

## Efecto del sorbitol, manitol y la sacarosa en la germinación *in vitro* de embriones de palma africana

Effect of sorbitol, mannitol and sucrose *in vitro* germination of African palm embryos

Efeito do sorbitol, manitol e sacarose na germinação *in vitro* de embriões de palmeira africana

Ariadne Vegas García<sup>1\*</sup>, Patricia Molleda<sup>1</sup>, Digner Ortega<sup>2</sup>, Ernesto Paredes<sup>2</sup>, Walter Gualoto<sup>4</sup>, Leonardo Quintero<sup>3</sup> y Wilmer Baque<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Universidad Agraria del Ecuador. Facultad de Ciencias Agrarias. Guayaquil. Ecuador. Correo electrónico: avegas@uagraria.edu.ec; pmolleda@uagraria.edu.ec; wbaque@uagraria.edu.ec. <sup>2</sup>Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias. Estación Experimental Santo Domingo. Ecuador. Correo electrónico: digner.ortega@iniap.gob.ec; ernesto.paredes@iniap.gob.ec. <sup>3</sup>Maestría en Ingeniería Agrícola. Instituto de Posgrados. Universidad Técnica de Manabí. Portoviejo. Ecuador. Correo electrónico: iquintero9768@utm.edu.ec. <sup>4</sup>Unidad Educativa Santo Domingo de los Colorados. Santo Domingo. Ecuador. Correo electrónico: w.gualoto@gmail.com

### Resumen

Las semillas de palma aceitera se han clasificado como intermedias, germinan lentamente con bajo porcentaje, sin embargo, se puede acortar este tiempo mediante tratamientos *in vivo* e *in vitro*. El objetivo del trabajo fue estudiar el efecto de la suplencia de sorbitol, manitol y sacarosa en la germinación *in vitro* de embriones de híbridos de palma africana del INIAP. Se extrajeron embriones cigóticos de frutos inmaduros de forma aséptica y se implantaron en medios de cultivos básicos semisólidos usando Murashige y Skoog (MS), suplementados con tres fuentes de carbono: sacarosa (3 y 6 %), sorbitol (1,6 y 3 %) y manitol (1,6 y 3 %), bajo fotoperiodo de 16 h luz, a temperatura de 26 ± 2 °C. A 60 días después de la siembra (dds) se evaluó el porcentaje de germinación, el número de hojas

Recibido el 23-08-2019 • Aceptado el 17-03-20

\*Autor de correspondencia. Correo electrónico: avegas@uagraria.edu.ec

y longitudes de la plúmula y raíces. El promedio de germinación estuvo entre 31 y 63 % y sólo ocurrió en presencia de sacarosa o sorbitol. El mayor número de hojas y longitud de plúmula se obtuvo con sacarosa al 3 %, mientras que en los tratamientos con sacarosa al 6 % y sorbitol (1,6 y 3 %) fueron similares. La mayor longitud de raíces se obtuvo con sacarosa al 6 %. Se lograron porcentajes de germinación *in vitro* aceptables para los embriones cigóticos híbridos de palma africana del INIAP y se acortaron los tiempos de germinación en los medios MS suplementados con sorbitol y sacarosa, por lo cual se puede implementar esta metodología para la germinación de parentales o cruces valiosos en programas de mejoramiento genético de palma aceitera.

**Palabras clave:** *Elaeis guineensis*, semilla intermedia, cultivo *in vitro*, latencia.

### Abstract

The seeds of oil palm have been classified as intermediates, they germinate slowly with a low percentage, however, this time can be shortened by *in vivo* and *in vitro* treatments. The objective of the research was to study the effect of sorbitol, mannitol and sucrose supplementation *in vitro* germination of African palm hybrid embryos of the INIAP. Zygotic embryos were extracted from immature fruits in aseptic form and were implemented in semi-solid basic culture media, using Murashige and Skoog (MS), supplemented with three sources of carbon: sucrose (3 and 6 %), sorbitol (1.6 and 3 %) and mannitol (1.6 and 3%), under photoperiod of 16 h light, at a temperature of  $26 \pm 2$  °C. At 60 days after sowing (das), the percentage of germination, the number of leaves and the lengths of nibs and roots were evaluated. The average of germination was between 31 and 63 % and only occurred in sucrose or sorbitol presence. The highest number of leaves and nib length was obtained with sucrose at 3 %, while in sucrose at 6 % and sorbitol treatments (1.6 and 3 %) were similar. The highest length of roots was obtained with sucrose at 6 %. Acceptable *in vitro* germination percentages were achieved, for hybrid zygotic embryos of African palm of the INIAP, and the germination time in the media of MS supplemented with sorbitol and sucrose were shortened, therefore can be implemented this methodology for germination of parentals or valuable crosses in oil palm genetic improvement programs.

**Key words:** *Elaeis guineensis*, intermediate seeds, *in vitro* culture, dormancy.

### Resumo

As sementes de dendê foram classificadas como intermediárias, germinam lentamente com uma baixa porcentagem, entretanto, esse tempo pode ser reduzido por tratamentos *in vivo* e *in vitro*. O objetivo do trabalho foi estudar o efeito da suplementação com sorbitol, manitol e sacarose na germinação *in vitro* de embriões híbridos de palmeira africanos INIAP. Os embriões zigóticos foram

removidos de frutos imaturos asépticamente e implantados em meio de cultura básico semi-sólido, utilizando Murashige e Skoog (MS), suplementados com três fontes de carbono: sacarose (3 e 6 %), sorbitol (1,6 e 3 %) e manitol (1,6 e 3 %), sob fotoperíodo de 16 horas de luz, a uma temperatura de  $26 \pm 2$  °C. Aos 60 dias após a semeadura (dds), foi avaliada a porcentagem de germinação, número de folhas e comprimento das plumulas e raízes. A germinação média foi entre 31 e 63 % e ocorreu apenas na presença de sacarose ou sorbitol. O maior número de folhas e comprimento da fórmula foi obtido com sacarose a 3 %, enquanto nos tratamentos com sacarose a 6 % e sorbitol (1,6 e 3 %) foram semelhantes. O maior comprimento radicular foi obtido com 6 % de sacarose. Porcentagens aceitáveis de germinação *in vitro* foram obtidas para embriões de palma africanos zigóticos híbridos INIAP e os tempos de germinação foram reduzidos em meios MS suplementados com sorbitol e sacarose, portanto, essa metodologia pode ser implementada para a germinação de pais ou cruzamentos valioso em programas de melhoramento genético do dendê.

