



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

**Caracterización de suspensiones celulares de cocotero (*Cocos
nucifera* L.) para la obtención de embriogénesis somática**

Tesis que presenta

ALEJANDRO NÚÑEZ ENRÍQUEZ

En opción al título de

MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

(Ciencias Biológicas: Opción Bioquímica y Biología Molecular)

Mérida, Yucatán

Julio, 2022

CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis de **Alejandro Núñez Enríquez** titulado **Caracterización de suspensiones celulares de cocotero (*Cocos nucifera* L.) para la obtención de embriogénesis somática** fue realizado en los laboratorios de la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección del **Dr. Víctor Manuel Loyola Vargas**, dentro de la **opción de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas**, perteneciente al Programa de Posgrado de Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente



Dra. Cecilia Hernández Zepeda

Directora de Docencia

Mérida, Yucatán, México, 24 de junio de 2022

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos Experimentales, los Resultados y Discusión de este documento proviene de las actividades de experimentación realizadas durante el período que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y que a razón de lo anterior y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, le pertenece patrimonialmente a dicho Centro de Investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que deriven o pudieran derivar de lo correspondiente a dicha información, le pertenecen patrimonialmente al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y el mismo tenor, reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, éstos se registrarán en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.



Alejandro Nuñez Enriquez

Este trabajo se llevó a cabo en la Unidad de **Bioquímica y Biología Molecular de Plantas**, del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A. C., y forma parte del proyecto titulado **Impulso a la cadena de valor del cocotero para incrementar su competitividad y contribuir al desarrollo socio-económico en la región Pacífico sur y otros estados productores, FORDECYT, 296195**, bajo la dirección del **Dr. Víctor Manuel Loyola Vargas**.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada (No. 760232) del periodo 01/02/2020 al 31/01/2022 y el financiamiento al proyecto de esta tesis asociada al CVU 1035097.

Al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A. C., Por siempre ser una institución con las puertas abiertas para la generación de conocimiento.

A mi director de tesis Dr. Víctor Manuel Loyola Vargas, por su dedicación y apoyo en mi formación, así como el apoyo hacia mi proyecto de tesis y la resolución de la misma.

A la M. en C. Rosa María Galaz Ávalos, por su entrega en el laboratorio, su amabilidad y paciencia al momento enseñar alguna técnica que aborde el cultivo de tejidos vegetales. Y su invaluable amistad.

A mi comité tutorial, la Dra. Sara Luz Náhuat Dzib y el Dr. Luis Alfonso Sáenz Carbonell por sus observaciones y sugerencias para el desarrollo de este trabajo.

A mis revisores de tesis también conformado por el Dra. Nancy Santana Buzzy y el Dr. Víctor Manuel Aguilar Hernández por sus observaciones hacia este trabajo.

A mis compañeros del laboratorio 24 y de la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas, por enseñarme de viva voz o en acciones, como se puede llegar a trabajar de una manera óptima y adecuada dentro de las instalaciones.

DEDICATORIAS

A mi núcleo familiar, por siempre perseverar ante cualquier situación. Por su apoyo y respeto.

A mis amigos, porque siempre a pesar de la ausencia y distancia seguimos juntos.

A cada uno de mis profesores que se llegue a topar este documento. Gracias por ser un pilar con gran vocación.

A la resiliencia colectiva.

Índice

Contenido

Introducción	1
CAPÍTULO I.....	2
Antecedentes.....	2
1. <i>Cocos nucifera</i> L.	2
1.1 Origen y distribución.....	3
1.1.1 Variedades de coco.....	12
1.1.2 Variedades nativas y sistemas de clasificación.....	15
1.1.3 Botánica y morfología.....	19
1.2. Plagas y enfermedades del cocotero.....	35
1.3. Usos e Importancia del cocotero	46
1.4. Problemática del cocotero a nivel mundial.....	49
1.5. La biotecnología y el cultivo de tejidos vegetales como herramientas para el mejoramiento genético de las plantas	49
1.5.1. La embriogénesis somática	52
1.6. Embriogénesis somática en cocotero	57
1.6.1. Estudios básicos en la embriogénesis somática en cocotero	68
Justificación.....	78
Objetivos	78
Objetivo general.....	78
Objetivos específicos	78
Estrategia experimental	78
CAPÍTULO II.....	81
Materiales y Métodos.....	81
2.1. Introducción.....	81
2.1. Material vegetal	85

