

29j.65

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE CIENCIAS**



**OBTENCION DE EMBRIOGENESIS SOMATICA  
EN PALMA DE COCO  
(Cocos nucifera L.)**

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
**B I O L O G O**  
**P R E S E N T A :**  
**MA. GUADALUPE ESPINOSA OSORNIO**

**FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## CONTENIDO

Indice de cuadros .....	iii
Indice de figuras.....	v
Resumen.....	vii
1. INTRODUCCION.....	1
2. REVISION DE LITERATURA.....	5
2.1. Origen y variedades de la palma de coco.....	5
2.2. Importancia económica.....	8
2.3. Amarillamiento letal.....	9
2.4. Cultivo de tejidos.....	13
3. MATERIALES Y METODOS.....	18
3.1. Material biológico.....	18
3.2. Preparación de medios de cultivo.....	18
3.3. Desinfección del material biológico.....	20
3.4. Efecto de antioxidantes y adsoeventes para el control de la oxidación.....	23
3.5. Selección de explantes para la inducción de callos...	25
3.6. Inducción y mantenimiento de callos.....	26
3.7. Inducción de embriones somáticos.....	27
3.8. Análisis anatómico.....	29
4. RESULTADOS Y DISCUSION.....	30
4.1. Desinfección del material biológico.....	30
4.2. El empleo de antioxidantes y adsorbentes para el control de la oxidación.....	34
4.3. Selección de explantes para la inducción de callos...	44
4.4. Inducción y mantenimiento de callos.....	47
4.5. Inducción de embriones somáticos.....	50

4.6. Análisis anatómico.....	52
5. CONCLUSIONES.....	55
6. BIBLIOGRAFIA.....	56

## INDICE DE CUADROS

Cuadro		pag.
1	Principales características de las variedades de palma de coco.....	7
2	Composición del medio de cultivo MS-Y3.....	19
3	Tratamientos de desinfección superficial para cinco diferentes explantes de palma de coco.....	20
4	Tratamientos de desinfección superficial para el explante de raíz de palma de coco.....	22
5	Tratamientos de desinfección superficial para el explante de tallo de palma de coco.....	23
6	Tratamientos de antioxidantes y adsorbentes para el control de la oxidación en tejidos <i>in vitro</i> de palma de coco.....	24
7	Tratamientos de auxinas y citocininas (M) para la inducción de callos a partir de diferentes explantes de palma de coco.....	25
8	Tratamientos de auxinas y citocininas (M) para la inducción de callos a partir de tallo y pedicelo de palma de coco.....	27
9	Tratamientos de reducción de 2,4-D para la inducción de embriones somáticos a partir de callos de tallo y pedicelo de palma de coco.....	28
10	Contaminación (%) en seis tratamientos de desinfección para diferentes explantes de palma de coco.....	31

11	Contaminación (%) en diferentes tratamientos de desinfección para raíz y tallo de palma de coco.....	32
12	Diferencias estadísticas para ocho tratamientos para el control de la oxidación en cuatro diferentes explantes de palma de coco, a los 5, 10 y 15 días de cultivo <i>in vitro</i> .....	43
13	Grado de proliferación celular y oxidación para cuatro explantes de palma de coco.....	46
14	Incremento en peso fresco (%) y proliferación celular del cultivo <i>in vitro</i> de tallo y pedicelo de palma de coco.....	48
15	Inducción de callos (%) en siete tratamientos de combinaciones de reguladores de crecimiento para tallo de palma de coco.....	50
16	Formación de protuberancias (%) en callos de palma de coco en siete tratamientos con disminución de la concentración de 2,4-D.....	51

## INDICE DE FIGURAS

Figura		pag.
1	Sitios de la península de Yucatán donde se han localizado focos de infección de Amarillamiento letal. 1984-1985 (Villanueva et.al. 1987).....	10
2	Estados de la República Mexicana en donde se han colectado adultos de <i>Myndus crudus</i> , 1984-1986. (Villanueva et.al. 1987).....	12
3	Corte longitudinal de plántula de palma de coco y fuente del material biológico para los cultivos <i>in vitro</i> .....	21
4	Grado de oxidación para cuatro diferentes explantes de palma de coco en condiciones <i>in vitro</i> a los 15 días de cultivo.....	36
5	Oxidación de explantes de raquis de palma de coco cultivados <i>in vitro</i> en ocho tratamientos diferentes durante 15 días.....	37
6	Oxidación de explantes de pedicelo de palma de coco cultivados <i>in vitro</i> en ocho tratamientos diferentes durante 15 días.....	38
7	Oxidación de explantes de tallo de palma de coco cultivados <i>in vitro</i> en ocho tratamientos diferentes durante 15 días.....	39
8	Explantes de raquis, pedicelo, tallo y hoja de palma de coco (%), cultivados en medio con carbón activado que presentan incipiente o nula oxidación, para condiciones de fotoperiodo y	

	obscuriad.....	42
9	Zonas meristemáticas obtenidas a partir de callos de tallo de palma de coco.....	54
10	Estructuras similares a embriones somáticos obtenidas a partir de callos de tallo de palma de coco.....	54



## RESUMEN

La palma de coco (*Cocos nucifera* L.) es un importante cultivo oleaginoso que actualmente se encuentra amenazado por el amarillamiento letal, enfermedad presente en la Península de Yucatán y que se dispersa rápidamente hacia otras zonas de México. Como una alternativa para su control se contempla la propagación de palmas híbridas resistentes, por medio de las técnicas de Cultivo de Tejidos Vegetales. Por lo cual en el presente trabajo se promovió la formación de callos y estructuras embriogénicas a partir de palmas de coco altas, para una vez establecida la metodología poder emplearla con palmas híbridas.

Se estableció el cultivo aseptico para tallo, pedicelo, raquis y lámina foliar utilizando hipoclorito de sodio en su presentación comercial al 50% durante 30 min. para tallo y al 30% durante 15 min. para los otros explantes. Para los cuatro diferentes tipos de tejido se probaron dos adsorbentes y un antioxidante con el objeto de controlar la oxidación en condiciones *in vitro*, encontrando un mejor control con el empleo de carbón activado al 1% en condiciones de obscuridad. Posteriormente se probaron 15 diferentes combinaciones de Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D) con Cinetina (K), Bencilaminopurina (6BAP) ó libre de citocininas para determinar la respuesta de los diferentes explantes para la formación de callos, encontrando que lámina foliar y raquis no presentaron respuesta alguna durante 50 días de cultivo, pedicelo mostró poca proliferación celular, mientras que tallo mostró proliferación celular media y formación de callos poco friables en los tratamientos con 2,4-D  $1 \times 10^{-4}$  y  $1 \times 10^{-5}$  M solo o combinado con citocininas. Los callos de tallo fueron subcultivados en medio de cultivo con reducción gradual de la concentración de 2,4-D en condiciones de fotoperiodo (16-8 h). Por medio de análisis anatómico se observaron estructuras similares a las reportadas como embriones somáticos en callos crecidos inicialmente en 2,4-D  $1 \times 10^{-4}$  M libre de citocininas.

## INTRODUCCION

La palma de coco (*Cocos nucifera* L.) es una importante planta oleaginosa capaz de alcanzar altos rendimientos en condiciones de pobreza de suelos y escasez de agua, superando con esto a los demas cultivos oleaginosos, su produccion mundial oscila alrededor de los 35 millones de toneladas de copra al año (Branton and Blake, 1983) y su demanda es siempre creciente, esto la coloca como un importante factor en la economia de los paises productores que son aquellos con climas tropicales y que además se encuentran en vias de desarrollo como la India, Jamaica y México entre otros.

En México se calcula que por lo menos 50 mil familias campesinas dependen directamente de este cultivo (Villanueva et.al., 1987). Sin embargo, la producción nacional ha tenido un importante decremento, de un rendimiento de 2.8 toneladas de copra por hectárea en 1963, disminuyó a una tonelada por hectárea desde 1980, con producciones anuales de 180 mil toneladas (1986), el 20% de ésta es aportada por el estado de Tabasco para quién representa uno de sus principales cultivos (INEGI, 1987 ; Salcedo, 1986).

La producción de copra se ha visto afectada, tanto por la poca homogeneidad genética de las poblaciones de palmas ocasionada por su polinización cruzada, como por su propagación que es solo por semilla no seleccionada (Davis, 1969), sin embargo, en la actualidad existe un problema mas grave, que es el Amarillamiento Letal, enfermedad que se encuentra presente en la Península de Yucatán y que ha provocado la muerte de mas de 300 mil palmas en tan solo cinco años y que ha sido reportada en el Caribe, la costa oeste de Africa y Estados Unidos (Villanueva et.al., 1985).

El Amarillamiento Letal es causado por un micoplasma que se hospeda en el floema de las palmas y su vector es la chicharrita *Myndus crudus* Van Duzze (Howard et.al. 1983a). Ocasiona la muerte de las palmas después de cuatro a seis meses que se han presentado

los primeros síntomas, que suelen ser el amarillamiento foliar y la caída de los frutos de todos tamaños (Villanueva et.al., 1985 ; Waters, 1980).

Su control se ha estado llevando a cabo por medio de inyecciones de tetraciclina o sus derivados cada tres o cuatro meses, resultando incosteable para las plantaciones comerciales, en donde el 95% de las palmas empladas son de variedades altas, las cuales producen copra de buena calidad pero son todas susceptibles al Amarillamiento Letal (Davis, 1969 ; Waters, 1980 ; Howard, 1983b ; McCoy, 1982 ).

Otra alternativa es el control del vector, cuyas poblaciones disminuyen con la aplicación periódica de ciertos insecticidas, pero además de dañar seriamente la ecología del lugar resulta sumamente costoso. En lo que se refiere al control biológico de la chicharrita, no se han logrado avances a la fecha, ya que no ha sido posible determinar cuales organismos son depredadores o competidores importantes de ésta (Villanueva et.al., 1985). En México la presencia de esta chicharrita se ha confirmado en los estados de Quintana Roo, Yucatán, Tabasco, Chiapas, Oaxaca, Veracruz, Guerrero, Colima y Sinaloa (Villanueva et.al. 1987).

Otra opción podría ser el empleo de variedades resistentes, sobre todo el enano malayo rojo, lamentablemente éstas presentan grandes inconvenientes para ser empladas a nivel comercial, ya que son poco tolerantes tanto a la escasez de agua como a la de nutrientes en los suelos, además su copra no es de buena calidad y su producción es menor. No obstante, existe otra alternativa que es el empleo de palmas híbridas de los altos por enano malayo, los cuales heredan de sus progenitores altos la resistencia a suelos pobres y escasez de agua, así como la buena calidad de su copra y de sus progenitores enanos la resistencia al Amarillamiento Letal, sin embargo su propagación requiere de un largo período de tiempo, ya que solo puede realizarse por medio de semilla (Fremont et.al. 1975)

El largo período de propagación tradicional de estas palmas híbridas es un grave inconveniente, ya que el Amarillamiento Letal se dispersa rápidamente desde la península hacia otras zonas (aprox. 75 km./año) por lo que es necesario buscar alternativas a estos métodos.

Por esto se considera necesario implementar una estrategia que permita su propagación a gran escala en períodos de tiempo mucho mas reducidos y como una opción a ello se plantea el uso de las técnicas de Cultivo de Tejidos Vegetales, ya que hacen posible una rápida multiplicación vegetal, pues de una pequeña cantidad de tejido potencialmente pueden regenerarse una gran cantidad de plantas, representando una alternativa en la propagación de especies de difícil multiplicación o que carecen de reproducción asexual, facilitan el incremento de un genotipo en corto tiempo por lo que la multiplicación a gran escala puede realizarse en tiempos y espacios reducidos resultando costeables, permiten un mejor control de la sanidad del material propagado, lo cual consecuentemente ayuda a tener menos restricciones al transportar materiales bajo condiciones *in vitro* hacia otros países (Villalobos, 1985 ; Villalobos y Thorpe, 1985).

En consideración a lo anterior se planteó como objetivo general de este trabajo el establecimiento de la metodología inicial de propagación *in vitro* a partir de palmas altas del estado de Tabasco para después ser extrapolada a híbridos resistentes. La idea de realizar el trabajo con palmas altas es debido al alto valor genético de los híbridos, reservandolos así, solo para validar la metodología una vez establecida.

Con el fin de establecer dicha metodología se plantearon los siguientes objetivos particulares:

- Establecer la metodología de desinfección para obtener cultivos asépticos a partir de diferentes fuentes de material biológico de plántulas de palma de coco.
- Determinar las condiciones óptimas para controlar la oxidación en los diferentes explantes en condiciones *in vitro*.
- Inducir y mantener la formación de callos mediante el empleo de diferentes combinaciones auxina-citocinina.
- Establecer las condiciones para el desarrollo de estructuras embriogénicas a partir de callos.