**Palavras-chave:** *Elaeis guineensis*, semente intermediária, cultura *in vitro*, latencia.

## Introducción

La palma aceitera (*Elaeis guineensis* Jacq.) se reproduce sexualmente por semillas. Debido a que es una planta alógama estricta, los cruces que se realizan para obtener progenies e híbridos deben ser dirigidos para evitar la variabilidad en la descendencia. El Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP) de Ecuador posee un banco de germoplasma *ex situ in vivo* de los materiales genéticos parentales y ensayos de progenie que abarcan unas 100 ha. Por más de 45 años, en la Estación Experimental Santo Domingo del INIAP, se ha venido realizando la selección de parentales, según expresen la mejor combinación de las características vegetativas y de producción, y mediante polinizaciones dirigidas. El híbrido comercial INIAP-Tenera

## Introduction

The oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) reproduces sexually by seeds. Due to, it is a strict allogamous plant, the crosses are realized to obtain progenies and hybrids must be directed to avoid variability in the offspring. The Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP) of Ecuador has a germoplasm bank *ex situ in vivo* of the parental genetic materials and the progeny rehearsals that cover about 100 ha. For more than 45 years, in the Estación Experimental Santo Domingo of the INIAP, have been realized a selection of parentals, as they express the best combination of vegetative and production characteristics, and through targeted pollinations. The commercial hybrid INIAP-Tenera (INIAP, 2015), is produced crossing Dura type plants, with pollen of Pisifera type plants.

se produce cruzando plantas tipo Dura, con polen de plantas tipo Pisifera (INIAP, 2015).

Las semillas de palma aceitera se han clasificado como intermedias, entre recalcitrantes y ortodoxas (Ellis *et al.*, 1991). En condiciones naturales germinan lentamente, en uno a tres años, con un bajo porcentaje. Sin embargo, se puede acortar este periodo de germinación a unos tres meses o más mediante tratamientos de las semillas, y alcanzar entre el 85 y 90 % de germinación. Para ello, las semillas secas almacenadas a una temperatura de 20 a 22 °C con 18 a 19 % de humedad relativa, se remojan y luego se colocan a una temperatura entre 38 a 40 °C durante unos 60 días. Este procedimiento se repite y la germinación comienza 7 a 10 días después y continúa por 30 a 40 días (Cenipalma, 2010).

La latencia es considerada la causa principal de las bajas tasas de germinación encontradas en muchas especies de palmas y ha sido clasificada como latencia morfológica, correlacionándose con la presencia de endocarpos extremadamente duros, endospermos rígido y embriones inmaduros al momento de la dispersión de la semilla. Esta inmadurez retarda la iniciación de la germinación debido al tiempo requerido para alcanzar la diferenciación completa del embrión (Ribeiro *et al.*, 2012; Magalhaes *et al.*, 2013). Por otro lado, estudios recientes han demostrado que la latencia en *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd ex Mart., *Butia odorata* y *Butia capitata* es del tipo fisiológico no profundo que está relacionado a la dificultad que el

The seeds of oil palm have been classified as intermediates, between recalcitrants and orthodoxs (Ellis *et al.*, 1991). In natural conditions, they germinate slowly, in one to three years, with a low percentage. However, this period of germination can be shortened about 3 months or more, through treatments of seeds, and reach between 85 and 90 % of germination. For that, the dry seeds stored at a temperature of 20 to 22 °C with 18 to 19 % of relative moisture, are soaked and then, placed at a temperature between 38 to 40 °C during 60 days. This procedure is repeated and the germination starts 7 to 10 days after and continues for 30 to 40 days (Cenipalma, 2010).

The latency is considered the principal cause of low germination rates found in many species of palms and has been classified as morphological latency, correlating with the presence of extremely hard endocarps, rigid endosperm and immature embryos at the moment of seed dispersal. This immaturity delays the initiation of germination due to the time required to reach the complete differentiation of the embryo (Ribeiro *et al.*, 2012; Magalhaes *et al.*, 2013). On the other hand, recent studies have shown that the latency in *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd ex Mart., *Butia odorata* and *Butia capitata* is of the non-deep physiological type that is related to the difficulty that the embryo finds in overcoming the growth restrictions imposed by the adjacent tissues (Ribeiro *et al.*, 2012; Magalhaes *et al.*, 2013). In *B. capitata cbbc* it is

embrión encuentra para sobreponerse a las restricciones de crecimiento impuestos por los tejidos adyacentes (Ribeiro *et al.*, 2012; Magalhaes *et al.*, 2013). En *B. capitata* se relaciona a la incapacidad del embrión a dislocar el opérculo (Oliveira *et al.*, 2013).

Debido a los factores anteriormente planteados que pueden causar latencia en las semillas de palmas, el cultivo *in vitro* de embriones cigóticos aislados de las semillas ha sido propuesto como una alternativa para favorecer la germinación y la propagación de estas especies pertenecientes a la familia Arecaceae, promoviendo el rompimiento de la latencia (Magalhaes *et al.*, 2013). El estudio de las condiciones *in vitro* de este proceso puede mejorar las técnicas de cultivo, al igual que los estudios anatómicos pueden definir los parámetros morfológicos indicativos de la germinación (Ribeiro *et al.*, 2012).

Se han señalado diferentes medios de cultivo *in vitro* con efectos favorables para la germinación de embriones cigóticos de la palma aceitera. En estudios con el híbrido Tenera, Oliveira *et al.* (2010) evaluaron el efecto de los medios de cultivo Murashige y Skoog (1962) (MS y  $\frac{1}{2}$  MS), Y3 (Eeuwens, 1978) y  $\frac{1}{2}$  Y3, suplementados con sacarosa al 2 % y en estos medios obtuvieron los mejores resultados en los porcentajes de germinación, hasta el 100 %, dependiendo del genotipo. Estos embriones necesitaron de una fuente exógena de suplencia de carbohidratos para promover la germinación y desarrollo de la plántula. La sacarosa

related to the inability of the embryo to dislocate the operculum (Oliveira *et al.*, 2013).

