinating somatic embryos. (B) Number of germinating somatic embryos per embryogenic callus responding. Data shown are means and bars denote standard error. Different letters at each time of culture denote significant differences between treatments ($p \leq 0.05$).

Figura 3. El efecto de la BA en la germinación de embriones somáticos. (A) Porcentaje de callos embriogénicos con embriones somáticos en germinación. (B) Número de embriones somáticos en germinación por respuesta de callos embriogénicos. Los datos mostrados son las medias y las barras denotan el error estándar. Letras diferentes en cada tiempo de cultivo denotan diferencias significativas entre tratamientos ($p \leq 0.05$).

supplemented with 2,4-D alone, because the addition of BA decreased EC formation, and similarly, other cytokinins reduced EC formation (Azpeitia, 2003). Those authors used plumule from the original coconut embryo, whereas in the present study the explants were embryogenic structures excised from calluses obtained after three callus multiplication cycles *in vitro*. These contrasting results might be explained by the fact that the original endogenous cytokinin content in the plumule explants would be higher than that of embryogenic-structures. Similarly, a response to BA dependant on the type of explant was observed during the regeneration of *Stenotaphrum secundatum*; where different concentrations of this cytokinin did not affect the formation of callus in different tissues (early immature embryo, immature embryo and shoot base of young seedlings) used as initial explants; however, the ability to regenerate was dependent of the type of explant used and the initial concentration of BA added to the culture medium (Li *et al.*, 2006).

Although usually 2,4-D alone induces somatic embryogenesis in monocot species (Bhaskaran and Smith, 1990; Krishnaraj and Vasil, 1995), in some species such as *Cynodon dactylon* × *Cynodon transvaalensis* (Li and Qu, 2002), *Ophiorrhiza prostrata* (Martin *et al.*, 2007), and *Stenotaphrum secundatum* (Li *et al.*, 2006), the use of a low (44 nM-0.22 μ M) concentration of BA in the callus induction medium enhances the formation of somatic embryos, but higher (2.22-4.22 μ M) concentrations of BA inhibit the embryogenic response (Debeaujon and Branchard, 1993; Martin *et al.*, 2007).

In our study 100 μ M of BA did not change the percentage of explants forming callus, but it produced a late effect, improving the efficiency of embryo formation and germination. Such an improvement might be used for the propagation scheme proposed by Pérez-Núñez *et al.* (2006) to increase yields cumulatively. This is relevant because the focus of research by Chan *et al.* (1998), Sáenz *et al.* (2006) and Pérez-Núñez *et al.* (2006) is the development of an efficient technique to support replanting programs in México, as planned by the National Association of Coconut Farmers (CONACOCO), and based on the use of MPT2 coconut palms.

BA, los callos de respuesta tuvieron 5 embriones germinando a los 60 d (Figura 3B) y aumentó a 10 a los 150 d; para 25 μ M BA y el testigo hubo menos de 2 embriones en germinación a los 150 d (Figura 3B); para 100 μ M BA la cantidad fue tres veces mayor que en los otros tratamientos. El rendimiento total de embriones somáticos en germinación obtenidos de 100 explantes no tratados (testigo) fue 19 a 150 d; en cambio con 100 μ M BA el rendimiento aumentó a 249 (12 veces) (Cuadro 1).

Estos resultados difieren de Chan *et al.* (1998) quienes indican que la formación de callos embriogénicos requiere un medio y un suplemento con la auxina 2,4-D sola, porque la adición de BA disminuyó la formación de CE, y similarmente, otras citocininas redujeron la formación de CE (Azpeitia, 2003). Esos autores usaron plúmula del embrión original de coco, mientras que en el presente estudio los explantes fueron estructuras embriogénicas extirpadas de callos obtenidos después de tres ciclos de multiplicación de callos *in vitro*. Estos resultados contrastantes podrían explicarse por el hecho de que el contenido original endógeno de citocininas en los explantes de plúmula sería mayor que el de las estructuras embriogénicas. Similarmente, una respuesta a BA en función del tipo de explante se observó durante la regeneración de *Stenotaphrum secundatum*, donde diversas concentraciones de esta citocinina no afectaron la formación de callos en diferentes tejidos (embrión temprano inmaduro, embriones inmaduros y la base de brotes de plantas jóvenes) usados como explantes iniciales; sin embargo, la capacidad de regenerar dependió del tipo de explante usado y la concentración inicial de BA añadida al medio de cultivo (Li *et al.*, 2006).

