

Efecto de distintas concentraciones de sacarosa en la conservación *in vitro* de coco (*Cocos nucifera* L.)

The effect of different sucrose concentrations on coconut (*Cocos nucifera* L.) *in vitro* conservation

Misterbino Borges García¹, Bernard Malaurie², Susana Portales Viltres¹,
Dayneri Calzadillas Campos¹

Resumen

Tradicionalmente el germoplasma de cocotero en Cuba se encuentra mantenido en colecciones *in situ*; esta forma de conservación conlleva elevados costos de manutención y altos riesgos de erosión genética debido principalmente a la exposición del material vegetal al ataque de plagas y enfermedades, y a la incidencia de desastres naturales. El presente trabajo de investigación tuvo como objetivo evaluar el efecto de la adición de diferentes concentraciones de sacarosa en el medio de cultivo *in vitro* de embriones cigóticos de coco para la conservación de los recursos genéticos de esta especie. Se utilizó el medio Eeuwens con la adición de sacarosa al 20, 40, 60 y 80 g/l⁻¹. A los 6 meses de cultivo se determinó el porcentaje de germinación, y a los 18 meses las siguientes variables: los porcentajes de supervivencia y enraizamiento, el número de hojas, la longitud y el grosor del vástago de las plántulas mantenidas *in vitro*. Se utilizó un diseño experimental completamente aleatorizado con análisis de varianza de clasificación simple y prueba de comparación múltiple de medias de Tukey. Los resultados obtenidos demostraron que la incorporación de 60 g/l⁻¹ de sacarosa en el medio Eeuwens es la más adecuada para la conservación de los recursos genéticos de coco (*Cocos nucifera* L.) en condiciones *in vitro* a partir de embriones cigóticos, donde se muestran los más altos porcentajes de supervivencia y el mayor vigor de las plántulas a los 18 meses de cultivo.

Palabras clave: cultivo de tejidos, embriones cigóticos, recursos genéticos.

Abstract

Cuban coconut germplasm is traditionally maintained in *in situ* collections; such conservation leads to high maintenance costs and genetic erosion risks, mainly due to plant material becoming exposed to pest and disease attack and that of natural disasters. The present research evaluated the effect of different sucrose concentrations on *in vitro* coconut zygotic embryo culture media for conserving this species' genetic resources. Eeuwens medium was used, containing added 20, 40, 60 and 80 g/l⁻¹ sucrose. Germination percentage was evaluated after six months' cultivation and the following variables after 18 months' cultivation: survival and rooting percentages, the number of leaves, shoot length and the thickness of the plantlets maintained *in vitro*. A totally randomised experimental design was used; one-way variance analysis and Tukey multiple means com-

1 Centro de Estudios de Biotecnología Vegetal, Facultad de Ciencias Agrícolas, Universidad de Granma. borges@udg.co.cu (este email cambia por mborgesg@udg.co.cu)
2 Institut de Recherche pour le Développement (IRD), UMR DIAPC, F-34 000 Montpellier, France.

parison tests were applied to the data. The results demonstrated that 60 g/l¹ sucrose in Eeuwens medium was the most appropriate for zygotic embryo coconut (*Cocos nucifera* L.) conservation in *in vitro* conditions, where plantlets showed the highest survival percentages and the most vigorous growth at 18 months of *in vitro* culture.

Key words: Genetic resources, plant tissue culture, zygotic embryo.

Recibido: octubre 16 de 2007

Aprobado: noviembre 24 de 2008

Introducción

El género cocos pertenece a la familia Arecaceae (Palmaceae), subfamilia cocoideae, la cuál incluye 27 géneros y 600 especies. Distribuida principalmente en las regiones costeras entre 20 °N y 20 °S, a 1000 m sobre el nivel del mar, el coco, *Cocos nucifera* L. ($2n = 2x = 32$) es la única especie del género, el cual constituye un importante cultivo tropical perenne donde no se conocen verdaderamente sus formas silvestres (Romanatha et ál., 2005).