Due to the previously mentioned factors that can cause latency in the seeds of palms, the *in vitro* culture of zygotic embryos isolated from seeds, has been proposed as an alternative to promote germination and the propagation of these species belonging to Arecaceae family, promoting the breakdown of latency (Magalhaes *et al.*, 2013). The study of the *in vitro* conditions of this process can improve the cultivation techniques, just as anatomical studies can define the morphological parameters indicative of germination (Ribeiro *et al.*, 2012).

Different *in vitro* culture media with favorable effects for the germination of zygotic embryos of oil palm have been pointed out. In studies with the Tenera hybrid, Oliveira *et al.* (2010) evaluated the effect of the culture media, Murashige and Skoog (1962) (MS and  $\frac{1}{2}$  MS), Y3 (Eeuwens, 1978) and  $\frac{1}{2}$  Y3, supplemented with sucrose at 2 % and in these media the best results in germination percentages were obtained, until the 100 % depending on the genotype. These embryos needed an exogenous source of carbohydrate supplementation to promote germination and seedling development. The sucrose is the source of carbon more used, probably because, it is the highest source of sugar synthesized, transported and metabolized in plants (Lemoine *et al.*, 2013). The interaction between the sucrose concentrations and physiological age of the embryos in mature and immature seeds has

es la fuente de carbono más utilizada, probablemente debido a que es la mayor fuente de azúcar sintetizada, transportada y metabolizada en las plantas (Lemoine *et al.*, 2013). Se ha mostrado la interacción entre las concentraciones de sacarosa y la edad fisiológica de los embriones en semillas maduras e inmaduras. Los embriones inmaduros requieren de fuentes de carbohidratos para el desarrollo, y cuantos más jóvenes requerirán una mayor concentración u osmolaridad. Otros autores han obtenido altos porcentajes de germinación, entre el 70 y 100 % cuando utilizaron el medio básico MS y sacarosa entre 3 y 4 % (Hilae y Te-chato, 2005; Quispe, 2016; Vegas *et al.*, 2016).

Existe un número de especies que pueden crecer en otras fuentes alternativas, tales como manitol, sorbitol, glicerol, glucosa y fructosa. El manitol y el sorbitol son polialcoholes producidos en la fotosíntesis de ciertas plantas (Stoop *et al.*, 1996; Lemoine *et al.*, 2013). El manitol es el azúcar alcohol más distribuido en el reino vegetal y ha sido utilizado con efectos positivos en el cultivo *in vitro* de especies que lo producen y lo translocan en el floema (Stoop *et al.*, 1996). El manitol y el sorbitol funcionan como fuente de carbono y energía en cultivos *in vitro* si la especie los produce de forma natural, posee enzimas que los puedan metabolizar o no se inhibe la absorción de estos carbohidratos (Lozzi *et al.*, 2019). El uso de estos azúcares en especies que no los metabolizan provoca la disminución de la tasa de crecimiento, la capacidad

been shown. The immature embryos require of carbohydrate sources for development, and how much younger, they will need a higher concentration or osmolarity. Other authors have obtained high germination percentages, between 70 and 100 % when they used the basic media MS and sucrose between 3 and 4 % (Hilae and Te-chato, 2005; Quispe, 2016; Vegas *et al.*, 2016).

A number of species that can grow in other alternative sources exist, such as mannitol, sorbitol, glycerol, glucose and fructose. The mannitol and sorbitol are polyols produced in the photosynthesis of some plants (Stoop *et al.*, 1996; Lemoine *et al.*, 2013). The mannitol is the sugar alcohol most distributed in the vegetable kingdom and has been used with positive effects in the *in vitro* culture of species that produce it and translocate it in the phloem (Stoop *et al.*, 1996). The mannitol and the sorbitol work as source of carbon and energy in *in vitro* cultures, if the specie produces them by a natural form, it has enzymes than can metabolize them or the absorption of these carbohydrates is not inhibited (Lozzi *et al.*, 2019). The use of these sugars in species that do not metabolize them, produces the decreased of growth rate, morphogenesis capacity or culture survival (Lemoine *et al.*, 2013; Lozzi *et al.*, 2019).

The zygotic embryos of olive (*Olea europea* L.) and the forest ornamental specie *Austrochthamalia teryucuaensis* H.A. Keller germinate without sucrose, however, they need a source of carbohydrate for the

de morfogénesis o la supervivencia del cultivo (Lemoine *et al.*, 2013; Lozzi *et al.*, 2019).

Los embriones cigóticos de olivo (*Olea europaea* L.) y la especie ornamental forestal *Austrochthamalia teyucaurensis* H.A. Keller germinan sin sacarosa, sin embargo, necesitan una fuente de carbohidrato para el desarrollo de las plántulas, y la sacarosa ha funcionado para este propósito, y en el primer caso también el manitol se ha implementado con éxito (García *et al.*, 2002; Duarte *et al.*, 2017). El manitol se ha utilizado en el cultivo *in vitro* de fresno (*Fraxinus americana* L.) y en suspensiones celulares de celerí (*Apium graveolens* L.), sin embargo, cultivos de células de otras especies como la zanahoria (*Daucus carota* L.) y el pino Monterey (*Pinus radiata* D. Don), se desarrollaron poco en su presencia (Nadel *et al.*, 1989). El manitol a 0,1, 0,2 y 0,3 M (entre 2 y 5,5 %) en medios MS inhibió la germinación de los embriones somáticos y la embriogénesis secundaria de palma africana, a partir de hojas jóvenes, sin embargo, con sorbitol se obtuvieron altos porcentajes de embriogénesis secundaria y ocurrió la germinación de los embriones somáticos, al igual que en presencia de sacarosa (Hilae y Te-chato, 2005).

El sorbitol ha sido utilizado en medios de cultivo a 36 g.L<sup>-1</sup> lográndose la geminación del 100 % de los embriones cigóticos de palma africana (Hilae y Te-chato, 2005). En las plántulas *in vitro* obtenidas, la sacarosa y el sorbitol se mostraron más adecuados que el manitol para el mantenimiento

development of seedlings, and the sucrose has worked for this purpose and in the first case, mannitol has also been successfully implemented. (García *et al.*, 2002; Duarte *et al.*, 2017). The mannitol has been used in the *in vitro* culture of fresno (*Fraxinus americana* L.) and in cell suspensions of celerí (*Apium graveolens* L.), however, cell cultures of other species as carrot (*Daucus carota* L.) and the pino Monterey (*Pinus radiata* D. Don), were a little bit developed in their presence (Nadel *et al.*, 1989). The mannitol at 0.1, 0.2 and 0.3 M (between 2 and 5.5 %) in MS media, inhibited the germination of somatic embryos and the secondary embryogenesis of African palm, from young leaves, however, with sorbitol high percentages of secondary embryogenesis were obtained, and occurred the germination of somatic embryos, just as in the presence of sucrose (Hilae and Te-chato, 2005).