Aunque por lo general la 2,4-D sola induce la embriogénesis somática en especies monocotiledóneas (Bhaskaran y Smith, 1990; Krishnaraj y Vasil, 1995), en algunas especies como *Cynodon dactylon* × *Cynodon transvaalensis* (Li y Qu, 2002), *Ophiorrhiza prostrata* (Martín *et al.*, 2007), y *Stenotaphrum secundatum* (Li *et al.*, 2006), el uso de una concentración baja (44 nM-0.22 μ M) de BA en el medio de inducción del callo mejora la formación de embriones somáticos, pero concentraciones altas (2.22-4.22 μ M) de BA inhiben la respuesta embriogénica (Debeaujon y Branchard, 1993; Martin *et al.*, 2007).

En el presente estudio 100 μ M de BA no cambió el porcentaje de explantes que forman callos, pero

CONCLUSIONS

The addition of BA (100 μ M) in medium I increased the formation and germination of somatic embryos when they are transplanted to medium II containing 6 μ M 2,4-D and 300 μ M BA, based on the protocol of EC multiplication. These results improved the overall efficiency of the system for the regeneration of coconut palm, which could have a practical application.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank CONACYT, México, for partial funding for the research reported here (Program grant 43834-Z) and for an scholarship for M. Montero (Grant 183253).

LITERATURE CITED

- Azpeitia M, A. 2003. Diferentes estrategias para promover la embriogénesis somática en cocotero (*Cocos nucifera* L.) a partir de explantes de plúmula. Tesis de Doctorado. Centro de Investigación Científica de Yucatán, México. 130 p.
- Azpeitia, A., J. L. Chan, L. Sáenz, and C. Oropeza. 2003. Effect of 22(S), 23(S)-homobrassinolide on somatic embryogenesis in plumule explants of *Cocos nucifera* (L.) cultured *in vitro*. J. Hort. Sci. Biotechnol. 78: 591-596.
- Bhaskaran, S., and R. H. Smith. 1990. Regeneration in cereal tissue culture: a review. Crop Sci. 30: 1328-1336.
- Chan, J. L., L. Sáenz, C. Talavera, R. Hornung, M. Robert, and C. Oropeza. 1998. Regeneration of coconut (*Cocos nucifera* L.) from plumule explant through somatic embryogenesis. Plant Cell Rep. 17: 515-521.
- Debeaujon, I., and M. Branchard. 1993. Somatic embryogenesis in Cucurbitaceae. Plant Cell Tissue Organ Cult. 34: 91-100.
- Eeuwens, C. J. 1976. Mineral requirements for growth and callus initiation of tissue explants excised from mature coconut palms (*Cocos nucifera* L.) and cultured *in vitro*. Physiol. Plant. 36: 23-28.
- Gaj, M. D. 2004. Factors influencing somatic embryogenesis induction and plant regeneration with particular reference to *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Plant Growth Regul. 43: 27-47.
- Harrison, N. A., and C. Oropeza. 2008. Phytoplasmas associated with coconut lethal yellowing. In: Harrison N. A., G. P. Rao, and C. Marcone (eds). Characterization, Diagnosis and Management of Phytoplasmas. Studium Press LLC, Houston, USA pp: 219-248.
- Krishnaraj, R. S., and I. K. Vasil. 1995. Somatic embryogenesis in herbaceous monocots. In: Thorpe T. A. (ed). *In vitro* Embryogenesis in Plants. Dordrecht, The Netherlands, Kluwer Academic Publishers pp: 471-540.
- Li, L., and R. Qu. 2002. *In vitro* somatic embryogenesis in turf-type bermudagrass: roles of abscisic acid and gibberellic acid, and occurrence of secondary somatic embryogenesis. Plant Breed. 121: 155-158.