La conservación *in vitro* por crecimiento mínimo de embriones cigóticos maduros de coco basado en la modificación del medio de cultivo con distintos niveles de sacarosa, y la adición de carbón activado durante 6 y 12 meses de mantenimiento fue descrita por Assy-Bah y Engelmann (1993). Posteriormente Mkumbo et ál. (1998) conservaron *in vitro* embriones cigóticos maduros de *Cocos nucifera* L. de las variedades altas del África Oriental durante 6 meses en dos medios de cultivos (MS y Eeuwens) con la incorporación de diferentes concentraciones de sacarosa (0, 20, 40, 60 y 80 g.l⁻¹).

Las técnicas de colección *in vitro* de germoplasma de coco son particularmente importantes por dos problemas principales de este cultivo, los cuales están relacionados por una parte con que es una especie que se propaga vegetativamente y, por otra, que posee una semilla muy grande de naturaleza recalcitrante (Engelmann, 2005).

Actualmente, el mantenimiento de esta especie se realiza en forma de colecciones en campo; no obstante, la conservación segura de

germoplasma de coco es imposible sin considerar las técnicas modernas de conservación a mediano y largo plazo en condiciones *in vitro* (Malaurie et ál., 2006).

Recientemente Pech et ál. (2007) estudiaron el efecto del ácido giberélico sobre la germinación *in vitro* de embriones cigóticos de coco y su conversión en plántulas, los cuales alcanzaron un 85% de germinación en el medio Eeuwens en estado líquido con la adición de 0,46 µM de ácido giberélico al cabo de los 6 meses de cultivo.

Tradicionalmente el germoplasma de cocotero en Cuba se encuentra mantenido en colecciones *in situ* y está ubicado principalmente en la región del extremo nororiental del país. Esta forma de conservación conlleva elevados costos de manutención y altos riesgos de erosión genética debido principalmente a la exposición del material vegetal al ataque de plagas y enfermedades tales como el amarillamiento letal y el ácaro *Aceria guerreronis* que han afectado seriamente las colecciones cubanas, así como la incidencia de desastres naturales (Borges et ál., 2006).

Las técnicas de cultivo *in vitro* de embriones cigóticos de coco tienen una importante aplicación para la colección, conservación, propagación e intercambio de germoplasma de material libre de plagas y enfermedades, al mismo tiempo que reduce considerablemente los costos de transportación, de manera que todo estudio encaminado al mejoramiento del medio de cultivo para el logro de este objetivo es de extraordinario valor (Borges et ál., 2005).

En Cuba, los primeros trabajos de cultivo *in vitro* de embriones cigóticos de coco fueron llevados a cabo por Cueto (2000) para el intercambio de germoplasma. Posteriormente, Borges et ál. (2005) estudiaron la influencia de distintas concentraciones de sacarosa en el medio de cultivo sobre la propagación *in vitro* de embriones cigóticos, sin embargo, no se han llevado a cabo investigaciones relacionadas con la conservación *in vitro* de genotipos cubanos de coco. Tomando en consideración lo antes expuesto, el presente trabajo tuvo como objetivo evaluar el efecto de la adición de diferentes concentraciones de sacarosa en el medio de cultivo *in vitro* de embriones cigóticos de *Cocos nucifera* L para la conservación de los recursos genéticos de esta especie.

Materiales y métodos

Material vegetal. El material vegetal empleado estuvo constituido por embriones cigóticos de semillas del ecotipo (alto) híbrido de color verde claro (*Cocos nucifera* L.) procedentes de frutos maduros de 11 a 12 meses después de la fecundación. Éstos fueron obtenidos de plantas madres seleccionadas del municipio de Niquero en la provincia Granma, Cuba.

Extracción, desinfección y aislamiento de los embriones. Se realizó una selección genética y fitosanitaria de los frutos maduros (11 a 12 meses) procedentes de plantas sanas. A los cocos maduros se le eliminó la cáscara y fueron partidos en dos utilizando un machete y un martillo, los cuales fueron desinfectados.