The sorbitol has been used in culture media at 36 g.L<sup>-1</sup> achieving germination of 100 % of the zygotic embryos of African palm (Hilae and Te-chato, 2005). In the *in vitro* seedlings obtained, the sucrose and sorbitol were more adequate than the mannitol for the maintenance of themselves quality, and even though mannitol promotes the least growth, the survival was significantly reduced after 12 months in conservation (Camillo, 2012).

On the other hand, the *in vitro* germination of zygotic embryos of interspecific crosses between *E. guineensis* with pollen of *E. oleifera* was higher in MS media

de la calidad de las mismas, y aun cuando el manitol promueve el menor crecimiento, la sobrevivencia se redujo significativamente después de 12 meses en conservación (Camillo, 2012).

Por otro lado, la germinación *in vitro* de embriones cigóticos de cruces interespecíficos entre *E. guineensis* con polen de *E. oleifera* fue mayor en medios MS suplementados con glucosa (10 o 20 g.L<sup>-1</sup>), que en sacarosa a 30 g.L<sup>-1</sup>. La glucosa en concentraciones de 20 a 30 g.L<sup>-1</sup> proveyó el balance en el desarrollo de tallos y raíces y por lo tanto mayor frecuencia en el establecimiento de plántulas (Da Silva *et al.*, 2011).

Además de la constitución de los medios de cultivo *in vitro*, la edad fisiológica del embrión y el uso de semillas recién cosechadas estimula la germinación *in vitro* de varias especies de palmas, debido a que embriones inmaduros de palma aceitera con longitudes inferiores a 2 mm han presentado problemas en la diferenciación (formación de callos y falta de diferenciación de estructuras como plúmula, radícula y haustorio) (Villa *et al.*, 2007), además al cabo de dos semanas o más de cosechadas pierden la viabilidad (Ribeiro, *et al.*, 2012; Mayo *et al.*, 2017).

Por lo anteriormente expuesto el presente trabajo tuvo como objetivo estudiar el efecto de la suplencia de sorbitol, manitol y la sacarosa en la germinación *in vitro* de embriones cigóticos híbridos del material INIAP-Tenera, como apoyo a los programas de mejoramiento genético de la especie.

supplemented with glucose (10 or 20 g.L<sup>-1</sup>), than in sucrose at 30 g.L<sup>-1</sup>. The glucose in concentrations of 20 to 30 g.L<sup>-1</sup> provided the balance in the development of stems and roots, and therefore higher frequency in the establishment of seedling (Da Silva *et al.*, 2011).

In addition to the constitution of the *in vitro* culture media, the embryo physiological age and the use of freshly harvested seeds stimulate the *in vitro* germination of various species of palm, due to the immature embryos of oil palm with lower lengths to 2 mm have presented problems in the differentiation (Formation of callus and absence of differentiation of structures such as nib, root and haustorio) (Villa *et al.*, 2007), also after two weeks or more, of harvested they lose the viability (Ribeiro, *et al.*, 2012; Mayo *et al.*, 2017).

According to the mentioned before, the present research had as objective to study the effect of sorbitol, mannitol and sucrose supplementation in the *in vitro* germination of the hybrid zygotic embryos of the INIAP-Tenera material, as support of genetic improvement programs of the specie.

## Materials and methods

### Vegetable material

From the INIAP-Tenera oil palm hybrid, located in the Estación Experimental Santo Domingo (Republic of Ecuador), was selected a bunch of immature fruits of 79 to 84 days approximately, after anthesis, according to the description realized by Cenipalma (2010). The fruits were



## Materiales y métodos

### Material vegetal

Del híbrido de palma aceitera INIAP-Tenera ubicado en la Estación Experimental Santo Domingo (República del Ecuador), se seleccionó un racimo con frutos inmaduros de unos 79 a 84 días aproximadamente después de la antesis, de acuerdo a la descripción realizada por Cenipalma (2010). Los frutos se caracterizaron por poseer un color pardo negruzco en la zona apical y central del exocarpio, conservando la parte basal de un color crema amarillo-verde, en los cuales, al realizar cortes longitudinales con un estilete, se observaron los cuescos de color pardo pálido, endospermos semisólidos y embriones formados (figura 1a)

En el laboratorio se eliminaron las bractéolas de los frutos recién cosechados y estos últimos se lavaron con agua corriente y jabón líquido hasta eliminar completamente el detergente. Previo a la siembra de los embriones, se tomaron 10 de los frutos, los cuales se cortaron longitudinalmente y se realizaron las mediciones de sus partes con una cinta métrica en cm: largo x ancho del fruto (figura 1a); ancho superior x ancho inferior, y ancho derecho x ancho izquierdo del pericarpio; largo x ancho del endospermo; ancho del endocarpio y tamaño del embrión. De esta manera se verificó que los embriones excedieran los 2 mm (figura 1c).

### Desinfección del material

characterized by having a blackish brown color in the apical and central area of the exocarpi, keeping the basal part of a yellow-green cream color, which when making longitudinal cuts with a stiletto, pale brown cracks were observed, semi-solid endosperms and formed embryos (figure 1a)

At the laboratory, the bracteoles of the freshly harvested fruits were removed and these last were washed with running water and liquid soap until the detergent is completely eliminated. Prior to sowing the embryos, 10 of the fruits were taken, which were cut longitudinally and the measurements of their parts were realized with a measuring tape in cm: long x width of the fruit (figure 1a); top width x bottom width, and right width x left width of pericarp; long x width of endosperm; width of endocarpi and embryo size. In this way was verified that the embryos exceeded 2 mm (figure 1c).