## REVISION DE LITERATURA

### 2.1. Origen y variedades de la palma de coco

La palma de coco (*Cocos nucifera* L.) es una de las dos únicas especies importantes en su género, pues además de ser oleaginosa es también una planta ornamental, cuyo origen parece estar situado en el sureste asiático pero que en la actualidad se encuentra distribuida en la zona intertropical de todo el mundo (Fremont et.al., 1975 ; Howard, 1983b).

Esta oleaginosa, con base en su caracter reproductivo se encuentra dividida en dos grandes grupos o variedades, las altas que son alógamas y las enanas que son autógamas, diferencia debida principalmente a su biología floral (Davis, 1969 ; Fremont et.al., 1975 ; Sangare et.al. 1978).

Las variedades enanas poseen un estípote delgado, cuya máxima altura posible es de doce metros, sus tejidos son mas suculentos que los de las variedades altas y como consecuencia mas susceptibles al ataque de insectos chupadores, pulgones y escamas, su vida productiva la inician a los tres o cuatro años, producen un gran número de pequeñas nueces cuya copra suele ser de baja a mediana calidad, además son poco tolerantes a sequia, pobreza de los suelos y heladas, lo que los hace poco convenientes para plantaciones comerciales (Davis, 1969 ; Fremont et.al. 1975).

Existen cocoteros enanos de tres colores: Los rojos, considerados como los que producen la copra de menor calidad, pero son los mas resistentes a la enfermedad conocida como Amarillamiento Letal ; Los amarillos, que son los mas susceptibles a condiciones desfavorables de clima y suelo; Y los verdes, que son los mas parecidos a las variedades altas, siendo también los menos homogéneos entre los enanos, pues no son autógamos estrictos (Fremont et.al. 1975 ; Sangare et.al. 1978).

En plantaciones comerciales, al menos el 95% de las palmas empleadas son de variedades altas: el Alto de Jamaica en el Caribe y las costas del golfo de México, el "Criollo" en Cuba, el Alto Oeste Africano en Africa y el Alto de Panamá en las costas americanas del Pacífico desde México hasta Perú, esto debido principalmente a la buena calidad de su copra y su resistencia a la escasez de agua y suelos pobres, cualidad que les permite alcanzar buenos rendimientos bajo condiciones en que ningún otro cultivo oleaginoso puede producir. Estas variedades inician su vida productiva a los seis o siete años, siempre son protándricos y sus tejidos son poco suculentos resultando tolerantes a insectos chupadores, pulgones y escamas, sin embargo son susceptibles al Amarillamiento Letal (Romney et.al., 1968 ; Davis, 1969 ; Fremond et.al., 1975).

Se han realizado cruza principalmente de Alto Oeste Africano, Alto Reinell ó Ato de Panamá por Enano Malayo Rojo, obteniendo híbridos que presentan características intermedias entre los altos y los enanos, son mas precoz que los altos empezando a producir a los cuatro o cinco años, su altura es intermedia y producen copra de buena calidad, además, existe una ganancia en el número de cocos por árbol y en la cantidad de copra por nuez, alcanzandose producciones de cinco a seis y media toneladas por hectárea al año, cifra que está muy por encima de la producción normal, presentan además, tolerancia a condiciones de sequia y escasez de nutrientes, tienen tejidos poco suculentos que resultan poco susceptibles al ataque de insectos chupadores, escamas y pulgones, su biología floral es también mas parecida a la de las variedades altas, siendo su reproducción principalmente alógama, en tanto que de sus progenitores enanos heredan la resistencia al Amarillamiento Letal. En el cuadro 1 se muestran comparativamente las principales características de estas variedades (Romney et.al. 1968 ; Fremond et.al., 1975 ; Sangare et.al., 1978 ; Chang, 1979).

Cuadro 1. Principales características de las variedades de palma de coco.

Característica	Altos	Enanos	Híbridos
susceptibilidad a pobreza de suelos	baja	alta	baja
susceptibilidad a escasez de agua	baja	alta	baja
susceptibilidad a insectos chupadores	baja	alta	baja
susceptibilidad a Amarillamiento Letal	alta	baja	alta
calidad de la copra	buena	media-baja	buena
precicidad (años)	6-7	3-4	4-5
nueces/ton.copra (miles)	4-6	9 o mas	5-7
reproducción	alógama	autógama	alógama

\* Modificado de Romney et.al. (1968) How to growth better coconuts. FAO,Roma.



## 2.2. Importancia económica

La palma de coco se cultiva en casi todos los países con climas tropicales, entre los que destaca México que ocupa el séptimo lugar en producción mundial (FAO, 1979) y el primero en América (Salcedo, 1986). El país dedica cerca de 207 mil hectáreas de sus zonas costeras a este cultivo y se calcula que al menos 50 mil familias campesinas dependen directamente de éste, sin considerar a obreros y trabajadores de áreas afines (Villanueva et.al. 1985). Tanto el cultivo de coco como la actividad coprera se concentra principalmente en tres estados: Guerrero, Colima y Tabasco (Salcedo, 1986).

En el estado de Tabasco este cultivo ocupa el tercer lugar en importancia por superficie cosechada, superado solamente por el maíz y el cacao, ocupando 27900 hectáreas repartidas en los municipios de Cárdenas, Centla, Centro, Comalcalco, Jalpa de Méndez, Nacajuca y Paraiso, el 75% de la superficie dedicada a coco se concentra en los municipios de Paraiso, Centla y Cárdenas, en donde se ubican el 70% de los copreros del estado, los cuales según la SARH en 1978 sumaban ya 140 mil (Salcedo, 1986 ; INEGI, 1897).

El rendimiento promedio del estado es de 0.99 ton./Ha. (INEGI, 1987) y la producción anual estatal equivale a casi el 20% de la producción nacional (INEGI, 1987 ; Salcedo, 1986).

### 2.3. Amarillamiento Letal

El nombre de Amarillamiento Letal fue propuesto por Nutman y Robert en 1955 para substituir el término de enfermedad desconocida del cocotero como se le llamaba hasta entonces a esta enfermedad que se ha reportado desde 1834 en las Islas Caimán y 1872 en Jamaica (Fremont et.al. 1975 ; Howard, 1983).

Sus síntomas corresponden a la caída de los frutos de todos los tamaños acompañada por la necrosis de las inflorescencias y amarillamiento foliar, así como la degeneración de la raíz con la consiguiente desecación de la planta, que finalmente muere de cuatro a seis meses después de que se han presentado los primeros síntomas (Fremont et.al., 1975 ; Villanueva et.al. 1985 y 1987).

Además de la palma de coco, existen al menos otras treinta especies de palmas afectadas por esta enfermedad, entre las mas importantes económicamente se encuentran la palma de aceite (*Elaeis guineensis* L.), la palma datilera (*Phoenix dactylifera* L.) y la palma manila (*Veitchia merrillii* L.) (Howard et.al., 1983a).

El Amarillamiento Letal se encuentra distribuido en todo el mundo, se ha reportado en las Islas Caimán, Cuba, Haití, República Dominicana, Jamaica, Bahamas, en Florida y Texas en los Estados Unidos, Camerún, Ghana, Togo, Nigeria, Tanzania y en México, en donde fue reportada por primera vez en 1981 en el estado de Quintana Roo, actualmente se ha distribuido por este estado y Yucatán (Fig. 1) desde donde avanza rápidamente hacia otras zonas, siguiendo los dos patrones de distribución señalados por Tsai en 1980 (Howard, 1983b ; Villanueva et.al., 1985 y 1987).

Una característica común de todos los lugares donde se ha presentado el Amarillamiento Letal son las cuantiosas pérdidas ocasionadas, en Jamaica en los últimos 20 años se han perdido mas de ocho millones de palmas, en Florida en tan solo cuatro años las pérdidas ascienden a mas de medio millón de palmas y en México, de

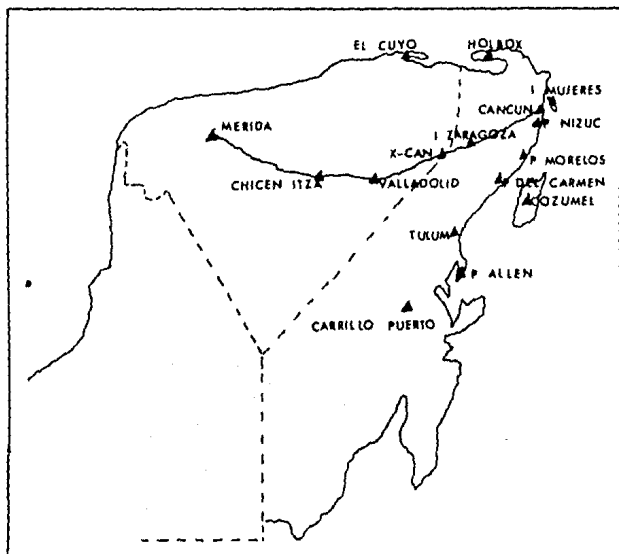


Fig. 1. Sitios de la Península de Yucatán donde se han localizado focos de infección de Amarillamiento Letal. 1984-1985. (Villanueva, et.al. 1987).

1981 a la fecha las pérdidas ascienden a más de 300 mil palmas en la Península de Yucatán (Howard, 1983b ; Villanueva et.al. 1985).

El agente causal de esta enfermedad fue identificado hasta 1972 como un organismo de tipo micoplasma, se hospeda en los tubos cribosos y las células acompañantes del floema de las palmas. Estos organismos procariontes carecen de pared celular rígida, requieren de esteroides (principalmente colesterol) para la formación de su membrana lipoproteica, son resistentes a la penicilina pero susceptibles a la actinomicina y tetraciclina (Pinto, 1981 ; Howard, 1983b ; Villanueva et.al. 1985).

El insecto vector es un homoptero de la familia Cixiidae llamado *Myndus crudus* Van Duzze, la transmisión de la enfermedad por la chicharrita fue comprobada por Howard en 1983, después de un gran número de pruebas realizadas en Jamaica y Florida (Dollet, 1977 ; Howard et.al. 1983a ; Villanueva et.al. 1985 ; Johnson et.al. 1978).

En México se ha comprobado la presencia de *M. crudus* en los estados de Quintana Roo, Veracruz, Campeche, Oaxaca, Colima, Yucatán, Guerrero, Tabasco, Chiapas, Sinaloa, Baja California Sur y Morelos (Fig. 2), es decir en casi todos los estados copreros, por lo que el Amarillamiento Letal resulta ser un problema potencial que no puede ser pasado por alto (Villanueva et.al., 1987).

El control de esta enfermedad puede realizarse por medio de antibióticos de tetraciclina o sus derivados, inyectados directamente sobre el tallo de la palma, sin embargo es necesario repetir la aplicación tres o cuatro veces al año para mantener con vida a la planta, lo cual resulta incosteable en plantaciones comerciales, siendo aplicable solo a palmas de alto valor estimativo como las que se encuentran en zonas residenciales u hoteleras, esta medida es poco recomendable por los efectos fitotóxicos de los medicamentos, además de que representan la conservación de focos de infección (Waters, 1980 ; McCoy, 1982 ;



Fig. 2. Estados de la República Mexicana en donde se han colectado adultos de Myndus crudus, 1984-1986. (Villanueva, et.al., 1987).

Villanueva et.al., 1985). Por otro lado, con el uso de insecticidas como el Diazenon o el Dimetoato se ha logrado mantener bajas las poblaciones de chicharrita, reduciendo así la incidencia de la enfermedad, pero también es necesaria la aplicación constante de estos productos, lo cual tampoco es redituable en zonas copreras. Se ha contemplado también la posibilidad del control biológico del vector, pero la falta de enemigos naturales importantes no ha permitido obtener avances (Villanueva et.al. 1985 y 1987)

Otra opción para el control de la enfermedad es el empleo de variedades enanas, las cuales son resistentes a ésta, pero su alta susceptibilidad a condiciones desfavorables del medio y la baja calidad de su copra no las hacen recomendables para plantaciones comerciales, resultando ser más conveniente el uso de palmas híbridas, ya que como se muestra en el cuadro 1, además de producir copra de buena calidad son resistentes a las condiciones adversas del medio y al Amarillamiento Letal, con el inconveniente del tiempo que se requiere para su propagación, ya que esta solo puede ser realizada por vía semilla, debido a que la palma de coco carece de métodos de reproducción asexual (Romney et.al., 1968 ; Davis, 1969 ; Fremont et.al., 1975 ; Blake and Eeuwens, 1982).