El cilindro del albumen conteniendo el embrión (carotas) se obtuvo con ayuda de un sacabocados (diámetro de 3 mm) y una pinza, los explantes fueron desinfectados previamente por la inmersión en una solución de hipoclorito de sodio al 1,6%. Posteriormente se enjuagó 3 veces con agua destilada estéril, esta operación se llevó a cabo sobre una mesa, la cual fue cuidadosamente lavada y desinfectada con hipoclorito comercial.

La posición del embrión se pudo ubicar tomando como referencia los poros germinativos. El embrión incrustado dentro del albumen se encuentra bajo uno de los 3 poros germinativos que forman los 3 ojos de la nuez de coco. Luego se realizó la desinfección nuevamente de las carotas en el laboratorio bajo la cabina del flujo laminar, durante 20 min por una inmersión en una solución de hipoclorito de sodio al 1,6%. Se enjuagó nuevamente 3 veces con agua estéril. Finalmente, se realizó la extracción de los embriones y su desinfección durante 5 min por inmersión en una solución de hipoclorito de sodio al 1,6% seguida de 3 enjuagues con agua destilada estéril.

Medio de cultivo, tratamientos y procedimientos de preparación. El medio de cultivo estuvo compuesto por las sales macronutrientes y micronutrientes de Eeuwens, FeEDTA (5 mg/l⁻¹), 4 vitaminas de Morel y Wetmore (1 mg/l⁻¹), biotina (0,1 mg/l⁻¹), mio-Inositol (100 mg/l⁻¹), ácido ascórbico (100 mg/l⁻¹), fosfato de sodio (310 mg/l⁻¹), sulfato de adenina (30 mg/l⁻¹). Los diferentes tratamientos se basaron en la adición de las siguientes concentraciones de sacarosa: 20, 40, 60 y 80 g/l⁻¹. Seguido a ello se aforó el medio de cultivo hasta 1 L de agua destilada, se ajustó el pH a 5, se le agregó agar 7 g/l⁻¹ y se fundió. Luego se enfrió a 45 °C, se adicionó carbón activado (2 g/l⁻¹) con agitación constante, se distribuyó en frascos de 120 ml de capacidad a razón de 20 ml por frasco, y se esterilizó en autoclave durante 30 min a 121 °C.

Inoculación de los explantes. Los embriones cigóticos se colocaron a razón de uno por frasco de cultivo.

Condiciones de cultivo. Temperatura de 27 ± 1 °C, humedad relativa de 76-80% y oscuridad durante 6 meses. Iluminación solar (3500-4000 lux) de 6 hasta 18 meses con un fotoperiodo de 14 horas.

Evaluación. Se tomó un tamaño de muestra de 30 explantes por cada tratamiento con cinco repeticiones a los cuales se les determinaron a

los 6 meses el porcentaje de germinación, y a los 18 meses las siguientes variables:

- Número de hojas
- Grosor del vástago (mm)
- Longitud del vástago (cm)
- Porcentaje de enraizamiento
- Porcentaje de supervivencia

Diseño y análisis estadístico. Se aplicó un diseño completamente aleatorizado con análisis de varianza de clasificación simple para conocer el efecto de la adición de sacarosa en el medio de cultivo sobre el crecimiento y desarrollo de embriones cigóticos de coco conservados en condiciones *in vitro*. Para la comparación de las medias se utilizó la prueba de Tukey. El paquete estadístico utilizado fue el Statistica montado sobre plataforma Windows XP Profesional versión 6.1 (StatSoft, 2003).

Resultados y discusión

Porcentaje de germinación

En la figura 1 se muestran los resultados del porcentaje de germinación a 6 meses de cultivo. Los valores más elevados (85%) co-