### Disinfection of vegetable material and extraction of zygotic embryos

The pericarp was eliminated (exocarpi and mesocarpi) with the help of a stiletto and later the cracks with the use of a nut opener. Inside the laminar flow hood, the endosperms that contained the zygotic embryos were superficially disinfected with an isopropyl alcohol solution (70 %) for 3 min, followed by a 2.5 A.I sodium hypochlorite solution for 20 min. Finally, three washes with sterile distilled water (SDW) were performed, of 5 min each one (Balzon *et al.*, 2013; Vegas *et al.*, 2016). Zygotic embryos were removed with the help

## vegetal y extracción de los embriones cigóticos

Se eliminó el pericarpio (exocarpio y mesocarpio) con la ayuda de un estilete y posteriormente los cuescos con el uso de un abrenueces. Dentro de la campana de flujo laminar, los endospermos que contenían los embriones cigóticos se desinfectaron superficialmente con una solución de alcohol isopropílico (70 %) por 3 min seguido por una solución de hipoclorito de sodio al 2,5 % I.A. por 20 min. Finalmente, se realizaron tres lavados con agua destilada estéril (ADE), de 5 min cada uno (Balzon *et al.*, 2013; Vegas *et al.*, 2016). Con la ayuda de un bisturí y una aguja de disección se extrajeron los embriones cigóticos, distinguibles por una coloración verde pálida (figura 1b y c).

## Evaluación del efecto de la fuente de carbono sobre la germinación de embriones cigóticos

Los embriones se implantaron individualmente en tubos de ensayo de 25 x 150 mm con 20 mL del medio de germinación básico constituido por las sales de MS, suplementado con tres fuentes de carbono cada una a dos concentraciones: sacarosa 3 y 6 %; manitol y sorbitol 1,6 y 3 %, además de un testigo sin fuente de carbono; agar 7,5 g.L<sup>-1</sup>, conformando siete tratamientos. El pH del medio de cultivo se ajustó a 5,7 con una solución de KOH 1N. Los medios de cultivo fueron esterilizados en la autoclave por 15 min, a una temperatura de 121 °C y una presión de 15 lb de vapor. Los embriones cigóticos se mantuvieron en condiciones de luz,

of a scalpel and a dissecting needle, distinguishable by a pale green coloring (figure 1b and c).

## Evaluation of the carbon source on the germination of zygotic embryos

The embryos were implanted individually in test tubes of 25 x 150 mm with 20 mL of the basic germination media constituted by salts of MS, supplemented with three carbon sources each one at two concentrations: sucrose 3 and 6 %; mannitol and sorbitol 1.6 and 3 %, in addition of a control without carbon source agar 7.5 g.L<sup>-1</sup>, shaping seven treatments. The pH of culture media was adjusted to 5.7 with a solution of KOH 1N. The culture media were sterilized in the autoclave for 15 min, at a temperature of 121°C and a pressure of 15 lb of steam. The zygotic embryos were kept in light conditions, with a light intensity of 50 μmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> and photoperiod of 16 h light, at a temperature of 26 ± 2 °C (Vegas *et al.*, 2016)

A completely randomized design with seven treatments was used (culture media) and 16 repetitions. The zygotic embryos were sown individually in test tubes for a total of 112 embryos. Weekly evaluations up to 60 days after sowing were realized (das) considering as germinated embryos, those who had the pod developed and the number of leaves were counted and the length of the nibs and the roots of the seedlings were measured in cm (figure 1d). Also, the number of embryos without growth and swollen were registered. A multiple comparison test Kuskal

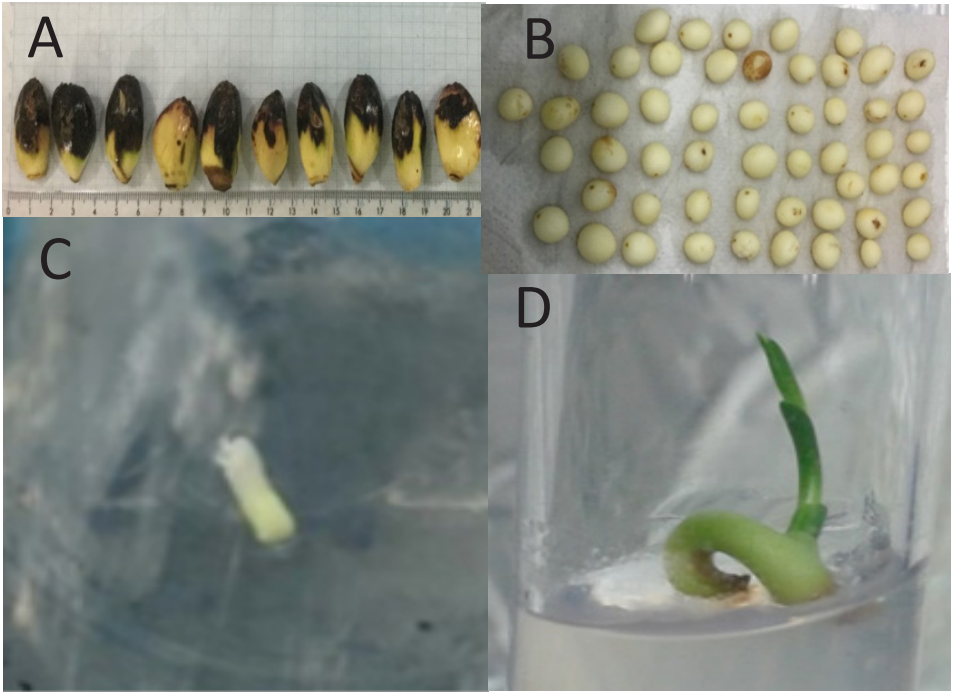


Figura 1. Palma africana de origen INIAP: a. Frutos inmaduros (3,02 x 1,42 cm en promedio); b. Endospermos semisólidos con embriones desinfectados; c. Embrión implantado en medio de cultivo (0,34 cm, en promedio); d. Plántula, a los 30 días después de la siembra de los embriones.

Figure 1. African palm of INIAP origin: a. Immature fruits (3.02 x 1.42 cm on average); b. Semi-solid endosperms with disinfected embryos; c. Implanted embryo in culture media (0.34 cm, on average); d. Seedlings, at 30 days after embryos sowing.

con una intensidad lumínica de 50  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  y fotoperíodo de 16 h luz, a una temperatura de  $26 \pm 2$  °C (Vegas *et al.*, 2016).