#### 2.4. Cultivo de Tejidos

Las técnicas de Cultivo de Tejidos Vegetales pueden ser consideradas simplemente como otro método de propagación clonal con ventajas sobre los métodos tradicionales debido a que : a) permiten establecer tasas de multiplicación substancialmente altas, de hasta millones de plantas a partir de una pequeña cantidad de tejido ; b) se puede incrementar en poco tiempo el número de plantas obtenidas de un genotipo, logrando así poblaciones homogéneas ; c) es factible propagar gran cantidad de plantas en espacios reducidos a bajos costos ; d) es posible tener un mejor control de la sanidad del material biológico en

condiciones *in vitro* ; además de que el material puede ser transportado de un país a otro con menos restricciones aduanales ; f) es un sistema muy eficiente para especies difíciles de propagar por métodos tradicionales, especialmente para aquellas que carecen de reproducción asexual como es el caso de la palma de coco (Tisserat, 1977 ; Ong, 1977 ; Murashige, 1977 ; Villalobos, 1985). Estas técnicas se presentan como una alternativa al problema del Amarillamiento Letal, para la propagación de híbridos resistentes (Tisserat, 1977 ; Ong, 1977).

La propagación *in vitro* puede lograrse mediante dos diferentes procesos morfogénéticos, la organogénesis y la embriogénesis ; en la primera existe la formación directa de órganos o tejidos diferenciados a partir con células con características meristemáticas (callos), generalmente se obtienen brotes adventivos o raíces. En la embriogénesis existe la formación de estructuras bipolares semejantes a embriones cigóticos llamados embriones asexuales, embrioides o embriones somáticos, debido a que se desarrollan de células somáticas. Estos presentan un desarrollo similar a los embriones sexuales, originando directamente una planta completa con sus dos meristemas primarios (Murashige, 1974)

La embriogénesis somática como vía de propagación guarda un gran potencial por su alta eficiencia, en palma datilera por ejemplo, se ha demostrado que en solo ocho semanas de cultivo pueden obtenerse 500 embriones somáticos partiendo de una pieza de medio gramo de callo embriogénico (Tisserat, 1988). Además de que permite obtener poblaciones homogéneas difíciles de lograr en muchos cultivos, como en la palma de aceite (*E. guineensis*) cuyas poblaciones obtenidas por esta vía han mostrado una variabilidad mucho menor a la existente en las poblaciones provenientes de semilla, y con menos del 0.15% de plantas anormales (Corley et.al., 1979 ; Kheng, 1981 ; Branton and Blake, 1893)

Algunas especies son capaces de formar estructuras embrionarias directamente a partir de varios tipos celulares,

otras en cambio requieren pasar por una fase de callo para poder producir las, esto debido a características genéticas que aún no son bien conocidas (Sharp, 1980). En palmas para obtener embriones somáticos es necesario el desarrollo previo de callos, lo cual se ha logrado ya en más de cuarenta especies, entre las más importantes están la palma de aceite (*E. guineensis*), la palma datilera (*P. dactylifera*), la palma manila (*V. merrillii*) y la palma de coco (*C. nucifera* L.) (Eeuwens, 1976 ; Blake and Eeuwens, 1982 ; Reynolds and Murashige, 1979 ; Amir, 1983 ; Srinivasan et.al., 1985 ; Bhalla-Sarin et.al., 1986 ; Tisserat, 1988).

En palmas y en otras especies tropicales o frutales para establecer el cultivo *in vitro* deben de solucionarse además del problema de desinfección, también la oxidación del explante ya que producen una gran cantidad de polifenol-oxidasas, que al ser liberadas al medio ocasionan el necrozamiento y la muerte de los explantes, por lo que es necesario recurrir al uso de productos químicos como antioxidantes y adsorbentes que permiten el desarrollo de los tejidos controlando la oxidación. Para palma datilera se ha probado la acción del carbón activado, la polivinilpirrolidona (PVP), el ácido ascórbico y la cisteína, encontrándose un mejor control de la oxidación y un mayor porcentaje de morfogénesis cuando se emplea carbón activado, además de que la cisteína en altas concentraciones resulta tóxica para el tejido (Tisserat, 1979 ; Sharma et.al., 1980). En palma de coco también se ha observado la necesidad de emplear carbón activado para la inducción de callos, por lo que varios autores lo adicionan como parte indispensable del medio de cultivo (Eeuwens, 1976 ; Blake and Eeuwens, 1982 ; Gupta et.al., 1984 ; Branton and Blake, 1983 y 1986 ; Kumar et.al., 1985). Se menciona además que existe un incremento de la oxidación en medio adicionado con reguladores de crecimiento y al menos en palma de aceite se ha probado que la oxidación es mayor cuando se emplea 6-Bencil aminopurina (6BAP) que cuando se emplea cinetina (K) (Rabéchaux et.al., 1976).



Los callos obtenidos en las diferentes especies de palmas han mostrado siempre un crecimiento inicial muy lento, siendo necesarias de cuatro a ocho semanas de cultivo y altas concentraciones de auxina para su iniciación. La frecuencia de inducción suele ser baja, del 10 al 20% aunque en algunas especies llega a ser del 40 al 100%, de manera general se presenta además de la iniciación de los callos, el crecimiento del explante (Bhalla-Sarin et.al., 1986 ; Tisserat, 1988).

Los callos suelen ser duros y nodulares, sin embargo es posible por medio de subcultivos aumentar su friabilidad, obteniendo finalmente dos diferentes tipos de tejido: uno es la parte friable, que puede o no ser embriogénica siendo en ocasiones inestable genéticamente, el otro tipo lo constituyen los cuerpos nodulares, los cuales suelen ser la fuente de los embriones somáticos (Bhalla-Sarin et.al., 1986 ; Tisserat, 1979 y 1988).

Las fuentes de material biológico mas frecuentemente empleadas para la obtención de callos en coco son: trozos de tallo, raquis y raquidios de inflorescencias, meristemas apicales, hojas jóvenes y cotiledones (Eeuwens, 1976 ; Apavatjirut and Blake, 1977 ; Blake and Eeuwens, 1982 ; Amir, 1983 ; Gupta et.al., 1984 ; Srinivasan et.al., 1985 ; Branton and Blake, 1986 ; Bhalla-Sarin et.al. 1986) Generalmente estos explantes se cultivan en el medio MS de Murashige y Skoog (1962), o en el Y3 desarrollado por Eeuwens (1976) específicamente para palma de coco, el cual difiere del primero en su alto contenido de yodo y potasio, es también común el uso de una mezcla de estos dos medios, utilizando los macronutrientes del MS y los micronutrientes del Y3. Este mismo medio se emplea para las tres fases de propagación ; establecimiento e inducción de callos, multiplicación y mantenimiento de estos y obtención de estructuras diferenciadas (Eeuwens, 1976 ; Blake and Eeuwens, 1982 ; Amir, 1983 ; Gupta et.al., 1984 ; Branton and Blake, 1983 y 1986 ; Kumar et.al. 1985 ; Tisserat, 1988).

La obtención de callos de palma de coco requiere de una alta concentración de auxina, generalmente Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D) en concentraciones de  $1 \times 10^{-4}$  a  $1 \times 10^{-6}$  habiendo encontrado que niveles de  $1 \times 10^{-3}$  resultan tóxicos para los explantes, ocasionalmente también se emplea Ácido indol acético (IAA) en concentraciones similares, estas auxinas frecuentemente se combinan con cinetina (K), 6-Bencilaminopurina (6BAP), Ácido naftalenacético (NAA) ó 2-Isopentiladenina (2ip) a concentraciones mas bajas que el 2,4-D ó IAA. Obteniendo callos en un proceso lento como es habitual en las palmas, los cuales son nodulares y poco friables (Eeuwens, 1976 ; Apavatjirut and Blake, 1977 ; Blake Eeuwens, 1982 ; Branton and Blake, 1983 ; Gupta et.al., 1984 ; Kumar et.al., 1985 ; Srinivasan et.al., 1985; Bhalla-Sarin et.al., 1986 ; Tisserat, 1988).

Es frecuente que al subcultivar los callos de palma de coco en medio de igual composición con concentraciones cada vez mas bajas de 2,4-D en condiciones de fotoperíodo, se desarrollen estructuras similares a embriones somáticos, siendo posible llegar a estadios tempranos y mantenerlos por algún tiempo, pero no desarrollarlos a estadios tardios (Branton and Blake, 1983 y 1986 ; Gupta et.al., 1984 ; Srinivasan et.al., 1985).

En embriones cigóticos de palma de coco se ha observado que el factor decisivo para que se desarrollen *in vitro* es el estadio en que se encuentran al iniciar el cultivo, ya que embriones de estadios tempranos no logran desarrollarse hasta plantas completas mientras que embriones de estadios tardios sí lo logran (Gupta et.al., 1984).

### 3. MATERIALES Y METODOS

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Centro de Enseñanza, Investigación y Capacitación para el Desarrollo Agropecuario, Forestal y Acuicola del Sureste (CEICADES), del Colegio de Postgraduados, ubicado en el Recinto-Huimanguillo, en Cárdenas, Tabasco.

#### 3.1. Material Biológico

Las plántulas de palma de coco (*Cocos nucifera* L.) empleadas, fueron selecciones de material de la zona donadas por el Campo Agrícola Experimental Auxiliar "Comalcalco" del INIA en Comalcalco, Tabasco. De estas plántulas se utilizó la parte basal de las hojas (pedicelo, raquis y lámina foliar) así como las raíces que se encuentran aún cubiertas por el fruto y el tallo.

#### 3.2. Preparación de medios de Cultivo

Se utilizó como medio basal la combinación de los macronutrientes del medio de Murashige y Skoog (MS) (1962), y los micronutrientes del medio de Eeuwens (Y3) (1976), por lo que al medio se le denominó MS-Y3 (Cuadro 2), fue adicionado con 1000 mgL<sup>-1</sup> de meso inositol (Baker), 5 mgL<sup>-1</sup> de tiamina.HCl (Eastman), 5 mgL<sup>-1</sup> de piridoxina.HCl (Eastman), 0.5 mgL<sup>-1</sup> de Ácido nicotínico (Eastman), 0.5 mgL<sup>-1</sup> de biotina (ICN), 45,000 mgL<sup>-1</sup> de sacarosa (Merck), 10,000 mgL<sup>-1</sup> de carbón activado (Merck), 10,000 mgL<sup>-1</sup> de agar-agar (Merck). Se ajustó el pH a 5.7 con HCl ó NaOCl 0.1 M según se requirió, sirviéndose en frascos de alimento infantil con tapa de polipropileno ( 15 ml. por frasco ), la esterilización se realizó en autoclave durante 15 min. a 120°C y 1.5 Kg.cm2<sup>-1</sup> de presión.

Cuadro 2. Composición del medio de cultivo MS-Y3 ( $\text{mgL}^{-1}$ )

Compuesto	Fórmula	cantidad
Nitrato de amonio	$\text{NH}_4\text{NO}_3$	1650.00
Nitrato de potasio	$\text{KNO}_3$	1900.00
Cloruro de calcio hidratado	$\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	440.00
Sulfato de magnesio heptahidratado	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370.00
Fosfato de potasio	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	170.00
Fe.EDTA		32.50
Sulfato de manganeso tetrahidratado	$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	11.20
Yoduro de potasio	KI	8.30
Sulfato de zinc	$\text{ZnSO}_4$	7.20
Acido bórico	$\text{H}_3\text{BO}_3$	3.10
Cloruro de cobalto hexahidratado	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.24
Molibdato de sodio dihidratado	$\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.24
Sulfato de cobre pentahidratado	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.16

### 3.3. Desinfección del material biológico

En la preparación del material biológico para su desinfección se disectó la parte basal de la plántula, obteniendo un cilindro de aproximadamente 10 cm. de largo, el cual contenía el tallo y la parte basal de las hojas jóvenes (Fig. 3), se disectó también la parte de las raíces que se encuentran inmersas en las fibras del fruto.

El cilindro y las raíces se lavaron con detergente, enjuagandolas con agua corriente, procediendo a la desinfección con el correspondiente tratamiento de NaOCl (Hipoclorito de sodio en su presentación comercial "Cloralex") bajo condiciones asépticas, enjuagando con agua destilada tres veces.

Se emplearon inicialmente tres concentraciones de cloralex durante dos diferentes períodos de tiempo de exposición, obteniendo los seis tratamientos que se muestran en el cuadro 3. Por su fácil disección se manejaron por separado los tejidos de tallo y raíz, mientras que el pedicelo, el raquis y la lámina foliar se desinfectaron juntos en el cilindro disectado.