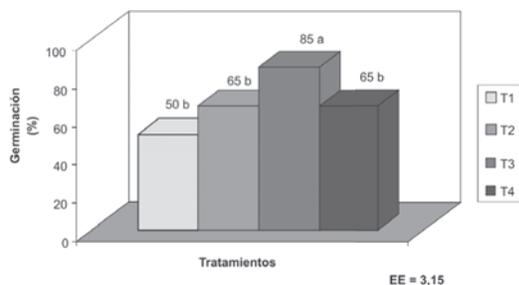


Figura 1. Influencia de la adición de sacarosa en el medio Eeuwens sobre el porcentaje de germinación de embriones cigóticos de coco a 6 meses de cultivo. Medias con letras distintas difieren significativamente para $p < 0.05$ según prueba de Tukey. EE, error estándar. T1, 20 g.l⁻¹ de sacarosa; T2, 40 g.l⁻¹ de sacarosa; T3, 60 g.l⁻¹ de sacarosa; T4, 80 g.l⁻¹ de sacarosa.

rresponden al tratamiento que posee una concentración de sacarosa de 60 g/l⁻¹ el cual difiere significativamente ($p < 0,05$) del resto de los tratamientos (20, 40, 80 g/l⁻¹) que no sobrepasaron el 65% de germinación.

Estos resultados son superiores a los obtenidos por Cueto (2000), en el cultivo *in vitro* de embriones cigóticos de coco cultivar alto criollo en el medio de cultivo Eeuwens, con la adición de 60 g/l⁻¹ de sacarosa donde se alcanzó un 77,1% de germinación.

En este sentido Assy-Bah et ál. (1989) durante el estudio de la adición de 20, 30, 60, 90 y 120 g/l⁻¹ de sacarosa en el medio de cultivo Eeuwens demostró que un aumento de la concentración de sacarosa hasta 60 g/l⁻¹ permitió acelerar la germinación de los embriones de coco. En efecto, bajo esta condición, 70% de los embriones desarrollaron un brote después de un mes de cultivo, contra 44% en el medio 20 g/l⁻¹ de sacarosa, mientras que a la concentración más alta de sacarosa (120 g/l⁻¹) disminuyó su germinación.

Por otro lado, Assy-Bah y Engelmann (1993) alcanzaron resultados semejantes en el cultivo *in vitro* de embriones cigóticos de coco mediante el uso del medio de cultivo MS con la adición de distintas concentraciones de sacarosa (0, 5, 10, 15, 20, 60 g/l⁻¹) en presencia de carbón activado (2 g/l⁻¹), los cuales evidenciaron que a medida que se incrementa la concentración de sacarosa en el medio hasta 60 g/l⁻¹ aumenta el porcentaje de germinación de los embriones hasta alcanzar un 88% a 6 meses y un 93% a 12 meses.

Los resultados alcanzados en esta investigación respecto a la germinación no coinciden con los obtenidos por García et ál. (1999) al estudiar la influencia de la concentración de sacarosa sobre la germinación y el desarrollo *in vitro* de tres variedades de *Nicotiana tabacum* L. (Criollo, SL-20 y BH-13), los cuales demostraron un buen desarrollo y germinación de las plántulas en el medio de

cultivo MS con la adición de 20 g/l⁻¹ de sacarosa.

Porcentaje de supervivencia

Los resultados de la influencia de distintas concentraciones de sacarosa en el medio de cultivo sobre la supervivencia de las vitroplantas obtenidas de embriones cigóticos a los 18 meses de cultivo se ilustra en la figura 2. El porcentaje más elevado (75%) corresponde a vitroplantas mantenidas en medio de cultivo conteniendo 60 g/l⁻¹ de sacarosa, la que difiere de forma significativa ($p < 0,05$) del resto de los tratamientos evaluados. Como se puede notar, se presenta un comportamiento similar a la germinación, pero los valores son inferiores debido a que durante el transcurso del tiempo algunas de las plántulas germinadas fueron paulatinamente deteriorándose hasta ocasionar la muerte de las mismas.