produjo un efecto tardío, mejorando la eficiencia en la formación y germinación del embrión. Tal mejoramiento podría usarse para el esquema de propagación propuestos por Pérez-Núñez *et al.* (2006) para aumentar el rendimiento de forma acumulativa. Esto es relevante porque el interés de la investigación realizada por Chan *et al.* (1998), Sáenz *et al.* (2006) y Pérez-Núñez *et al.* (2006) es el desarrollo de una técnica eficiente para apoyar los programas de replantación en México, según lo previsto por el Consejo Nacional del Cocotero (CONACOCO), y con base en el uso de palmas de coco MPT2.

CONCLUSIONES

La adición de BA (100 μ M) en el medio I aumentó la formación y germinación de embriones somáticos cuando se transfirieron al medio II el cual contenía 6 μ M 2,4-D y 300 μ M BA, con base en el protocolo de multiplicación de CE. Estos resultados mejoraron la eficiencia total del sistema para la regeneración de la palma de coco, lo que pudiera tener una aplicación práctica.

—Fin de la versión en español—



- Li, R., A. H. Bruneau, and R. Qu. 2006. Improved plant regeneration and *in vitro* somatic embryogenesis of St Augustinegrass [*Stenotaphrum secundatum* (Walt.) Kuntze]. Plant Breed. 125: 52-56.
- Martin, K. P., S. Beegum, C. L. Zhang, A. Slater, and P. V. Madhusoodanan. 2007. *In vitro* propagation of *Ophiorrhiza prostrata* through somatic embryogenesis. Biol. Plant. 51: 769-772.
- Michaux-Ferriere, N., and M. P. Carron. 1989. Histology of early somatic embryogenesis in *Hevea brasiliensis*: The importance of the timing of subculturing. Plant Cell Tissue Organ Cult. 19: 243-256.
- Perera, P. I. P., V. Hoche, J. L. Verdeil, S. Doubeau, D. M. D. Yakandawala, and L. K. Weerakoon. 2006. Unfertilized ovary: a novel explant for coconut (*Cocos nucifera* L.) somatic embryogenesis. Plant Cell Rep. 26: 21-28.
- Pérez-Núñez, M. T., J. L. Chan, L. Sáenz, T. González, J. L. Verdeil, and C. Oropeza. 2006. Improved somatic embryogenesis from *Cocos nucifera* (L.) Plumule explants. *In Vitro* Cell Dev. Biol. Plant 42: 37-43.
- Raju, C. R., P. Kumar, M. Chandramohan, and R. D. Lyer. 1984. Coconut plantlets from leaf tissue cultures. Plant Crop 12: 75-81.
- Sáenz, L., A. Azpeitia, B. Chuc-Armendariz, J. L. Chan, J. L. Verdeil, V. Hoche, and C. Oropeza. 2006. Morphological and histological changes during somatic embryo formation

- from coconut plumule explants. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 42: 19-25.
- Schwendiman, J., C. Pannetier, and N. Michaux-Ferriere. 1990. Histology of embryogenic formation during *in vitro* culture of oil palm *Elaeis guineensis* Jacq. *Oléagineux* 45: 409-415.
- Tan, R. R., A. B. Culaba, and M. R. I Purvis. 2004. Carbon balance implications of coconut biodiesel utilization in the Philippine automotive transport sector. *Biomass & Bioenergy* 26: 579-585.
- Verdeil, J. L., C. Huet, F. Grosdemange, and J. Buffard-Morel. 1994. Plant regeneration from cultured immature inflorescence of coconut (*Cocos nucifera* L.): evidence for somatic embryogenesis. *Plant Cell Rep.* 3: 218-221.
- Zizumbo, D., M. Fernandez, N. Torres, and R. Cardeña. 1999. Lethal yellowing resistance in coconut germplasm from México. *In: Oropeza C., J. L. Verdeil, R. Asburner, R. Cardeña, and J. M. Santamaría* (eds). *Current Advances in Coconut Biotechnology*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands pp: 131-143.