Se utilizó un diseño completamente al azar con siete tratamientos (medios de cultivo) y 16 repeticiones. Los embriones cigóticos se sembraron individualmente en tubos de ensayo para un total de 112 embriones. Se realizaron evaluaciones semanales hasta los 60 días después de la siembra (dds) considerándose como

Wallis at 5 % was realized with the statistical program InfoStat (2001), to determinate the significant differences between treatments.

## Results and discussion

### Effect of carbon source on the zygotic embryos germination of African palm

In the media of *in vitro* culture used, the germination of the embryos started between 12 to 14 das. The

embriones germinados, aquellos que tuvieron la vaina desarrollada, y se contabilizó el número de hojas y midieron la longitud de las plúmulas y las raíces de las plántulas en cm (figura 1d). Además, se registró el número de embriones sin crecimiento e hinchados. Se realizó una prueba de comparación múltiple Kuskal Wallis al 5 % con el programa estadístico InfoStat (2001), para determinar las diferencias significativas entre los tratamientos.

## Resultados y discusión

### Efecto de la fuente de carbono sobre la germinación de embriones cigóticos de palma africana

En los medios de cultivo *in vitro* utilizados, la germinación de los embriones se inició entre los 12 a 14 dds. Los mayores porcentajes de germinación estuvieron entre 31 y 63 %, en los medios de cultivo suplementados con sacarosa y sorbitol. Los mayores porcentajes de germinación se obtuvieron en presencia de sacarosa y sorbitol al 3 %, seguidos por sacarosa al 6 % y sorbitol al 1,6 %. Por otro lado, no se observó germinación en los tratamientos con manitol y el testigo (cuadro 1).

En los tratamientos donde hubo germinación, el mayor número de hojas y longitud de plúmula se obtuvo en presencia de sacarosa al 3 % con valores respectivos de 0,81 cm y 2,54 cm, seguidos por los tratamientos con sorbitol al 3 % (0,50 cm y 1,69 cm) y al 1,6 (0,56 cm y 0,99 cm) y sacarosa al 6 % (0,31 cm y 1,50 cm), que resultaron significativamente diferentes al

highest percentages of germination were between 31 and 63 %, in the culture media supplemented with sucrose and sorbitol. The highest percentages of germination were obtained in presence of sucrose and sorbitol at 3 %, followed by sucrose at 6 % and sorbitol at 1.6 %. On the other hand, the germination in treatments with mannitol and the control was not observed (table 1).

In treatments where there was germination, the highest number of leaves and length of nib were obtained in presence of sucrose at 3 % with respective values of 0.81 cm and 2.54 cm, followed by treatments with sorbitol at 3 % (0.50 cm and 1.69 cm) and at 1.6 (0.56 cm and 0.99 cm) and sucrose at 6 % (0.31 cm and 1.50 cm), that were significantly different from to the first treatment regarding to the number of leaves but were similar to each other regarding to the length of the nib. The number of leaves was kept around of one in the germinate embryos (table 1). However, in the length of the roots, was observed that the highest length occurred in presence of sucrose at 6 % with 1.34 cm and the rest had low values between 0 cm to 0.31 cm (table 1). In general, in the culture media supplemented with sucrose and sorbitol there was little production of roots, and the number of roots was higher in sucrose at 6 % (Data not showed). On the other hand, there was not root formation in sorbitol at 1.6 % (table 1).

At 60 das, the seedlings developed a length of nib between 0.99 to 2.54 cm and a length of root between 0.17

primer tratamiento con respecto al número de hojas pero similares entre sí en lo que respecta a la longitud de la plúmula. El número de hojas se mantuvo alrededor de uno en los embriones germinados (cuadro 1). Sin embargo, en la longitud de las raíces se observó que la mayor longitud ocurrió en presencia de sacarosa al 6 % con 1,34 cm y el resto presentaron valores bajos entre 0 cm a 0,31 cm (cuadro 1). En general, en los medios de cultivo suplementados con sacarosa y sorbitol hubo poca producción de raíces, y el número de raíces fue mayor en sacarosa al 6 % (datos no mostrados). Por otro lado, en sorbitol al 1,6 % no hubo formación de raíces (cuadro 1).

A los 60 dds, las plántulas desarrollaron una longitud de plúmula entre 0,99 a 2,54 cm y una longitud de raíz entre 0,17 a 1,34 cm, y tanto la sacarosa como el sorbitol promovieron el desarrollo de estos órganos (cuadro 1).

Además, se observó que, en los tratamientos con sacarosa y sorbitol, entre el 25 y 38 % de los embriones se hincharon sin germinar y lograron alcanzar una longitud de hasta 3 cm de largo, mientras que entre un 75 al 100 % permanecieron sin cambio aparente en los tratamientos suplementados con manitol y el testigo.

Se registró un bajo porcentaje de contaminación de origen fúngico con valores de 0 y 0,19 % en el material vegetal, el cual fue descartado.

Según el análisis estadístico de Kruskal-Wallis (cuadro 1) se encontraron diferencias significativas

to 1.34 cm, and both sucrose and sorbitol promoted the development of these organs (table 1).

In addition, was observed that, the treatments with sucrose and sorbitol, between 25 and 38 % of embryos were swelled without germinating and managed to reach a length of up to 3 cm of length, while, between 75 to 100 % they remained without apparent change in treatments supplemented with mannitol and the control.

A low percentage of fungal contamination was recorded with values of 0 and 0.19 % in the vegetable material, which was discarded (table 1).

According to the Kruskal-Wallis statistical analysis (table 1) significant differences were found between the treatments for germination variables, embryos without growth, swollen embryos, number of leaves and length of nibs and roots.

The percentages of germination achieved in this research are similar to those mentioned by Vegas *et al.* (2016), while the other authors have mentioned percentages up to 100 %, dependent of genotype (Hilae and Te-chato, 2005; Oliveira *et al.*, 2010; Quispe, 2016). Quispe (2016) determined that the embryos of African palm at 90 days after the anthesis had a better behavior, using the MS culture media supplemented with 40 grams of sucrose obtaining a percentage of germination (100 %), where 50 % were complete plants and the other 50 % were sprouts.