Cuadro 3. Tratamientos de desinfección superficial para cinco diferentes explantes de palma de coco.

tiempo (min.)	Solución comercial NaOCl (%) (v/v)		
	10	20	30
15	A	B	C
20	D	E	F

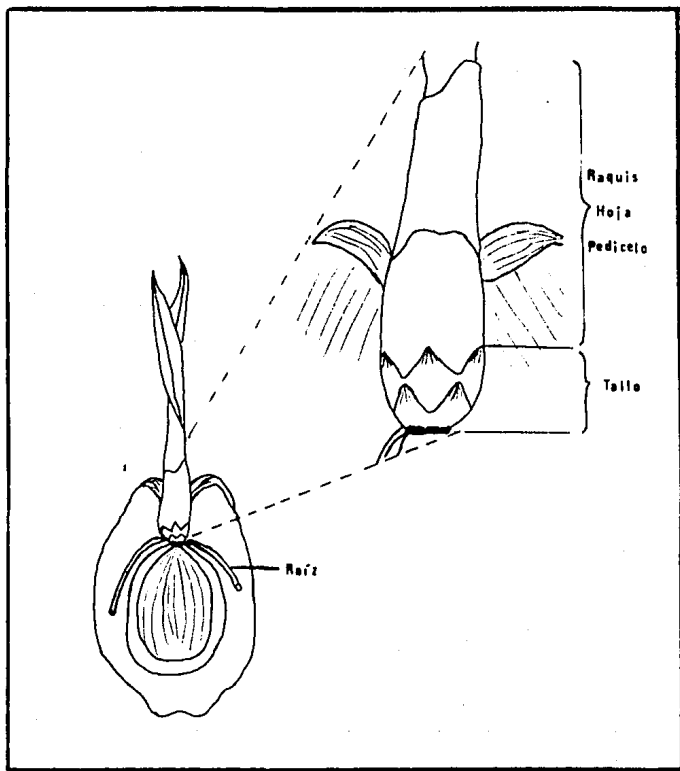


Fig. 3. Corte longitudinal de plántula de palma de coco y fuente del material biológico para los cultivos in vitro.

La región de la raíz utilizada fue la que aún no presenta muchas fibras, permaneciendo suave. Esta fue fragmentada en círculos de aproximadamente 0.5 cm. de diámetro y de 0.3 a 0.5 cm. de grosor, sembrando tres círculos por frasco.

En el caso de tallo, este fue cortado en círculos de 2 a 3 cm. de diámetro con 0.3 a 0.5 cm. de grosor, estos círculos fueron seccionados en seis partes iguales, sembrándose uno por frasco.

El raquis, pedicelo y lámina foliar que fueron disectados en un mismo cilindro se separaron después de su desinfección manejándose independientemente. Tanto el raquis como el pedicelo se fragmentaron en trozos de 0.3 a 0.5 cm. de grosor, sembrándose tres explantes por frasco.

La lámina foliar se sembró en cuadros de aproximadamente 0.5 x 0.5 cm., cuatro por frasco, dos de ellos con el haz en contacto con el medio y los otros dos perpendiculares a éste.

Además de los seis tratamientos señalados se probaron otros cinco para el caso de raíz y cuatro para tallo, en los cuales se aumentó el tiempo de exposición al cloralox, su concentración o bien ambas variables, tiempo y concentración. (Cuadros 4 y 5).

Cuadro 4. Tratamientos de desinfección superficial para el explante de raíz de palma de coco.

tiempo (min.)	Solución comercial NaOCl (%) (v/v)			
	10	20	30	40
15	A	B	C	G
20	D	E	F	H
30	--	I	J	K

Cuadro 5. Tratamientos de desinfección superficial para el explante de tallo de palma de coco.

tiempo (min.)	Solución comercial NaOCl (%) (v/v)				
	10	20	30	40	50
15	A	B	C	--	--
20	D	E	F	--	--
30	--	--	J	K	L
35	--	--	--	M	--

El material vegetativo fue sembrado en frascos de alimento infantil con 15 ml. de medio MS-Y3 libre de reguladores de crecimiento y adicionado con los compuestos orgánicos descritos anteriormente. Para cada uno de los explantes se sembró un total de 30 frascos, considerando cada frasco como unidad experimental. Todos ellos fueron incubados en obscuridad a temperatura ambiente ( 29-32° C ), el parámetro evaluado fue el porcentaje de contaminación durante 15 días de cultivo.

#### 3.4. Efecto de antioxidantes y adsorbentes para el control de la oxidación

Para comprobar la eficiencia del carbón activado en el control de la oxidación de los tejidos cultivados *in vitro* debida a la liberación de polifenol-oxidasas en el medio, se emplearon explantes de tallo, pedicelo, rquis y lámina foliar en cada uno de los tratamientos. Estos consistieron en el uso de dos adsorbentes y un antioxidante, además de un grupo testigo, el cual estuvo libre de antioxidantes y adsorbentes (Cuadro 6.).



Cuadro 6. Tratamientos de antioxidantes y adsorbentes para el control de la oxidación en tejidos *in vitro* de palma de coco.

Tratamiento	Compuesto	mgL <sup>-1</sup>
T	Testigo	-----
A	Acido ascórbico	100
P	Polivinilpirrolidona (PVP)	1,000
C	Carbón activado	10,000

La disección de los explantes fue ya descrita, éstos se desinfectaron con cloralax al 50% durante 30 min. para tallo y al 30% durante 15 min. para los demás explantes.

Se sembraron tres explantes por cada frasco, con un total de 20 frascos por tratamiento, se incubaron 10 en completa obscuridad a temperatura ambiente ( 30-33° C ) y 10 en condiciones de fotoperíodo de 16 horas luz, también a temperatura ambiente ( 31-34° C ) dando como resultado ocho tratamientos, se consideró a cada uno de los explantes como una unidad experiemetal, es decir 30 por cada tratamiento.

El parámetro evaluado fue el porcentaje de oxidación, para lo cual se dieron valores cualitativos de 0 a 4, correspondiendo el 0 a explantes completamente sanos; 1 a explantes con poca oxidación, de hasta el 25% ; 2 a explantes con oxidación media (50%), cuando aproximadamente la mitad del explante mostraba oxidación, o bien la coloración total de éste era intermedia entre la inicial y el café negruzco ; 3 cuando la oxidación era severa, de aproximadamente 75% y ; 4 cuando la oxidación era total, es decir del 100%, presentando todo el explante color café negruzco.

Los resultados se analizaron mediante la prueba de Friedman (Infante y Zarate, 1988) y la prueba de comparaciones múltiples de Conover (1980).

### 3.5. Selección de explantes para la inducción de callos

Una vez establecidos los mejores tratamientos tanto para desinfección como para el control de la oxidación, se procedió a probar la capacidad de respuesta para la inducción de callos en los diferentes explantes.

Se probaron para los explantes de tallo, pedicelo, raquis y lámina foliar, quince tratamientos con diferentes combinaciones de reguladores de crecimiento, empleando cuatro diferentes concentraciones de auxina: ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y dos citocininas a la misma concentración: cinetina (K) y 6-bencilaminopurina (6BAP) como se muestra en el cuadro 7.

Cuadro 7. Tratamientos de auxinas y citocininas (M) para la inducción de callos a partir de diferentes explantes de palma de coco.

Citocininas	Auxina (2,4-D)				
	0	$1 \times 10^{-7}$	$1 \times 10^{-6}$	$1 \times 10^{-5}$	$1 \times 10^{-4}$
0	1	2	3	4	5
K $1 \times 10^{-6}$	6	7	8	9	10
6BAP $1 \times 10^{-6}$	11	12	13	14	15

La disección del material biológico se realizó de la manera acostumbrada, sembrándose en medio MS-Y3 adicionado con los reguladores de crecimiento correspondientes a cada tratamiento, utilizando un explante por frasco para el caso de tallo y tres explantes por frasco para pedicelo, raquis y lámina foliar, incubándose en completa oscuridad a temperatura ambiente (27-32°C) durante los 50 días que se mantuvo el cultivo, con subcultivos al medio basal cada 15 días.

Se emplearon 10 frascos por tratamiento para cada explante, considerando como unidad experimental a cada frasco. Los parámetros evaluados fueron ambos cualitativos observando la respuesta de los diferentes explantes para la inducción de callos, además de la oxidación de estos en medio adicionado con reguladores de crecimiento. Los valores para el parámetro de oxidación son los mismos utilizados en la etapa anterior y para inducción de callos se dieron valores de 0 a la ausencia de respuesta, 1 a la presencia de poca proliferación celular, 2 a proliferación media y 2+ a la presencia de algunos callos.

### 3.6. Inducción y mantenimiento de callos

Para la determinación de los mejores tratamientos de auxinas y citocininas en la inducción de callos se emplearon solamente explantes de tallo y pedicelo que fueron disectados, desinfectados y sembrados de la manera ya descrita, se sembraron en medio basal MS-Y3 adicionado con los reguladores de crecimiento indicados en el cuadro 7. Cada frasco contenía un explante de tallo o tres de pedicelo, la incubación se realizó en completa oscuridad a temperatura ambiente (27-33°C) durante 45 días, con un subcultivo a medio fresco de la misma composición a los 26 días, fraccionando los explantes con proliferación celular o con callo para promover su multiplicación.

El número de repeticiones fue de 30 frascos por tratamiento considerando a cada frasco como una unidad experimental, se evaluaron, cualitativamente la inducción de callos, asignando los mismos valores ya señalados para este parámetro y cuantitativamente el incremento porcentual en peso fresco a los 26 días. Para el caso de pedicelo se consideró como una observación al peso promedio de los tres explantes de cada frasco.

### 3.7. Inducción de embriones somáticos

Para promover la formación de embriones somáticos a partir de los callos, se sembraron explantes de tallo y pedicelo en los mejores tratamientos para inducción de callos (Cuadro 8).

Cuadro 8. Tratamientos de auxinas y citocininas (M) para la inducción de callos a partir de tallo y pedicelo de palma de coco.

Citocinina	Auxina ( 2,4-D )		
	$1 \times 10^{-6}$	$1 \times 10^{-5}$	$1 \times 10^{-4}$
0	--	4	5
K $1 \times 10^{-6}$	8	9	10
6BAP $1 \times 10^{-6}$	--	14	15

Se sembró inicialmente un total de 100 explantes para cada uno de los siete tratamientos, tanto para tallo como para pedicelo, con el fin de obtener un buen número de callos. Estos se mantuvieron en completa obscuridad durante los primeros 40 días de cultivo, con un subcultivo a medio basal de la misma composición a los 26 días, al finalizar el período de obscuridad los explantes

fueron subcultivados en medio MS-Y3 fresco adicionado con menor concentración de auxina (2,4-D), la cual disminuyó gradualmente por medio de subcultivos cada 10 días, como se muestra en el cuadro 9. Los frascos fueron incubados en fotoperíodo de 16 horas luz a temperatura ambiente (29-32°C), se realizaron cuatro subcultivos hasta que todos los tratamientos quedaron en medio de cultivo libre de auxina.

Cuadro 9. Tratamientos de reducción de la concentración de 2,4-D para inducir la formación de embriones somáticos a partir de callos de tallo y pedicelo de palma de coco.

tratamientos	Concentración (M) de 2,4-D				
	inicial	1o	2o	3o	4o
4	$1 \times 10^{-5}$	$1 \times 10^{-6}$	$1 \times 10^{-7}$	0	0
5	$1 \times 10^{-4}$	$1 \times 10^{-5}$	$1 \times 10^{-6}$	$1 \times 10^{-7}$	0
8	$1 \times 10^{-6}$	$1 \times 10^{-7}$	0	0	0
9	$1 \times 10^{-5}$	$1 \times 10^{-6}$	$1 \times 10^{-7}$	0	0
10	$1 \times 10^{-4}$	$1 \times 10^{-5}$	$1 \times 10^{-6}$	$1 \times 10^{-7}$	0
14	$1 \times 10^{-5}$	$1 \times 10^{-6}$	$1 \times 10^{-7}$	0	0
15	$1 \times 10^{-4}$	$1 \times 10^{-5}$	$1 \times 10^{-6}$	$1 \times 10^{-7}$	0

La fase de fotoperíodo se inició con 20 a 30 repeticiones por tratamiento, los parámetros a evaluar fueron cualitativos, el aumento de proliferación celular o formación de callos y el color de estos, y cuantitativos, la presencia y número de protuberancias-brute por tratamiento.

### 3.8. Análisis anatómico

Durante el transcurso de los períodos de obtención de callos (obscuridad) e inducción de embriones somáticos (fotoperíodo) se fue fijando parte del material para desarrollar el análisis anatómico, con la finalidad de determinar la presencia de zonas meristemáticas y de estructuras embrionarias en los callos, así como el tipo de tejido que constituye a las protuberancias.

El material vegetativo fue fijado en FARMER (Gaviño, 1977) y conservado en refrigeración para su posterior traslado a los centros de Fitopatología y Botánica en donde se llevó a cabo este análisis.

La técnica empleada para los estudios anatómicos, fue la inclusión en parafina (Johansen, 1940), para ello el material se preparó en un cambiador automático por períodos de 4 horas en cada uno de los vasos, para posteriormente ser incluidos en parafina con períodos intermitentes de 15 a 30 minutos de vacío a 50-54°C. Después de la solidificación de la parafina las muestras se montaron en taquetes de madera para realizar los cortes.

Los cortes se realizaron en un microtomo rotatorio, con un grosor de 10 a 11 $\mu$ . para posteriormente ser colocados en portaobjetos con adhesivo de Haup y formol (10%). La tinción se llevo a cabo por la técnica de safranina-verde fijo ó rápido, dos horas en safranina y un minuto en verde fijo, finalmente los cortes se montaron en resina sintética.