2.2. Métodos	86
2.2.1. Establecimiento del cultivo de callos	86
2.2.2. Establecimiento de las suspensiones celulares.....	87
2.2.3. Medida del crecimiento de las SC	88
2.2.3.1. Pesos fresco y seco.....	88
2.2.3.2 Conductividad eléctrica y pH.....	88
2.3. Preparación de los medios de cultivo empleados.....	89
2.3.1. Medio I. Inducción de callo.....	89
CAPÍTULO III.....	91
Resultados	91
3.1. Introducción.....	91
3.2. Resultados	91
3.2.1. Obtención de las suspensiones celulares	94
3.2.2. Determinación del peso seco	100
3.2.3. Determinación de la conductividad eléctrica y del pH del medio de cultivo ...	102
CAPÍTULO IV	105
Discusión	105
CAPÍTULO V	109
Conclusiones.....	109
Perspectivas.....	109
ANEXOS.....	111
Bibliografía.....	114

Índice de figuras

Figura 1.1. <i>Cocos nucifera</i> L. De Franz Eugen-Köhler's Medizinal-Pftflanzen-List of Koehler. Images del dominio público.	3
Figura 1.2. Distribución potencial del cocotero (sin riego).	7
Figura 1.3. Historia del establecimiento de las plantaciones en México (Zizumbo et al., 1993).	11
Figura 1.4. Diferentes tipos de corona en el cocotero.	11
Figura 1.5. Diversidad de colores en los frutos del cocotero. Fotografía tomada de Niral et al., (2021).	12
Figura 1.6. Variabilidad intraespecífica del cocotero.	13
Figura 1.7. Comparación de cocoterros enanos y altos. Fotografía tomada de Foale et al., (2020).	14
Figura 1.8. Híbrido de cocotero de alto x enano. Fotografía tomada de Nampootheri et al., (2018).	14
Figura 1.9. Producción de raíces a partir de la base del tallo. Fotografía tomada de Jerard et al., (2021).	19
Figura 1.10. Cicatrices que dejan las hojas en el tallo.	22
Figura 1.11. Tronco de <i>Cocos nucifera</i>	24
Figura 1.12. Hoja pinnada de coco con folíolos.	25
Figura 1.13. Composición de las hojas pinadas.	26
Figura 1.14. Inflorescencias del cocotero.	32
Figura 1.15. Biología reproductiva de la palma de coco.	34
Figura 1.16. Síntomas de amarillamiento letal.	36
Figura 1.17. Mortalidad esperada debida al amarillamiento letal del cocotero en las áreas productoras de copra en México (Zizumbo et al., 1999).	38
Figura 1.18. Modelo para explicar los mecanismos de defensa del cocotero a la enfermedad de la marchitez de la raíz.	43
Figura 1.19. Número total de RGC aislados en la palma de coco por Puch-Hau et al. (2016; 2015).	44
Figura 1.20. Relación filogenética de las secuencias de NBS de <i>C. nucifera</i> , <i>P. dactylifera</i> y <i>E. guineensis</i>	44
Figura 1.21. Relación filogenética entre las RGC de diferentes especies de plantas.	45
Figura 1.22. Usos del cocotero.	46

Figura 1.23. Usos del cocotero II.....	47
Figura 1.24. Usos del cocotero III.....	48
Figura 1.25. Usos del cocotero IV.	48
Figura 1.26. Plantas obtenidas a través del cultivo de protoplastos.	51
Figura 1.27. Diferentes orígenes de los embriones vegetales.	53
Figura 1.28. Factores que afectan la embriogénesis somática.....	54
Figura 1.29. Gradientes de auxina y transportadores de auxina durante la embriogénesis cigótica.	55
Figura 1.30. Cultivo de tejido de inflorescencia de coco var. Enano Malayo. Primera parte.	58
Figura 1.31. Cultivo de tejido de inflorescencia de coco var. Enano Malayo. Segunda parte.	58
Figura 1.32. Planta regenerada a partir de cultivo de tejido de inflorescencia.	59
Figura 1.33. Embriogénesis somática del cocotero a partir de plúmula.....	60
Figura 1.34. Regeneración de plántulas de cocotero a partir de embriones somáticos. ..	61
Figura 1.35. Desarrollo morfológico de cultivos de plúmulas de coco durante la embriogénesis somática primaria (a-e) y secundaria (f-j).	62
Figura 1.36. Callos y embriones somáticos que presentaban desviación del desarrollo normal.	63
Figura 1.37. (lado izquierdo). Estadios de desarrollo durante la formación de callos embriogénicos a partir de explantes de estructuras embriogénicas.	65
Figura 1.38. (lado derecho). Desarrollo posgerminativo dentro de los dos meses de cultivo en medio (4) sin ionóforo.	65
Figura 1.39. Formación de embriones somáticos (ES) a los 15 y 30 días de cultivo en callos embriogénicos (CE) y en subdivisiones de callos embriogénicos (SCE).	66
Figura 1.40. Estructura embriogénica derivada de callo embriogénico usado como explante.....	68
Figura 1.41. Propagación clonal de la palma de coco a través de la embriogénesis somática.	69
Figura 1.42. Análisis histológico de diferentes estadios de la de la callogénesis.....	70
Figura 1.43. Análisis histológico de los diferentes estadios de la embriogénesis somática.	71
Figura 1.44. Análisis histológico de las anomalías observadas.	72