En este aspecto, Jiménez (1995) planteó que concentraciones altas de sacarosa en el medio de cultivo permiten lograr un crecimiento vigoroso de las raíces. Además, las plantas presentan una mayor supervivencia al ser transplantadas al suelo, tal vez debido a una mejor adaptación para soportar el estrés hídrico motivado por las condiciones de mayor presión osmótica donde se desarrollan. Por otro lado,

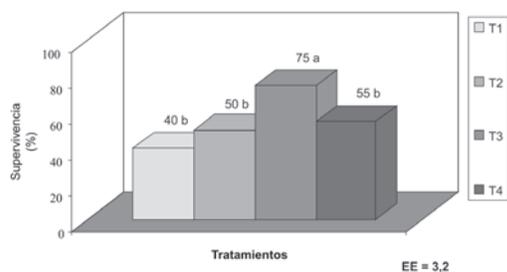


Figura 2. Influencia de la adición de sacarosa en el medio Eeuwens sobre el porcentaje de supervivencia de vitroplantas procedentes de embriones cigóticos de coco a 18 meses de cultivo. Medias con letras distintas difieren significativamente para $p < 0,05$ según prueba de Tukey. EE, error estándar. T1, 20 g.l⁻¹ de sacarosa; T2, 40 g.l⁻¹ de sacarosa; T3, 60 g.l⁻¹ de sacarosa; T4, 80 g.l⁻¹ de sacarosa.

Borges et ál. (2005) señalaron que la mayor efectividad de la sacarosa en la multiplicación *in vitro* puede atribuirse a que causa cambios en las fitohormonas endógenas lo que conduce a la formación y el crecimiento de vástagos normales, quizás a través del ajuste osmótico del citosol de los tejidos o de la disponibilidad de ciertas enzimas asociadas con la utilización de la fuente de carbono. También se pudo observar que las plántulas mantenidas en el medio de cultivo con 60 g/l⁻¹ de sacarosa presentaron la mejor vigorosidad y una coloración más verde con relación al resto de los tratamientos (figura 3).

Estos resultados son similares a los alcanzados por Alvarenga et ál. (2007) en la conservación *in vitro* del chayote (*Sedum edule*), a mediano plazo, con la adición de diferentes concentraciones de sacarosa (0, 30, 50, 60, 70 y 80 g/l⁻¹) al medio de cultivo de Murashige y Skoog, los cuales encontraron que el mejor tratamiento correspondió a la adición de 60 g/l⁻¹ de sacarosa al medio de cultivo con una mayor vigorosidad y coloración verde de las plántulas.

Porcentaje de enraizamiento

El porcentaje de enraizamiento (figura 4) a los 18 meses fue de 50% correspondiente a los tratamientos compuestos por 60 y 80 g/l⁻¹ de sacarosa, los cuales difieren significativamente del resto para $p < 0,05$, es decir, a medida que se incrementa la concentración de sacarosa aumenta el número de plántulas con raíces.

Estos resultados son semejantes a los obtenidos por Assy-Bah et ál. (1989) durante la evaluación en el medio de cultivo de diferentes concentraciones de sacarosa (20, 30, 60, 90 y 120 g/l⁻¹), los cuales demostraron que a medida que aumenta la concentración de la misma en el medio es mayor el porcentaje de enraizamiento. Al cabo de dos meses de cultivo el número de plántulas que poseían varias raíces bien desarrolladas correspondió a las concentraciones de sacarosa iguales o su-



Figura 3. Crecimiento, desarrollo y vigorosidad de las vitroplantas procedentes de embriones cigóticos de coco a 18 meses de cultivo en el medio Eeuwens. T1, 20 g.l⁻¹ de sacarosa; T2, 40 g.l⁻¹ de sacarosa; T3, 60 g.l⁻¹ de sacarosa; T4, 80 g.l⁻¹ de sacarosa.

periores a 60 g/l⁻¹. Sin embargo, se observó una hipertrofia del sistema radicular con 120 g/l⁻¹ de sacarosa.

Por otra parte, estos mismos autores reportaron que las plántulas cultivadas en la concentración de 60 g/l⁻¹ habían desarrolla-

do satisfactoriamente su sistema radicular. Sin embargo, las plántulas mantenidas en el medio con 90 g/l⁻¹, presentaron a los 4 meses un ligero retardo, pero tuvieron un comportamiento equivalente durante su transplante a condiciones naturales.

Estos resultados son similares a los obtenidos por Karunaratne (1989) en el cultivo *in vitro* de embriones cigóticos de coco, los cuales demostraron que una elevada concentración de sacarosa estimuló el desarrollo del haustorium y de la iniciación radicular.