## RESULTADOS Y DISCUSION

### 4.1. Desinfección del material biológico

En Cultivo de Tejidos Vegetales es indispensable el desarrollo de metodologías adecuadas para el establecimiento de cultivos asépticos, ya que los medios utilizados son ricos en sales minerales y compuestos orgánicos que permiten el rápido desarrollo de hongos y bacterias, los cuales además de competir por los nutrientes pueden modificar la respuesta del tejido a las condiciones *in vitro* debido a los cambios microambientales ocasionados por sus desechos metabólicos (Withers, 1985 ; Fossard, 1985 ; Villegas, 1985). Por ello se planteó el desarrollo de estas metodologías como primera fase del presente trabajo.

Durante las pruebas realizadas al sembrar asépticamente lámina foliar (hoja), tallo, pedicelo, raquis y raíz expuestos a diferentes tratamientos de desinfección con el fin de desarrollar dichas metodologías, se hicieron observaciones cada tercer día durante un período de 15. Para el explante de raíz se observó una consistente contaminación ocasionada tanto por hongos como por bacterias en casi el 100% de las repeticiones para todos los tratamientos, mientras que para los cuatro explantes restantes se obtuvieron porcentajes de contaminación mucho mas bajos, como puede observarse en el cuadro 10.

Dado que los explantes de hoja, raquis y pedicelo fueron desinfectados en un solo cilindro, se obtuvo además de los porcentajes individuales, el porcentaje de contaminación promedio (prom.) de los tres explantes, el cual esta indicado en el cuadro 10.

Cuadro 10. Contaminación (%) en seis tratamientos de desinfección para diferentes explantes de palma de coco.

tratam.	%NaOCl/tiempo	Explantes					prom.
		raiz	tallo	hoja	pedi.	raquis	
A	10 / 15	90	40	40	33	30	34
B	20 / 15	100	50	60	30	40	43
C	30 / 15	100	30	0	0	3	1
D	10 / 20	100	40	40	30	30	33
E	20 / 20	80	20	0	20	10	10
F	30 / 20	66	3	50	3	30	28

prom. corresponde al promedio de los porcentajes de contaminación de hoja, pedicelo y raquis.

Los mejores tratamientos para estos tres explantes fueron el C y el E, con porcentajes de 1 y 10%, mientras que el resto de los tratamientos presenta valores cercanos o superiores al 30%, determinando como óptimo el tratamiento C que mostró el menor porcentaje de contaminación, la cual se presentó en un frasco con raquis.

Para el explante de tallo se observaron porcentajes de contaminación relativamente altos en cinco de los tratamientos, pero en el tratamiento F la contaminación fue solo del 3% por lo que se le consideró como el óptimo, sin embargo al emplear este procedimiento para los cultivos posteriores se presentó una contaminación casi generalizada por lo que fue necesario plantear nuevos tratamientos en los que se aumentó la concentración de cloralex y el tiempo de exposición a este, en los que se obtuvieron porcentajes de contaminación superiores a los observados en los tratamientos iniciales, a excepción del L en el cual se obtuvo un 10% de contaminación (Cuadro 11), este valor se



mantuvo al hacer otro ensayo, nuevamente con 30 repeticiones para este tratamiento, por ello para los cultivos posteriores se empleó este como óptimo, cabe señalar que los niveles de contaminación permanecieron abajo de este valor durante las siguientes fases del trabajo.

En lo que se refiere a raíz, debido al alto porcentaje de contaminación que se presentó, hubo también la necesidad de probar tratamientos adicionales, aumentando la concentración de Cloralex y su tiempo de exposición, ó ambas variables, sin embargo en este caso no se logró abatir los valores de porcentaje de contaminación como se muestra en el cuadro 11, estos permanecieron cercanos al 100%, incrementándose sin embargo el necrozamiento de los tejidos en los tratamientos con mayor tiempo de exposición al desinfectante.

Cuadro 11. Contaminación (%) en diferentes tratamientos de desinfección para raíz y tallo de palma de coco.

tratamiento	%NaOCl/tiempo	raíz	tallo
G	40 / 15	97	---
H	40 / 20	87	---
I	20 / 30	100	---
J	30 / 30	93	43
K	40 / 30	80	45
L	50 / 30	---	10
M	40 / 35	---	80

En terminos generales, la incidencia de agentes contaminantes en los medios de cultivo, se redujo al mínimo en cuatro de los explantes empleados, sin embargo eso no se logró para raíz, ya que suele ser mas difícil obtener esta clase de tejido libre de patógenos comparado con otras fuentes de material biológico, debido a que están en mayor contacto con la micoflora del suelo, por lo que es fácil que contengan esporas de hongos y bacterias, siendo en algunos casos insuficiente la desinfección superficial, aún al aumentar la concentración de desinfectante, tratandose en este caso de una contaminación sistémica, es decir que los contaminantes se encuentran en el interior del tejido. Además, el objetivo principal en la obtención de explantes para cultivos asépticos, es encontrar la concentración de desinfectante y tiempo de exposición de éste, suficientes para matar a los organismos contaminantes presente en la epidérmis, minimizando el posible daño ocasionado al tejido vegetal para obtener una respuesta morfogénica (Fossard, 1985). En esta investigación, para la desinfección de raíz resulta totalmente inconveniente el aumentar la concentración de cloralex o el tiempo de desinfección, pues en los tratamientos adicionales (G al K) se observó aumento en el necrozamiento del tejido al aumentar la concentración del desinfectante, indicando que el tejido esta siendo dañado por el método de desinfección, es decir, no se logró eliminar a los organismos contaminantes o sus esporas, pero si se esta causando daño al tejido, por otro lado, como en la mayoría de las especies las raíces no muestran un gran potencial morfogénico, se decidió no utilizar este explante para las siguientes fases del trabajo, que se realizaron solo para tallo, pedicelo, raquis y hoja.

#### 4.2. El empleo de antioxidantes y adsorbentes para el control de la oxidación

En cultivo de tejidos de especies leñosas y tropicales, frecuentemente se presenta el problema del necrozamiento de los tejidos, ocasionada por la liberación de sustancias fenólicas producidas como respuesta a las heridas hechas por los cortes practicados para obtener los explantes, estos compuestos son liberados al medio de cultivo volviéndolo tóxico para los tejidos, por lo que es común el empleo de antioxidantes o adsorbentes en el cultivo *in vitro* de especies como cacao, coco y plátano entre otras, con el fin de permitir tanto el desarrollo del tejido como la expresión de su potencial morfogénico.

Otro factor que parece favorecer la oxidación de los tejidos en algunas especies es la luz (Zaprometov, 1978), es por ello que se planteó en esta fase, probar la eficiencia de un antioxidante y dos adsorbentes tanto en condiciones de fotoperíodo (16/8 h), como de obscuridad para los explantes de tallo, pedicelo, raquis y hoja.

Los resultados fueron evaluados cualitativamente con valores de 0 a 4, correspondiendo el 0 a los explantes con 0% de oxidación o completamente sanos ; el 1 a explantes con hasta el 25% de oxidación ; el 2 a la oxidación media, cuando aproximadamente la mitad del explante mostraba oxidación, o bien, la coloración total de este era intermedia entre la inicial y el café negruzco ; el 3 cuando la oxidación era severa, de aproximadamente el 75% y ; el 4 cuando la oxidación era total (100%), es decir, cuando todo el explante se había tornado café negruzco.

En los resultados obtenidos a los 15 días de cultivo, se presentaron diferentes grados de oxidación para cada uno de los explantes. En promedio para los ocho tratamientos : en hoja no hubo presencia de oxidación total, mostrando el 21.6% de explantes

sanos (0), el 54.6% de explantes con ligera oxidación (1), el 20% con oxidación media (2) y 3.7% con oxidación severa (3). Raquis presentó los mas altos índices de oxidación, con 15% de explantes sanos (0), 11.2% de explantes con oxidación ligera (1), 16.2% con oxidación media (2), 26.2% con oxidación severa (3) y 27.5% con oxidación total (4). Pedicelo y tallo tuvieron un comportamiento intermedio como se muestra en la figura 4.

De manera general pudo observarse que la oxidación se presenta a partir del tercer día de cultivo y la mayor parte de los explantes que se oxidan lo hacen durante los diez primeros días. En el caso de hoja no hubo explantes que presentaran oxidación total y solo se presentó oxidación severa en nueve explantes: cuatro en el tratamiento testigo en obscuridad, dos en el tratamiento con ácido ascórbico en obscuridad y tres en polivinilpirrolidona (PVP) en fotoperíodo a los 15 días de cultivo, para raquis, pedicelo y tallo el número de explantes con oxidación severa o total (valores 3 y 4) en los ocho diferentes tratamientos empleados, durante los primeros 15 días de cultivo se presentan en las figuras 5, 6 y 7, en donde se observa que todos los explantes mostraron una menor oxidación cuando se empleó carbón activado tanto en condiciones de obscuridad como de fotoperíodo, mientras que los tratamientos con PVP y ácido ascórbico se comportaron muy similar a los testigos. Tal como se esperaba, para los tres tipos de tejido (tallo, pedicelo y raquis) fue mayor la oxidación en los tratamientos en fotoperíodo (líneas continuas) que para aquellos que permanecieron en obscuridad (líneas punteadas), debido a que se ha sugerido que la enzima que cataliza la síntesis de fenoles (fenilalaninaamonioliase) es activada por la luz y por consiguiente, en condiciones de obscuridad se reduce o desaparece la producción de fenoles (Zaprometov, 1978 ; Creasy, citado por Nava, 1988).

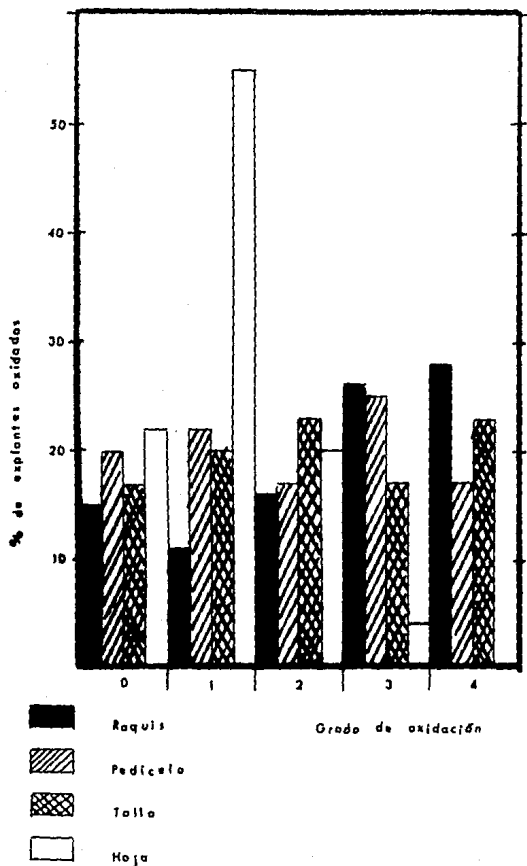


Fig. 4 . Grado de oxidación para cuatro diferentes explantes de palma de coco en condiciones in vitro, a los 15 días de cultivo.

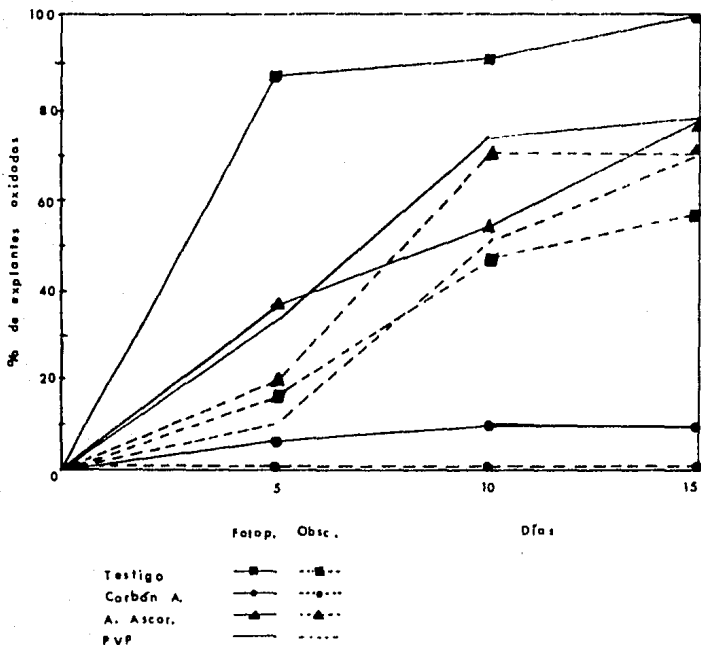
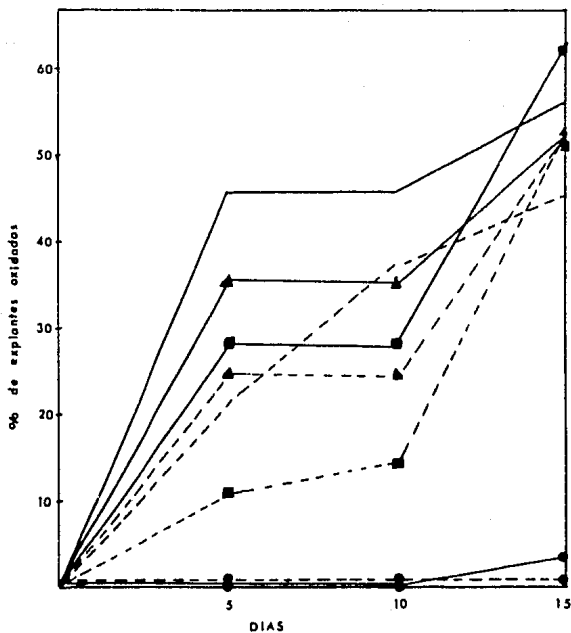


Fig. 5. Oxidación de explantes de raquis de palma de coco cultivados in vitro en ocho tratamientos diferentes durante 15 días.