According to our results the presence of mannitol (1.6 and 3 %) in the media culture, and the absence of a carbon source in the control

**Cuadro 1. Rangos y medias del efecto de tres fuentes de carbono sobre la germinación de embriones cigóticos de palma africana a los 60 días después de la siembra.**

**Table 1. Ranges and means of the effect of three carbon sources on the germination of zygotic embryos of African palm at 60 days after sowing.**

Tratamientos	Embriones germinados		Embriones sin crecimiento		Embriones hinchados		Numero de hojas		Longitud de raíces (cm)		Longitud de plúmula (cm)	
SACAROSA 3 %	0,63	B	0,13	A	0,25	A (*)	0,81	B	0,31	A	2,54	B
SACAROSA 6 %	0,44	B	0,06	A	0,38	A	0,31	AB	1,34	A	1,50	AB
SORBITOL 1,6 %	0,31	B	0,25	A	0,25	A	0,56	B	0,00	A	0,99	AB
SORBITOL 3 %	0,50	B	0,06	A	0,38	A	0,50	B	0,17	A	1,69	B
MANITOL 1,6 %	0,00	A	1,00	B	0,00	A	0,00	A	0,00	A	0,00	A
MANITOL 3 %	0,00	A	0,75	B	0,13	A	0,00	A	0,00A		0,00	A
TESTIGO	0,00	A	1,00	B	0,00	A	0,00	A	0,00	A	0,00	A

(\*) Letras iguales significan que no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos para la prueba de Kruskal-Wallis ( $p > 0,05$ )

(\*) Equal letters mean that statistically significant differences were not observed between treatments for Kruskal-Wallis test ( $p > 0.05$ )

entre los tratamientos para las variables de germinación, embriones sin crecimiento, número de hojas y longitud de plúmulas.

Los porcentajes de germinación alcanzados en este trabajo son similares a los mencionados por Vegas *et al.* (2016), mientras que otros autores han señalado porcentajes hasta del 100 %, dependientes del genotipo (Hilae y Te-chato, 2005; Oliveira *et al.*, 2010; Quispe, 2016). Quispe (2016) determinó que los embriones de palma africana de 90 días después de la antesis tuvieron un mejor comportamiento, utilizando el medio de cultivo MS suplementado con 40 gramos de sacarosa obteniendo un porcentaje de germinación de 100 % donde el 50 % fueron plantas completas y el otro 50 % fueron brotes.

Según nuestros resultados la presencia de manitol (1,6 y 3 %) en los medios de cultivo, y la falta de fuente de carbono en el tratamiento testigo no permitió la germinación de los embriones cigóticos de palma africana, y hubo muy poco crecimiento de los embriones, permaneciendo la mayoría de color crema sin ningún cambio morfológico. Esto ha sido corroborado por Hilae y Te-chato (2005) usando embriones somáticos de esta especie en concentraciones de manitol entre 2 y 5,5 %.

En este trabajo se comprueba que el manitol al 1 y 3 % no es recomendable como fuente de carbono para la germinación *in vitro* de los embriones cigóticos de palma porque se ha demostrado que tiene un efecto inhibitorio en embriones somáticos

treatment did not allow the zygotic embryos germination of African palm, and there was a very little growth of the embryos, most of them remained with a cream color without any morphological change. This has been corroborated by Hilae and Te-chato (2005) using somatic embryos of this specie in mannitol concentrations between 2 and 5.5 %.

In this research is verified that the mannitol at 1 and 3 % is not recommended as a carbon source for the *in vitro* germination of zygotic embryos of palm because has been shown that it has an inhibitory effect in somatic embryos and it is not produced in photosynthesis and also this effect is not due to the decrease in the osmotic potential of media culture, since isomolar sucrose solutions at 3 and 6 %, (0.088 and 0.176 M) and sorbitol at 1 and 3 %, (0.088 and 0.176 M) had positive effects in the germination (Hilae and Te-chato, 2005).

## Conclusions

In MS media supplemented with sucrose and sorbitol at 3 %, acceptable percentages of germination are obtained for zygotic embryos (of 0.34 cm on average) of recently collected immature fruits of the INIAP material ( $\leq$  at 63 %). Through this *in vitro* methodology the times of germination can be shortened, in more than 2 months, if it is compared with the conventional seed germination process. The mentioned before justifies the use of *in vitro* culture

y no es producido en la fotosíntesis. Además este efecto no se debe al descenso en el potencial osmótico del medio de cultivo, ya que las soluciones isomolares de sacarosa al 3 y 6 %, (0,088 y 0,176 M) y sorbitol al 1 y 3 %, (0,088 y 0,176 M) tuvieron efectos positivos en la germinación (Hilae y Te-chato, 2005).

## Conclusiones

En los medios MS suplementados con sacarosa y sorbitol al 3 % se obtienen porcentajes de germinación aceptables hasta 63 % para los embriones cigóticos de 0,34 cm de promedio, de los frutos inmaduros del material INIAP recién colectados.

Mediante esta metodología *in vitro* se pueden acortar los tiempos de germinación, en más de 2 meses si se compara con el proceso convencional de germinación de semillas. Lo anterior justifica la utilización del cultivo *in vitro* de embriones cigóticos para la germinación a corto plazo de parentales o cruces valiosos.

## Agradecimiento

Proyecto “Mejora genética de la Palma aceitera con fines de resistencia a la pudrición del cogollo, en la provincia de Esmeraldas, Ecuador”. Programa Prometeo. SENESCYT.

Proyecto “La Micropropagación de especies de palma aceitera como herramienta para la conservación y el mejoramiento genético”. Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Sede Esmeraldas (PUCESE).

Proyecto “Siembra *in vitro* de

of zygotic embryos for the short-term germination of parentals or valuable crosses.

## Acknowledgement

“Genetic improvement of oil palm to the purpose of resistance to bud rot”, in the province of Esmeraldas, Ecuador Project. Programa Prometeo. SENESCYT.

“The micropropagation of oil palm species as a tool for conservation and genetic improvement” Project. Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Esmeraldas seat (PUCESE).

“*In vitro* sowing of zygotic embryos of INIAP Tenera hybrid of African palm in MS culture media supplemented with different carbohydrate sources (Sucrose, sorbitol and mannitol)” Project. Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Esmeraldas seat (PUCESE).

## End of English Version

embriones cigóticos del híbrido INIAP Tenera de Palma Africana en medios de cultivo MS suplementados con diferentes fuentes de carbohidratos (Sacarosa, Sorbitol y Manitol)”. Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Sede Esmeraldas (PUCESE).