Assy-Bah et ál. (1989) obtuvieron resultados semejantes durante la evaluación del desarrollo de las raíces de plántulas de cocos procedentes de embriones cigóticos, donde se demostró la aparición de raíces más rápido sobre un medio de cultivo con 80 g/l⁻¹ de sacarosa y 20 o 40 mg/l⁻¹ de ácido naftalenacético (ANA). También estos autores reportan la evaluación de la adición de 20, 30, 60, y 90 g/l⁻¹ de sacarosa en el medio de cultivo Eeuwens, mostrando que a medida que aumenta la concentración de sacarosa en el medio de cultivo, aumenta también el enraizamiento, lo cual es

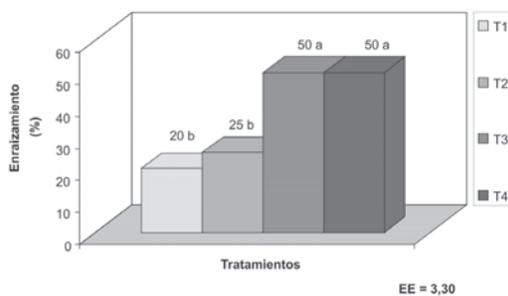


Figura 4. Influencia de la adición de sacarosa en el medio de cultivo de conservación sobre el porcentaje de enraizamiento de vitroplantas procedentes de embriones cigóticos de coco a 18 meses de cultivo. Medias con letras distintas difieren significativamente para $p < 0.05$ según prueba de Tukey. EE, error estándar. T1, 20 g.l⁻¹ de sacarosa, T2, 40 g.l⁻¹ de sacarosa, T3, 60 g.l⁻¹ de sacarosa, T4, 80 g.l⁻¹ de sacarosa.

más significativo para las concentraciones de sacarosa en el medio de cultivo iguales o superiores a 60 g/l¹.

Número de hojas, longitud y grosor del vástago de las plántulas in vitro

En la tabla 1 se muestra el número de hojas, la longitud y el grosor del vástago de las plántulas *in vitro* en los distintos tratamientos. Los mayores valores corresponden al tratamiento 3, compuesto por la adición de 60 g/l¹ de sacarosa en el medio de cultivo, y difiere significativamente ($p < 0,05$) del resto de las variantes analizadas. La emisión de las hojas fue retardada y a veces inhibida cuando los embriones fueron cultivados principalmente en la concentración de 80 g/l¹.

Estos resultados no coinciden totalmente con los alcanzados por Karunarate (1989) al evaluar el efecto de la sacarosa y el carbón activado en el cultivo de embriones de cocos enanos, donde observaron que al incorporar al medio 30 g/l-1 de sacarosa y 2 g/l-1 de carbón vegetal activado, los embriones germinaron rápidamente. Aproximadamente el 62% de los embriones se convirtieron en plantas jóvenes, compuestas por 2 hojas fotosintéticas y 2 hojas escamosas en un periodo de 4 meses. También comprobaron que la presencia de carbón activado en el medio es absolutamente indispensable para el desarrollo de las plántulas.

Los resultados de la longitud del vástago son semejantes a los obtenidos por Assy-Bah (1992) mediante la adición de 20, 30, 60, y 90 g/l¹ de sacarosa en el medio de cultivo Euwens, donde las plántulas obtenidas después de cuatro meses de cultivo poseen una longitud del vástago tres veces más elevada en el medio de cultivo conteniendo 60 g/l¹ de sacarosa con relación a las mantenidas en 90 g/l¹ de sacarosa.

Por otra parte, esta investigación no coincide totalmente con los resultados obtenidos por Alvarenga et ál. (2007) en la conservación *in vitro* del chayote (*Sedum edule*) en el medio de cultivo de Murashige y Skoog con la adición de diferentes concentraciones de sacarosa (0, 30, 50, 60,70 y 80 g/l¹), los cuales reportan que para la variable longitud del vástago se detectaron cuatro grupos definidos: 30 y 40 g/l¹ (los mayores incrementos), seguidos por 50 y 60 g/l¹. Los tratamientos que incluyeron 0, 70 y 80 g/l¹ de sacarosa mostraron los menores incrementos.