Folap. Obsc.

Testigo      —■—  
 Carbón A.    —●—  
 A. Ascet.    —▲—  
 PVP

Fig. 6. Oxidación de explantes de pedicelo de palma de coco cultivados in vitro en ocho tratamientos diferentes durante 15 días.

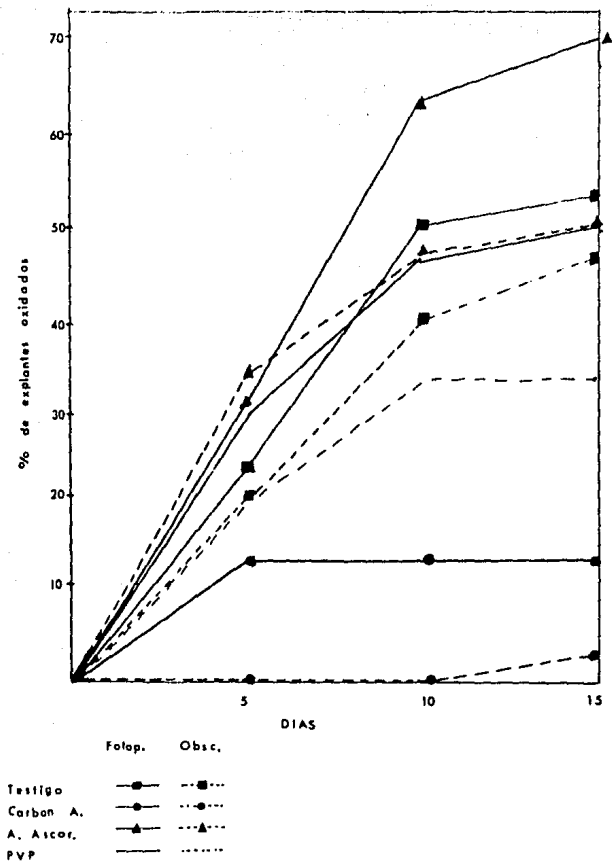


Fig. 7. Oxidación de explantes de tallo de palma de coco cultivados in vitro en ocho tratamientos diferentes durante 15 días.



Los antioxidantes, según la hipótesis de Siegel y Porto (1961) pueden actuar en tres diferentes formas : *i*) reaccionando como un intermediario deficiente en electrones, de una reacción de equilibrio redox. *ii*) activando o desactivando radicales o iones. *iii*) reaccionando con un oxidante, el cual de otra manera atacaría a un sustrato labil. De estas diferentes formas de acción dependen las funciones generales que como biorreguladores desempeñan: *i*) sirven como protectores de estructuras específicas a través de sus efectos sobre el balance redox. *ii*) pueden bloquear rutas específicas del metabolismo. *iii*) pueden actuar como cofactores en el transporte de electrones.

Un ejemplo de esas sustancias lo es el ácido ascórbico, que aún siendo una molécula pequeña y simple, muestra afinidad estructural y química con los compuestos fenólicos, en la posesión de un grupo diol, que es el responsable de muchas de las propiedades de ambos tipos de sustancias : tales como la propiedad reductora, controlando reacciones redox; donadores en reacciones de peroxidasas, quelación de metales, etc. Los fenoles regulan la oxidación del ácido ascórbico y ambos tienen una acción tanto protectora como estimulante de los sistemas oxidativos (Nava, 1988) sin embargo, en este caso se presentó igual oxidación del tejido cuando se empleó el antioxidante que en los tratamientos testigo por lo que puede decirse que no hubo reacciones con los fenoles liberados al medio, el cual se tornó color café, ocasionando la oxidación del material vegetativo.

Con referencia a los adsorbentes, el empleo de la PVP se ha reportado como auxiliar en el control de la oxidación de manzano y otros cultivos, sin embargo, para el caso de la palma datilera (Tisserat, 1979 ; Sharma et.al., 1980) y la palma de coco (Bhalla-Sarin et.al., 1986) no mostró buenos resultados.

Para los explantes empleados en este trabajo, la PVP resultó tener un comportamiento más parecido al del ácido ascórbico y al del testigo que al del otro adsorbente empleado, pues además de no

evitar el necrozamiento del tejido, el medio de cultivo también se tornó café.

El carbón activado ha mostrado en gran variedad de cultivos la capacidad de adsorber los metabolitos producidos por los explantes y el que haya sido el tratamiento que mejor controló el necrozamiento de los tejidos, indica que para palma de coco tiene esta misma capacidad, es decir, los compuestos fenólicos se produjeron pero no quedaron libres en el medio para poder resultar tóxicos al tejido.

Aún cuando ambas sustancias, carbón activado y PVP tienen la capacidad de adsorber los metabolitos producidos por los explantes, la mayor eficiencia del carbón activado puede deberse a los altos pesos moleculares de la PVP que es una molécula con peso molecular de hasta 40,000 (Tisserat, 1979).

También fue posible observar que aún cuando el tratamiento de carbón activado fue el mejor para todos los explantes, hubo diferencia en la respuesta de cada uno de ellos. Hoja casi no presentó oxidación en condiciones de obscuridad, pero esta fue nula en condiciones de fotoperíodo en donde se tornaron fotosintéticos. Raquis y pedicelo presentaron alrededor del 90% de explantes con ligera o nula oxidación (valores de 0 y 1) en ambas condiciones de cultivo, sin embargo, para el caso de tallo se obtuvo el 73% de explantes sanos o con poca oxidación en condiciones de obscuridad y en fotoperíodo solo el 60% de los explantes no se oxidó, siendo la fuente inicial de tejido con menor número de explantes sanos (Fig. 8), lo cual muestra que aún cuando todos los tejidos probados producen fenoles, la cantidad y tal vez la naturaleza de éstos difieren en cada una de las fuentes iniciales de tejido.

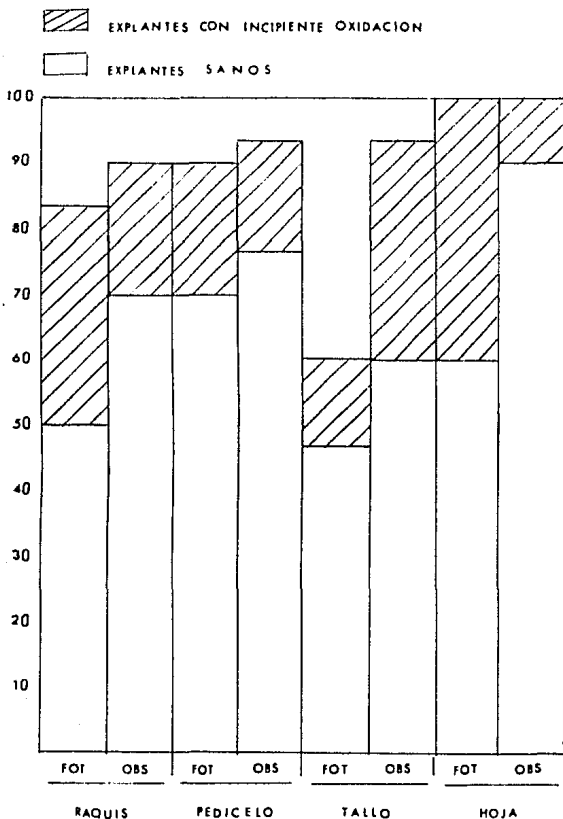


Fig. 8. Explantes de raquis, pedicelo, tallo y hoja de palma de coco cultivados en medio con carbón activado (%), que presentaron incipiente o nula oxidación, para condiciones de fotoperíodo y oscuridad.

Los resultados obtenidos de los tratamientos de antioxidantes y adsorbentes se analizaron mediante la prueba de Friedman (Infante y Zarate, 1988) realizando posteriormente una prueba de comparaciones múltiples (Conover, 1980). se encontró que a los 5, 10 y 15 días ninguno de los tratamientos fue significativamente diferente de los testigos, a excepción de los que consistían en carbón activado, tanto en obscuridad como en fotoperíodo, sin embargo el tratamiento de carbón activado en fotoperíodo fue estadísticamente diferente del testigo en obscuridad hasta los 15 días, observándose siempre como mejor el tratamiento de carbón activado en obscuridad (Cuadro 12).

Cuadro 12. Diferencias estadísticas para ocho tratamientos para el control de la oxidación en 4 diferentes explantes de palma de coco, a los 5, 10 y 15 días de cultivo *in vitro*.

5 días		10 días		15 días	
car. obsc.	(a)	car. obsc.	(a)	car. obsc.	(a)
car. fot.	(ab)	car fot.	(ab)	car fot.	(ab)
test. obsc.	(abc)	test. obsc.	(abc)	PVP obsc.	(abc)
PVP obsc.	(abc)	PVP obsc.	(bc)	Test. obsc.	(cd)
PVP fot.	(c)	ascor.fot.	(c)	ascor. obsc.	(cd)
ascor. obsc.	(c)	ascor. obsc.	(c)	ascor. fot.	(cd)
test. fot.	(c)	test. fot.	(c)	PVP fot.	(d)
ascor. fot.	(c)	PVP fot.	(c)	test. fot.	(d)

‡ tratamientos con la misma letra son estadísticamente iguales.

### 4.3. Selección de explantes para la inducción de callos

Dentro del marco teórico todas las células vegetales son totipotenciales, es decir que son capaces de regenerar una planta completa, sin embargo, existen diferencias en la respuesta morfogénica entre las diferentes especies y aun entre los diferentes tejidos de una misma planta (Sharp, 1980). Es por ello que se planteó esta prueba, para determinar la respuesta en condiciones *in vitro* de diferentes tejidos de plántulas de palma de coco para la inducción de callosidades.

Los resultados fueron cualitativos, se observó durante 30 días la presencia de proliferación celular y de oxidación en medio adicionado con reguladores de crecimiento ya que en algunas palmas se ha reportado incremento en la oxidación de los tejidos cuando son cultivados en presencia de estos compuestos (Rabéchat, 1976).

Los explantes se seleccionaron con base en la bibliografía, sin embargo, no se emplearon embriones cigóticos ya que en palma de coco se ha encontrado que estos prácticamente no participan en la formación de callos, los cuales se originan a partir del endospermo circundante (Kumar, 1985). Este tipo de tejido se caracteriza por su origen en una doble fecundación, por lo que generalmente es triploide e inestable genéticamente, lo cual no es deseable para la propagación de palmas seleccionadas. En callos originados a partir de endospermo de palma de coco, se han encontrado células con números cromosómicos que van desde  $n=16$  hasta  $n=384$ , siendo los números más comunes  $n=41$  a  $n=175$ , mientras que el número cromosómico normal de esta planta es  $n=16$  (Kumar et.al., 1985 ; Kheng et.al., 1981).

De los diferentes explantes probados, los de hoja y raquis no mostraron presencia alguna de proliferación celular en ninguno de los 15 tratamientos de combinaciones de reguladores de crecimiento, sin embargo si hubo un ligero incremento en la oxidación para los explantes de raquis, mientras que hoja continuó prácticamente sin oxidación. Pedicelo mostró escasa proliferación para todos los tratamientos y en cinco de ellos la proliferación fue media (valor 2), sin embargo en ninguno de los tratamientos hubo formación de callos. La máxima respuesta se obtuvo cuando se emplearon explantes de tallo, los cuales mostraron escasa proliferación en ocho de los tratamientos y en los siete restantes hubo presencia de proliferación media, además de algunos callos, sobretodo en los tratamientos con la mas alta concentración de auxina (Cuadro 13). Para ambos explantes el porcentaje de oxidación continuó siendo muy bajo. Tanto para pedicelo como para tallo la presencia de proliferación celular tardó de 10 a 15 dias y su crecimiento posterior fue muy lento como suele suceder en el cultivo de tejidos de palmas (Tisserat, 1988).