## Literatura citada

- Balzon, T., L. Zanderluce, and J. Scherwinski-Pereira. 2013. New approaches to improve the efficiency of somatic embryogenesis in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) from mature zygotic embryos. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* Plant 49: 41-50.
- Camillo, J. 2012. Diversidad genética,



- conservación *in vitro* de germoplasma e análise do conteúdo de DNA nuclear em palma de óleo (*Elaeis guineensis* Jacq., *Elaeis oleifera* (Kunth) Cortés). Tesis de Doctorado. Universidad de Brasilia. 137p. Disponible en: [https://repositorio.unb.br/bitstream/10482/12001/1/2012\\_JulceiaCamillo.pdf](https://repositorio.unb.br/bitstream/10482/12001/1/2012_JulceiaCamillo.pdf). Fecha de consulta: agosto 2019.
- Cenipalma. 2010. Fenología de la palma de aceite africana (*Elaeis guineensis* Jacq.) y del híbrido interespecífico (*Elaeis oleifera* x *Elaeis guineensis*). Colciencias. Bogotá D.C., Colombia. 110 p.
- Da Silva, P., L. Cardoso, M. Lopes, N. Reis, R. Viera and R. Caetano. 2011. *In vitro* rescue of interspecific embryos from *Elaeis guineensis* x *E. oleifera* (Arecaceae). Rev. Biol. Trop. 59 (3): 1081-1088.
- Duarte, E., Rocha, S. y Niella, F. 2017. Cultivo *in vitro* de embriones cigóticos: una estrategia de conservación para *Austrochthamalia teyucuarensis* H.A. Keller. Yuyraretá 24: 51-56.
- Eeuwens, C. 1978. Mineral requirements for growth and callus initiation of tissue explants excised from mature coconut palms (*Cocos nucifera*) and cultured *in vitro*. Physiol. Plant. 36: 23-28.
- Ellis, R., T. Hong, E. Roberts, and U. Soetisna. 1991. Seed storage behaviour in *Elaeis guineensis*. Seed Sci. Res. 1(2): 99-104.
- InfoStat 2001. InfoStat versión 1. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba. Argentina. Disponible en: [www.infostat.com.ar](http://www.infostat.com.ar). Fecha de consulta: enero 2018.
- INIAP. 2015. Manual del cultivo de la palma aceitera. Manual Técnico N° 102. 100 p. Disponible en: <https://repositorio.iniap.gob.ec/handle/41000/3871>. Fecha de consulta: enero 2018.
- García, J., J. Troncoso, R. Sarmiento and A. Troncoso. 2002. Influence of carbon source and concentration on the *in vitro* development of olive zygotic embryos and explants raised from them. Plant Cell, Tiss. Org. 69: 95-100.
- Hilae, A., and S. Te-chato. 2005. Effects of carbón sources and strength of MS médium on germination of somatic embryos of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). Songklanakarin J. Sci. Technol. (Suppl. 3): 629-635.
- Lemoine, R., S. La Camera, R. Atanassova, F. Dédaldéchamp, T. Allario, N. Pourtau, J. Bonnemain, M. Laloï, P. Coutos-Thévenot, L. Maurousset, M. Faucher, C. Girousse, P. Lemonnier, J. Parrilla, M. Durand. 2013. Source-to-sink transport of sugar and regulation by environmental factors. Front. Plant Sci. 4: 272. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00272>
- Lozzi, A., R. Abdelwahd, D. Alami-Halimi, R. Mentag and A. Abousalim. 2019. Optimización de un Sistema de cultivo *in vitro* basado en cotiledones maduros para la inducción de callos embriogénicos de algarrobo *Ceratonia siliqua* L. RCHSCFA 25 (1): 71-84.
- Magalhaes, H., P. Lopes, L. Ribeiro, B. Sant'Anna-Santos, and D. Oliveira. Structure of the zygotic embryos and seedlings of *Butia capitata* (Arecaceae). 2013. Trees 27: 273-283.
- Mayo, A., J. Espinosa, D. Centurión y J. Cazares. 2017. Estrategias para mejorar la geminación de semillas de *Calyptrogyne ghiesbreghtiana* (Linden & H. Wendlan). Polibotánica Núm. 43, pp 1-10, ISSN 1405-2768.
- Murashige, T., and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15: 473-497.
- Nadel, B., A. Altman and M. Ziv. 1989. Regulation of somatic embryogenesis in celery cell suspensions. Plant Cell, Tiss. Org. 18: 181-189.
- Oliveira, J., V. Savonitti, O. Filfueira, and I. Lima. 2010. Obtencao de plantulas de híbridos de dendezeiro por cultivo *in vitro*. Rev. Ci. Agra 53: 177-181.
- Oliveira, N., P. Lopes, L. Oliveira and F. Silvério. 2013. Seed structure, germination, and reserve mobilization in *Butia capitata* (Arecaceae). Trees 27: 1633-1645.
- Quispe, M. 2016. Propagación *in vitro* de *Elaeis guineensis* jacq. a partir de embriones cigóticos. Tesis de grado.

Universidad Nacional Agraria La Molina. 119 p. Disponible en: <http://repositorio.lamolina.edu.pe/bitstream/handle/UNALM/2673/K10-Q8-T.pdf?sequence=3&isAllowed=y>. Fecha de consulta: enero 2018.

E. Rebolledo, L. Quintero y J. Ortega. 2016. Respuesta de la palma africana híbrido INIAP-Tenera cultivada *in vitro* según el tipo de explante y niveles de ácido naftalenacético. Bioagro 28: 193-200.

Ribeiro, L., D. Oliveira, and Q. García. 2012. Structural evaluations of zygotic embryos and seedlings of the macaw palm (*Acrocomia aculeata*, Arecaceae) during *in vitro* germination. Trees 26: 851-863.

Villa, A., P. Jiménez, R. Valbuena, S. Bastidas y V. Nuñez. 2007. Estudio preliminar para el establecimiento de un protocolo de criopreservación para la palma de aceite (*Elaeis guineensis* Jacq.). Agron. Colomb. 25 (2): 215-223.

Stoop, J., J. Williamson and D. Mason. 1996. Manitol metabolism in plants: a method for coping with stress. Trends in Plant Sci. 1 (5): 139-144.

Vegas, A., D. Ortega, W. Gualoto, E. Paredes,