También, estos resultados son similares a los mostrados por Assy-Bah et ál. (1989) sobre un medio de cultivo de embriones cigóticos de coco conteniendo 20, 30, 60 y 90 g/l¹ de sacarosa, encontrando que al cabo de 5 meses de cultivo las plántulas con un mayor grosor y longitud del vástago se presentaron en las concentraciones de 60 y 90 g/l¹ de sacarosa en el medio con relación a los cultivados en las concentraciones de 20 y 30 g/l¹. En estas últi-

Tabla 1. Influencia de la adición de sacarosa en el medio Eeuwens sobre el números de hojas, longitud y grosor del vástago de las plántulas *in vitro* procedentes de embriones cigóticos de coco a 18 meses de cultivo.

Tratamientos	Número de hojas	Longitud del vástago (cm)	Grosor del vástago (mm)
1	1,5 b	3,2 b	0,36 b
2	1,7 b	5,6 b	0,37 b
3	3,5 a	10,6 a	0,6 a
4	1,2 a	2,6 c	0,38 b
EE	0,21	0,76	0,023

Medias con letras distintas difieren significativamente para $p < 0,05$ según prueba de Tukey. EE, error estándar. T1, 20 g.l¹ de sacarosa; T2, 40 g.l¹ de sacarosa, T3; 60 g.l¹ de sacarosa; T4, 80 g.l¹ de sacarosa.

mas concentraciones el crecimiento de la longitud del vástago fue muy lento. Por otro lado, estos autores demostraron que el crecimiento de la longitud del vástago a la concentración de 60 g/l¹, fue tres veces más elevada que aquellos cultivados a la concentración de 90 g/l¹ de sacarosa.

Los resultados obtenidos para el grosor del vástago son semejantes a los alcanzados por Assy-Bah (1992) mediante la incorporación de 20, 30, 60, y 90 g/l¹ de sacarosa en el medio de cultivo Eeuwens, donde las plántulas obtenidas después de cuatro meses de cultivo poseen un mayor grosor y vigorosidad en los tratamientos con 60 y 90 g/l¹ de sacarosa con relación a las mantenidas en 20 y 30 g/l¹ de la misma sustancia.

En general podemos plantear que en todas las variables de crecimiento y desarrollo estudiadas para la conservación de plántulas de coco procedentes de embriones cigóticos en condiciones *in vitro* se observó la tendencia a alcanzar valores mayores a medida que se aumentó la concentración de sacarosa hasta 60 g/l¹. Esto corrobora lo descrito por Assy-Bah y Engelmann (1993), Mkumbo et al. (1998) y Dos Santos (2002), los cuales demostraron que la concentración óptima de sacarosa para la regeneración, crecimiento y desarrollo normal de los embriones correspondió a la adición en el medio de cultivo de 60 g/l¹. También Assy-Bah y Engelmann (1993) señalaron que cuando la concentración de sacarosa disminuía, el crecimiento decrecía, conduciendo a la muerte de los embriones después de 12 meses de cultivo.

Por otra parte, estos resultados no coinciden con los logrados por Cueto (2000), el cual no obtuvo respuesta diferencial de la adición de diferentes concentraciones de sacarosa en el medio de cultivo (45 y 60 g/l¹) sobre el crecimiento y desarrollo *in vitro* de los embriones cigóticos de coco.

Finalmente, Karunarate (1989) llegó a la conclusión de que el carbón vegetal y la eleva-

da concentración de sacarosa constituyen dos factores importantes que contribuyen al crecimiento exitoso *in vitro* de los embriones cigóticos de coco.

Conclusiones

La concentración de sacarosa más adecuada en el medio de cultivo Eeuwens para la conservación *in vitro* de germoplasma de coco (*Cocos nucifera* L.) durante 18 meses corresponde a 60 g/l¹, en la cual se alcanzan los más altos porcentajes de supervivencia, y un mayor crecimiento y desarrollo vigoroso de las plántulas procedentes de embriones cigóticos.