Con el empleo de los explantes de hoja se esperaba observar presencia de media a abundante proliferación celular, ya que varios autores reportan la obtención de callos nodulares y poco friables a partir de este tejido (Pannetier and Buffard-Morel, 1982 ; Gupta et.al., 1984 ; Branton and Blake, 1983). Sin embargo no se obtuvo ninguna respuesta aún cuando se varió la posición del explante con respecto al medio de cultivo (el haz ó el envés en contacto con el medio o bien, perpendiculares a este), los explantes continuaron blancos, sin oxidación ni proliferación, no hubo tampoco incremento alguno en el tamaño de los explantes como suele suceder en palmas (Tisserat, 1988), este incremento si se observó en los casos de pedicelo, raquis y tallo. Se obtuvo una respuesta positiva con el empleo de tallo de plántulas para la formación de callos al igual que lo reportado para palmas adultas, en donde se han reportado callos embrionógicos (Branton and Blake, 1983 ; Gupta et.al., 1984).

Cuadro 13. Grado de proliferación celular y oxidación para cuatro explantes de palma de coco en 15 diferentes combinaciones de reguladores de crecimiento.

Tratam.	tallo		pedicelo		raquis		hoja	
	prol	oxid	prol.	oxid.	prol.	oxid.	prol.	oxid.
1	1	1	1	0	0	1	0	0
2	1	0	1	0	0	1	0	0
3	1	1	1	0	0	1	0	0
4	2	0	1	0	0	2	0	0
5	2	1	2	1	0	1	0	0
6	1	0	1	0	0	1	0	0
7	1	0	1	0	0	2	0	0
8	2	1	2	1	0	1	0	0
9	2	1	2	0	0	2	0	0
10	2	1	2	0	0	1	0	0
11	1	0	1	0	0	3	0	0
12	1	0	1	0	0	1	0	1
13	1	0	2	0	0	1	0	0
14	1	1	1	1	0	2	0	0
15	1	0	1	0	0	3	0	0

prol= proliferación

oxid= oxidación

0=nula

1=escasa

2=media, a veces

callo.

0=nula

1=escasa (25%)

2=media (50%)

3=abundante (75%)

#### 4.4. Inducción y mantenimiento de callos

La eficiencia de los tejidos de palmas para la formación de callos suele ser baja, del 10 al 20% (Tisserat, 1988), en palma de coco ocurre lo mismo, la eficiencia es de aproximadamente 20-50% (Pannetier and Buffard-Morel, 1982 ; Bhalla-Sarin et.al., 1986) esto fue corroborado por los resultados de la fase anterior. Es por ello que con el fin de obtener una respuesta mas representativa, se realizó esta prueba en donde con un mayor número de repeticiones, se probaron para tallo y pedicelo los 15 tratamientos de combinaciones de reguladores de crecimiento 2,4-D/K ; 2,4-D/6BAP ó 2,4-D/nada.

Los resultados mostraron que mientras para pedicelo hubo escasa proliferación en once de los tratamientos, incluyendo aquellos que no contenían auxina y proliferación media en tres de los cinco de combinación 2,4-D/K, nunca hubo presencia de proliferación media, abundante o formación de callos, sin embargo sí hubo incremento en el volumen y peso fresco de los explantes (87.1%), en tanto que para tallo hubo presencia de proliferación media en siete de los tratamientos y en todos estos, aún cuando en diferente frecuencia, hubo formación de pequeños callos poco friables, pero el incremento en volumen y peso fresco fue mucho menor que para pedicelo (73.3%) (Cuadro 14).

De manera general, los tratamientos libres de auxina mostraron escasa proliferación celular pero un gran incremento en peso fresco, 85.3% para tallo y 98.7% para pedicelo, incremento que solo puede explicarse por crecimiento de las células y no a división de las mismas, fenómeno frecuente en cultivos *in vitro* de palmas (Tisserat, 1988).



Cuadro 14. Incremento en peso fresco (%) y proliferación celular del cultivo *in vitro* de tallo y pedicelo de palma de coco.

Tratam.	relación auxina/citocinina	tallo		pedicelo	
		peso fresco	prolif. celular	peso fresco	prolif. celular
		(%)	‡	(%)	‡
1	----- / ----	43	1	103	1
2	2-4,D / ----	73	1	71	1
3	2-4,D / ----	54	1	82	1
4	2-4,D / ----	57	2+	136	2
5	2-4,D / ----	54	2+	117	1
6	----- / K	103	1	146	1
7	2-4,D / K	74	1	47	1
8	2-4,D / K	70	2+	62	2
9	2-4,D / K	94	2+	120	2
10	2-4,D / K	115	2+	84	2
11	----- / 6BAP	110	1	47	1
12	2-4,D / 6BAP	37	1	54	1
13	2-4,D / 6BAP	38	1	82	1
14	2-4,D / 6BAP	106	2+	75	1
15	2-4,D / 6BAP	72	2+	80	1

‡ 1= escasa, apenas visible.

‡ 2= media.

‡ 2+= media con presencia de algunos callos.

Los resultados de incremento en peso fresco se analizaron mediante un ANAVA encontrando diferencias significativas entre los tratamientos, pero no entre la interacción auxina-citocinina, es decir que hubo diferencias debidas a los niveles de 2,4-D o bien a de citocininas pero no a la interacción de estas, ni para tallo ni para pedicelo.

El porcentaje de explantes con formación de callos (18-41 %) fue bajo como era lo esperado, pues suele ser así en palmas, sin embargo estos callos fueron pequeños y duros, ni aún con subcultivos frecuentes se logró friabilidad como generalmente sucede con los callos de palma de coco (Tisserat, 1988 ; Eeuwens, 1976 ; Branton and Blake, 1983).

En la literatura es frecuente encontrar que independientemente del tipo de tejido inicial, para la obtención de callos de palama de coco es necesario un medio de cultivo que contenga concentraciones de  $1 \times 10^{-4}$  a  $1 \times 10^{-6}$  M de 2,4-D, mientras que la concentración de  $1 \times 10^{-3}$  M resulta tóxica para los tejidos (Blake and Eeuwens, 1982 ; Gupta et.al., 1984), sin embargo se requiere de 2,4-D combinado con citocininas (K , 6BAP ó ambas) y en algunas ocasiones otras auxina además del 2,4-D y las citocininas para la obtención de dichos callos (Gupta et.al., 1984 ; Bhalla-Sarin et.al., 1986 ; Tisserat, 1988 ; Eeuwens, 1976). No obstante, los resultados de esta fase muestran que el mayor porcentaje de callos se obtuvo en el tratamiento con la auxina a concentración de  $1 \times 10^{-4}$  libre de citocininas en donde hubo un 41% de inducción, además de que en este tratamiento se obtuvieron los callos mas grandes (Cuadro 15). Es importante indicar que los porcentajes de inducción presentados, son de proliferación media a presencia de callos, debido a que el comportamiento posterior en ambos casos fue similar.

Cuadro 15. Inducción de callosidades (%) en siete tratamientos de combinaciones de reguladores de crecimiento para tallo de palma de coco.

Tratam.	relación auxina/citocinina (M)	inducción (%)
4	2,4-D $1 \times 10^{-5}$ / -----	25
5 <sub>i</sub>	2,4-D $1 \times 10^{-4}$ / -----	41
8	2,4-D $1 \times 10^{-6}$ / K $1 \times 10^{-6}$	33
9	2,4-D $1 \times 10^{-5}$ / K $1 \times 10^{-6}$	18
10	2,4-D $1 \times 10^{-4}$ / K $1 \times 10^{-6}$	37
14	2,4-D $1 \times 10^{-5}$ / 6BAP $1 \times 10^{-6}$	37
15	2,4-D $1 \times 10^{-4}$ / 6BAP $1 \times 10^{-6}$	21

#### 4.5. Inducción de embriones somáticos

En muchas especies capaces de formar embriones somáticos en cultivo *in vitro*, se requiere de subcultivar los callos a medio libre de auxinas para que estos se formen y desarrollen, en el caso de palmas, como la de aceite, la datilera y la de coco, es necesaria la disminución gradual de la concentración de auxina por medio de subcultivos frecuentes (Sharp, 1980 ; Tisserat, 1988 ; Branton and Blake, 1983 ; Gupta et.al., 1984).

Para promover la formación de tales estructuras, se realizaron subcultivos cada 10 días, subcultivando tanto los explantes con proliferación media como los callos a medio fresco reduciendo gradualmente la concentración de 2,4-D, incubando los cultivos en fotoperíodo (16-8 h) durante 40 días, se observó un aumento inicial en la velocidad de crecimiento de los callos, además de la

formación de pequeñas protuberancias en todos los tratamientos, concentrándose éstas principalmente en el tratamiento con 2,4-D  $1 \times 10^{-4}$  M libre de citocininas (Cuadro 16). Estas protuberancias se mantuvieron en cultivo en medio libre de reguladores de crecimiento durante 40 días después de su formación, bajo condiciones de fotoperíodo (16-8 h) para su desarrollo, sin embargo solo cuatro de ellas del tratamiento 5 (2,4-D inicial de  $1 \times 10^{-4}$  M) y una en el tratamiento 4 (2,4-D inicial de  $1 \times 10^{-5}$  M) se desarrollaron a formar pequeños brotes de máximo dos centímetros de longitud, de color amarillo a café claro, sin tornarse fotosintéticos ni desarrollar raíces.

Cuadro 16. Formación de protuberancias (%) en callos de palma de coco en siete tratamientos con disminución gradual de la concentración de 2,4-D.

Tratam.	relación auxina/citocinina	% callos con protuber.	% protuber. que originaron brotes
4	2,4-D $1 \times 10^{-5}$ / ----	13	2
5	2,4-D $1 \times 10^{-4}$ / ----	42	10
8	2,4-D $1 \times 10^{-6}$ / K $1 \times 10^{-6}$	16	---
9	2,4-D $1 \times 10^{-5}$ / K $1 \times 10^{-6}$	8	---
10	2,4-D $1 \times 10^{-4}$ / K $1 \times 10^{-6}$	2	---
14	2,4-D $1 \times 10^{-5}$ / 6BAP $1 \times 10^{-6}$	9	---
15	2,4-D $1 \times 10^{-4}$ / 6BAP $1 \times 10^{-6}$	8	---

#### 4.6. Análisis anatómico

Esta clase de protuberancias o brotes no habían sido reportados en la bibliografía, por lo que se realizó un estudio anatómico para determinar que clase de tejido las constituía y de ser posible su origen, también se incluyeron en este estudio anatómico algunos callos para determinar si había presencia de estructuras embrionarias o meristemáticas.

De manera general, la superficie del explante original formó células de parénquima sin diferenciación, estas células a veces se ubicaban en hileras y al parecer se originaron como respuesta a la herida del corte, constituyendo la mayor parte del callo. Inmersas en este tejido o en el explante original hubo agrupaciones de células meristemáticas, pequeñas y con nucleosa fuertemente teñidos (Sharp, 1980 ; Williams and Maheswaran, 1986). Estas zonas a diferencia de las zonas meristemáticas encontradas por varios autores (Tisserat, 1979 ; Pannetier and Buffard-Morel, 1982) mostraban hileras de células bien definidas, a veces también rodeaban parcialmente los haces vasculares del explante inicial, lo cual parece iniciar en donde se originaron. Además hubo algunos elementos traqueales en las masas de células meristemáticas. Se encontraron de 8-20 zonas meristemáticas de diferentes tamaños y generalmente de forma circular por centímetro cuadrado de corte (Fig. 9).

En este trabajo no se considera que las zonas meristemáticas sean embriones, por que carecen de meristemas apicales organizados sin embargo, son similares a las estructuras embriogénicas reportadas por Branton y Blake (1983) obtenidas a partir de callos de hoja y tallo de palmas adultas. Pannetier y Buffard-Morel (1982) opinan que las estructuras encontradas por ellos son morfológicamente similares a los estadios tempranos de los embriones cigóticos, por lo que les denominan embriones somáticos, no obstante dichas estructuras presentan abundantes células

vasculares. Gupta (1894) reporta la obtención de estructuras embrionarias a partir de callos de ápice de tallo de palma de coco a las que también denomina embriones somáticos por ser anatómica y morfológicamente similares a las estructuras obtenidas por Pannetier y Buffard-Morel (Fig 10).

En los cortes de las protuberancias se observó que éstas constan de células recién formadas sin diferenciación aparente. En una de las protuberancias pudo observarse una diferenciación y organización bien definida de meristemo radicular.

Durante el cultivo de los explantes y callos con protuberancia se observó el desarrollo de algunos brotes, lo cual indica que las zonas meristemáticas observadas pueden dar origen a brotes, raíces o bien a protuberancias con células organizadas pero sin diferenciación definida, por lo que de manera general, se puede decir que si bien la metodología para obtener zonas meristemáticas quedó bien definida, hay que hacer un nuevo planteamiento para lograr que éstas prosigan con algún proceso morfogénico, ya sea que las estructuras morfológicamente similares a embriones desarrollen meristemas organizados o que las zonas meristemáticas desarrollen órganos directamente.