Figura 1.45. Aspectos morfológicos (a, d, g, j, m, p) e histológicos (otras figuras) de los embriones derivados de anteras de <i>Cocos nucifera</i>	73
Figura 1.46. Aspectos morfológicos (a, d, g, j, m, p) e histológicos (otras figuras) de los embriones derivados de anteras de <i>Cocos nucifera</i> . Segunda parte.	74
Figura 1.47. Localización de los transcritos de <i>CnCDKA</i> por hibridación <i>in situ</i> en callos embriogénicos.	75
Figura 1.48. Control por reguladores del crecimiento vegetal de la expresión génica durante la embriogénesis somática del cocotero.	77
Figura 1.49. Esquema general de iniciación y mantenimiento de una suspensión celular.	79
Figura 1.50. Esquema del procedimiento de iniciación y mantenimiento de cultivos en suspensión celular para <i>Cocos nucifera</i>	80
Figura 1.51. Estrategia para selección de medio de la suspensión celular.....	80
Figura 2.1. Esquema del procedimiento de iniciación y mantenimiento de cultivos en suspensión celular. Redibujado de Mustafa et al.(2011).	83
Figura 2.2. Crecimiento de cultivo en suspensión de <i>Coffea arabica</i> línea L2.....	84
Figura 3.1. Callos proporcionados por el laboratorio de los Drs. Carlos Oropeza y Luis Sáenz.	92
Figura 3.2. Diagrama que muestra el sistema empleado para la obtención de las SC. ...	92
Figura 3.3. Fotografía que muestra al medio semisólido Y3 como base y el medio líquido en la parte superior.....	93
Figura 3.4. Fotografía representativa de la integridad de los medios siete días después de haberse colocado en el orbitador.	94
Figura 3.5. Establecimiento de las suspensiones celulares de <i>C. nucifera</i>	94
Figura 3.6. Respuesta de los callos de <i>Cocos nucifera</i> en diferentes medios de cultivo vegetal.....	95
Figura 3.7. Fotografías con inoculo para suspensión celular de <i>Cocos nucifera</i>	96
Figura 3.8. Células de una suspensión celular de 30 días de <i>Cocos nucifera</i> en medio MMSE, a 95 rpm.....	97
Figura 3.9. Observación microscópica de suspensión celular de <i>Cocos nucifera</i> a los 324 días.....	98
Figura 3.10. Observación microscópica de agregados celulares en suspensión celular de <i>Cocos nucifera</i> a los 324 días.....	99

Figura 3.11. Observación del comportamiento del cultivo a los 7 días de ser cambiado el medio, de un cultivo que se mantuvo por 324 días.	99
Figura 3.12. Una célula de <i>Cocos nucifera</i> a los 7 días, después de un cultivo en mantenimiento por 324 días en medio MMSE.....	100
Figura 3.13. Ciclo de cultivo de suspensiones celulares de <i>C. nucifera</i>	102
Figura 3.14. Conductividad del medio de cultivo de células de cocotero en suspensión.	103
Figura 3.15. pH del medio de cultivo de células de cocotero en suspensión.	104
Figura 4.1. Muestras de suspensiones celulares de <i>Cocos nucifera</i> en las que se aprecia que no hay oxidación.	106

Índice de tablas

Cuadro 1.1. Lista de enfermedades reportadas para el cocotero (Iyer et al., 2018).	40
Cuadro 2.1. Medio de cultivo Y3 semi-sólido para <i>Cocos nucifera</i> L. (Eeuwens, 1976). .	86
Cuadro 2.2. Medio de cultivo líquido MMSE para SC de <i>Cocos nucifera</i> (Pateña et al., 2002).	89
Cuadro A.1. Cuadro A.1 Composición de los medios de cultivo utilizados para el establecimiento y proceso de inducción de la ES en SC en <i>Cocos nucifera</i>	111

Abreviaturas

2,4-D	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
BA	Benciladenina
CE	Conductividad eléctrica
ES	Embriogénesis somática
MM	Masa molecular
MMSE	Medio de inducción de mango
PF	Peso fresco
pH	Potencial de hidrógeno
PS	Peso seco
SC	Suspensiones celulares
VPC	Volumen del paquete celular