Referencias bibliográficas

- Alvarenga, S.; Abdelnour, A.; Villalobos, V. 2007. Conservación *in vitro* de chayote (*Sechium edule*). *Agro-nomía Mesoamericana*, 11 pp.
- Assy-Bah, B.; Durand, G.; Engelmann, F. 1989. Culture *in vitro* d'embryons zygotiques d' cocotier Methode, revue et simplifie, d' plants d' cocotier transférables au champ 44 (11).
- Assy-Bah, B. 1992. Utilisation de la culture *in vitro* d'embryons zygotiques pour la collecte et la conservation des ressources génétiques du cocotier (*Cocos nucifera* L.). Thèse de doctorat de l'Universite Paris VI.
- Assy-Bah, B.; Engelmann, F. 1993. Medium-term conservation of mature embryos of coconut. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 33 (3), 6.
- Borges, M.; Portales, S.; Malaurie, B. 2005. Influencia de diferentes concentraciones de sacarosa en el cultivo *in vitro* de coco (*Cocos nucifera* L.). Taller internacional de biodiversidad, biotecnología y agricultura sostenible. Convención UDG '2005. pp. 76-84.
- Borges, M.; Garcés, Y. 2006. Efecto de la adición de distintas concentraciones de cachaza en el suelo sobre la propagación de *Cocos nucifera* L. *Revista Centro Agrícola* 33 (1), 9-14.
- Cueto, J. 2000. Perfeccionamiento de las técnicas *in vitro* para la colección e intercambio de germoplasma de cocos. Proyecto (Cuba-México).
- Dos Santos, V. 2002. Regeneração *in vitro* de embriões de *Cocos nucifera* L. Tese de Mestre em Ciências. Piracicaba, Brasil.

- Engelmann, F. 2005. *In vitro* collecting of coconut germplasm. En: Batugal, P.; Ramanatha, V.; Oliver, J. (eds.). Coconut genetics resources. IPGRI-APO, Serdang, Selangor DE, Malaysia.
- García, R.; Medina, M.; Gómez, M.; Sotolongo, R. 1999. Influencia de diferentes concentraciones de sacarosa sobre la germinación y el desarrollo *in vitro* de tres variedades de tabaco (*Nicotiana tabacum* L). Revista Centro Agrícola 26 (2), 57-61.
- Jiménez, E. 1995. Propagación *in vitro* de la caña (*Saccharum* ssp). Híbrido. Tesis Doctorado UCLV, Cuba.
- Karunaratne, S. 1989. Informe sobre el cultivo de embriones del cocotero enano. En: Information Express. CIDA 13 (3).
- Malaurie, B.; Bandupriya, H. D. D.; Fernando, S. C.; and Verdeil, J. L. 2006. Optimisation du procédé de cryoconservation de la plumule de cocotier. Les Actes du BRG 6, 449-468.
- Mkumbo, K. E.; Homnung, R. K. W.; Topper, C. P.; Calligari, P. D. S.; Kullaya, A.K.; Shomari, S. H. et al. 1998. Status of research on coconut embryo culture and acclimatization techniques in Tanzania. In: International cashew and coconut conference: trees for life the key to development. Dar es Salaam. Proceedings. Tanzania: Biohybrids International. pp.358-361.
- Pech, A.; Maust, B.; Orozco-Segovia, A.; Oropeza, C. 2007. The effect of gibberellic acid on the *in vitro* germination of coconut zygotic embryos and their conversion into plantlets. *In vitro* Cell Dev Biol Plant 43, 247-253.
- Ramanatha, V.; Hodgkin, T.; Bourdeix, R. 2005. Locating coconut genetic diversity. En: Batugal, P.; Ramanatha, V.; Oliver, J. (eds.). Coconut genetics resources. IPGRI-APO, Serdang, Selangor DE, Malaysia.
- Statsoft. 2003. Statistica for Windows XP Profesional. Versión 6.1. Tulsa. OK. Inc.