FIG. 9. Zonas meristemáticas obtenidas a partir de callos de tallo de palma de coco.

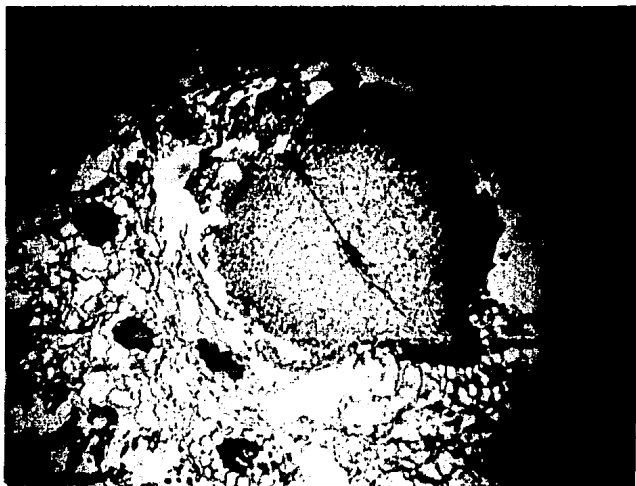


FIG. 10. Estructuras similares a embriones somáticos obtenidos a partir de callos de tallo de palma de coco.

## CONCLUSIONES

- 1.-Los cultivos asépticos de explantes de palma de coco se logran empleando hipoclorito de sodio comercial. Para pedicelo, raquis y lámina foliar a concentración del 30% durante 15 min. y para tallo al 50% durante 30 min.
- 2.-La oxidación de los tejidos de palma de coco cultivados *in vitro* fue controlada con el empleo de carbón activado al 1%.
- 3.-El mejor explante para la inducción de callos fue tallo.
- 4.-La mejor concentración de 2,4-D para la obtención de callos a partir de tallo fue  $1 \times 10^{-4}$  M.
- 5.-La formación de estructuras similares a embriones somáticos fue promovida con la disminución gradual de 2,4-D en condiciones de fotoperíodo (16-8).
- 6.-Las estructuras similares a estructuras embrionarias obtenidas en este trabajo son semejantes a las reportadas como embriones somáticos, sin embargo no son embriones en el sentido anatómicamente estricto por la presencia de algunas células diferenciadas y la carencia de meristemas apicales organizados.



## BIBLIOGRAFIA

- Amir M.A.(1983) Plant regeneration from cultures of *Phoenix dactilifera* L. *Date Palm J.* 2(1):57-77.
- Apavatjirut P. and J. Blake (1977) Tissue culture of stems explants of coconut (*Cocos nucifera* L.). *Oleagineux* 32(6):267-270.
- Bhalla-Sarin N., Bagga S., Sudhir S.K. and S. Guha-Muherjee (1986) Induction and differentiation of callus from embryos of *Cocos nucifera* L. by IAA conjugates. *Plant Cell Reports* 5:322-324.
- Blake J. and C.J. Eeuwens (1982) Culture of coconut palm tissues with a view to vegetative propagation. In: Rao A.N.(Ed.) Tissue culture of economically important plants pp.307 COSTED. Singapur.
- Branton R.L. and J. Blake (1983) Development of organized structures in callus derived from explants of *Cocos nucifera* L. *Ann. Bot.* 52:673-678.
- Branton R.L. and J. Blake (1986) Clonal propagation of coconut palm. In: Pushparajah E. and Chew Poh Soon (Ed.) Cocoa and coconuts progress and outlook. *Inc. Soc. of Planters Kuala Lumpur. Malasia* pp 771-780.
- Chang E. (1979) Crecimiento y primeros rendimientos de cocoteros híbridos enano malayo por alto, sobre arcillas costeras de Malasia peninsular. *Oleagineux* 34(2): 65-70.
- Conover W.J. (1980) Practical non parametric statistics. Second edition John Wiley and Sons. pp. 299-302.

- Corley R.H., Wooi K.C. and C.Y. Wong (1979) Progress with vegetative propagation of oil palm. *Planters Kuala Lumpur*, 55: 377-380.
- Davis T.A. (1969) Clonal propagation of the coconut. *World Crops* 5: 253-255.
- Dollet M. (1977) Proceedings of the third meeting of the international council on lethal yellowing. *Oleagineux* 33(4): 171-174.
- Eeuwens C.J. (1976) Mineral requirements for growth and callus initiation tissue explants excised from mature coconut palms (*Cocos nucifera* L.) and cultured *in vitro*. *Physiol. Plant.* 36: 23-28.
- Eeuwens C.J. (1978) Effects of organic nutrients and hormones on growth and development of tissue explants from coconut (*Cocos nucifera* L.) and date palm (*Phoenix dactylifera*) palms cultured *in vitro*. *Physiol. Plant.* 42: 173-178.
- Eeuwens C.J. and J. Blake (1977) Culture of coconut and date palm tissue with a view to vegetative propagation. *Acta Hort.* 78: 277-286.
- FAO (1979) Anuario FAO de producción. Col. FAO:estadísticas 33(28): 139-140. Roma.
- Fisher J.B. and J.H. Tsai (1978) *In vitro* growth of embryos and callus of coconut palms. *In vitro* 3: 307-311.
- Fossard R.A. (1975) Tissue culture for plant propagators. University of New England, Australia.

- Fremont Y., Ziller R. y M.N. deLamothe (1975) El cocotero. Colección agricultura tropical, Ed. Blume. Barcelona, España. 226pp.
- Gaviño T.G., Juárez J.C. y Figueroa H.H. (1977) Técnicas biológicas selectas de laboratorio y campo. Cap. VIII, pags. 57-79. Limusa, México.
- Gupta P.K., Kendurkar S.V., Kulkarn V.M., Shirgurkar M.V. and A.F. Mascarenhas (1984) Somatic embryogenesis and plants from zygotic embryos coconut (*Cocos nucifera* L.) *in vitro*. *Plant Cell Reports* 3: 222-225.
- Howard F.W., Norris R.C. and D.L. Thomas (1983a) Evidence of transmission of palm lethal yellowing agent by a planthopper *Myndus crudus* (Homoptera: Cixiidae). *Trop. Agric.* 60(3): 168-171.
- Howard F.W. (1983b) World distribution and possible geographic origin of palm lethal yellowing disease and its vector. *FAO Plant Prot. Bull.* 31(3): 101-113.
- Infante G.S. y G.P. Zarate de Lara (1988) Métodos estadísticos. Un enfoque interdisciplinario. Cap. 13 pp 533-598. Trillas, México.
- INEGI (1987) Anuario estadístico del estado de Tabasco. Tomo II. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. Gobierno del Estado de Tabasco, México.
- Johansen D.A. (1940) Plant Microtechnique. Ed. McGraw Hill Book Co. New York, U.S.A.

- Jonhson C.G. y S.J. Eden Green (1978) Busqueda del vector de la amarillez letal del cocotero en Jamaica: Reevaluación de los experimentos de 1962 a 1971. *Boletín Fitosanitario de la FAO* 26(4): 137-150.
- Kheng C.W. et.al. (1981) Tissue culture of palms review. In: *Tissue culture of economically important plants*. Rao A.N. (Ed) . pp 138-144. COSTED. Singapur.
- Kumar P.P., Raju C.R., Chandamohan M. and R.D. Iyer (1985) Induction and maintenance of friable callus from the cellular endosperm of *Cocos nucifera* L. *Plant Science* 40: 203-207.
- McCoy R.E. (1982) Use of tetracycline antibiotics to control yellows diseases. *Plant Disease* 66: 539-542.
- Murashige T. and F. Skoog (1962) A reviced medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 4: 473-497.
- Murashige T. (1974) Plant propagation through tissue cultures. *Ann. Rev. Plant. Physiol.* 25: 135-166.
- Murashige T. (1977) Current status of plant cell and organ cultures. *HortScience* 12: 127-130.
- Nava C.A. (1988) *Agave tequilana* Weber azul *in vitro* : un modelo para estudios en morfogénesis. Tesis maestría, Colegio de Postgraduados, México.
- Ong H.T. (1977) Studies into tissue culture of oil palm. In: *International Development in Oil Palm. Inc. Soc. Planters Kuala Lumpur*. Malasia

- Pannetier C. and J. Buffard-Morel (1982) Premiers resultats concernants la production d' embryons somatiques a partir de tissus foliaires de cocotier *Cocos nucifera* L. *Oleagineux* 37(7): 349-353.
- Pinto B. (1981) Virologia agricola. Chapingo, México.
- Piña R.J. y R.H. Carrillo (1987) Avances en la investigación del Amarillamiento Letal del cocotero en la península de Yucatán. En: Resúmenes del XIV Congreso de Fitopatología, Morelia, Mich. pp 127 México.
- Rabôchaut H. et.al. (1976) Recherches sur la culture des tissus de palmier a huile (*Elais guinnensis*). *Comptes rendus de l'Academie des Sciences. Serie III* 283: 1735-1737.
- Reynolds and T. Murashige (1979) Asexual embryogenesis in callus culture of palms. *In vitro* 15(5):383-387.
- Romney D.H., Whitehead R.A., Smith R.W. and F.D. Shaw(Comp.)(1968) How growth better coconuts. FAO, Roma.
- Salcedo G.J. (1986) La producción coprera del estado de Tabasco. Col. Cuadernos universitarios, serie agronómica No.11. Chapingo, México.
- Sangare A., Rognon F. et N.M. deLamothe (1978) Les phases males et females de l'inflorescence de cocotier (Influence sur le mode de reproduction). *Oleagineux* 33(12): 607-615.
- Sharma D.R., Kumari R. and J.B. Chowdury (1980) *In vitro* culture of female date palm (*Phoenix dactilifera*) tissues. *Euphytica* 29:169-174.

- Sharp W.R., Sondhal M.R., Caldas L.S. and S.B. Maraffa (1980) The physiology of *in vitro* asexual embryogenesis. *Horticultural Review* 2: 268-310.
- Siegel S.M. and F. Porto (1961) Oxidants, antioxidants and growth regulation. In: Anónimo (Ed) Plant growth regulation. Ames, Iowa, U.S.A. The Iowa State University Press pp.341-353.
- Srinivasan C., Litz R.E., Baker J. and Norstog (1985) Somatic embryogenesis and planted formation from christmas palm callus. *HortScience* 20(2): 278-280.
- Tisserat B. (1977) Tissue culture of the date palm. *Jour. Hered.* 70: 221-222.
- Tisserat B. (1979) Propagation of the date palm (*Phoenix dactylifera*) *in vitro*. *Jour. Exper. Bot.* 30(119): 1275-1283.
- Tisserat B. (1981) Date palma tissue culture. *Agric. Research Service (Western region) U.S.A. Departament Agriculture Oakland, U.S.A.* pp 50.
- Tisserat B. (1985) Embryogenesis, organogenesis and plant regeneration. In: Dixon R.A. (Ed) Plant cell culture a practical approach. R.L. Press. England.
- Tisserat B. (1988) Palm tissue culture. *Agric. Research Service (Western region) U.S.A. Departament Agriculture Oakland, U.S.A.*
- Villalobos A.V. y T.A. Thorpe (1985) La micropropagación: conceptos, metodología y resultados. En: Roca W. (Ed) Fundamentos y aplicaciones del cultivo de tejidos en la agricultura. CIAT. Colombia.

- Villalobos A.V. (1985) El cultivo de tejidos vegetales y su relevancia en la agricultura. En: Espinosa O., Franco B y J.L. Lozano (Comp) Memorias del ciclo de conferencias Cultivo de tejidos vegetales y sus aplicaciones. Facultad de Ciencias, U.N.A.M. PP 3-12. México.
- Villanueva B.J., Piña R.J. y R.H. Carrillo (1985) Amarillamiento letal del cocotero. *Folleto técnico* No. 84. INIA, SARH. México.
- Villanueva B.J., Piña R.J. y R.H. Carrillo (1987) Avances sobre el control y la investigación del amarillamiento letal del cocotero en México. *Folleto técnico* No. 1, SARH, México.
- Villegas M.A. (1985) Métodos asépticos. En: Villalobos A.V. (Ed) Fundamentos teorico-practicos de cultivo de tejidos vegetales. Chapingo, México. pp 54-63.
- Withers L.A. (1985) Minimum requirements for receiving and maintaining tissue culture propagating material. *FAO, Plant Production and Protection Paper*. 60.
- Waters H. (1980) Cuba, lethal yellowing disease of coconut. *FAO, Plant Protec. Bull.* 28(4): 139-141.
- Williams E.G. and G. Maheswaran (1986) Somatic embryogenesis: Factors influencing coordinated behavior of cells as an embryogenic group. *Ann. Bot.* 57: 443-462.
- Zaprometov M.N. (1978) Enzymology and regulation of the synthesis of polifenols in cultured cells. In: Thorpe T.A. (Ed) *Frontiers of plants tissue culture*. Calagry, Alberta, Canadá. University of Calgary Offset Printing Services pp 335-343.