Resumen

El cocotero, es una especie de interés comercial, que ha adquirido mayor importancia en los últimos años, y ha presentado un aumento en la demanda de su materia prima. La técnica tradicional de propagación por semilla está limitada a condiciones específicas, tanto por su largo ciclo de crecimiento como por su distribución en zonas tropicales. El uso de sistemas de cultivo *in vitro* de tejidos vegetales, como la embriogénesis somática es una alternativa para la micropropagación masiva de plantas. El cultivo de tejidos vegetales en un sistema de suspensión celular (SC), es una herramienta poderosa para la realización de estudios fisiológicos, bioquímicos y moleculares, los cuales pueden estar relacionados con la embriogénesis somática, el proteoma extracelular y otros estudios. En este proyecto de investigación se estableció una línea de suspensión celular de *Cocos nucifera* L. a partir de callos semicompactos o friables que se mantuvieron en medio de cultivo con sales inorgánicas Y3, los cuales fueron probados en cuatro medios líquidos (Medio Y3, Medio Y3 + Adenina, Medio MS + BA, Medio MMSE) para el establecimiento de una SC. El crecimiento se caracterizó con base en el peso seco, el volumen del paquete celular, la conductividad eléctrica y el pH del medio cultivo. El cultivo de las suspensiones celulares de cocotero se evaluó en medio MMSE durante 56 días. De los cuales entre los días 30 y 56, se comenzó a observar muerte del cultivo, ya que los valores de la conductividad eléctrica pasaron de un valor de 6.2 mS a 6.8 mS infiriendo que las células de la SC están liberando su citoplasma al medio. Se utilizó un inóculo de 3.0 mg de peso seco, el cual tuvo un crecimiento al día 56 de 7.8 mg. La caracterización y establecimiento de la SC como parte de este trabajo servirán como fuente de material biológico para futuras investigaciones relacionadas a la embriogénesis somática.

Abstract

The coconut tree is a species of commercial interest, which has become more important in recent years and has increased the demand for its raw material. The traditional seed propagation technique is limited to specific conditions because of its long growth cycle and its distribution in tropical areas. The use of in vitro plant tissue culture systems, such as somatic embryogenesis, is an alternative for the massive micropropagation of plants. Plant tissue culture in a cell suspension system (SC) is a powerful tool for carrying out physiological, biochemical, and molecular studies, which may be related to somatic embryogenesis, extracellular proteome, and other studies. In this research project, a cell suspension line of *Cocos nucifera* L. was established from semi-compact or friable calli. The calli were kept in a culture medium with inorganic salts Y3 were tested in four liquid media (Medium Y3, Medium Y3 + Adenine, MS Medium + BA, MMSE Medium) to establish a SC. The growth was characterized based on the dry weight, the volume of the cell package, the electrical conductivity, and the pH of the culture medium. The culture of coconut cell suspensions was evaluated in MMSE medium for 56 days. Between days 30 and 56, culture death began to be seen, since the electrical conductivity values went from a value of 6.2 mS to 6.8 mS, inferring that the SC cells are releasing their cytoplasm into the medium. An inoculum of 3.0 mg of dry weight was used, which grew 7.8 mg on day 56. The characterization and establishment of the SC as part of this work will serve as a source of biological material for future research related to somatic embryogenesis.

Introducción

Durante décadas, diversos grupos de investigadores han puesto su atención en la palma del cocotero, ya sea por su importancia económica, o por el reto que conlleva obtener un medio de cultivo *in vitro*, que permita su micropropagación masiva. Se han utilizado diversas variedades de cocotero, algunas resistentes a patógenos como lo son los fitoplasma que causan el amarillamiento letal, o tolerancia a estrés abiótico y biótico. Así como híbridos o variedades que han demostrado ser útiles en la recuperación de cultivos de cocoteros, ya sea por su resistencia o porque dicha variedad presenta una característica en particular de interés socioeconómico, como por ejemplo la producción de un fruto con mayor producción de agua o una especie que tenga más producción de aceite. Es por ello que con la presente investigación se busca mejorar los protocolos ya existentes en cuanto a micropropagación masiva de cocotero, para reducir los costos y mejorar la producción de embriones somáticos, y, por ende, las plantas que son destinadas a los campos de producción.

Por otro lado, diversos investigadores han reportado una gama de experimentos que abarcan desde la adición de reguladores del crecimiento vegetal, subdivisión de callos e inmersión temporal, hasta la modificación de elementos básicos en su medio basal con la finalidad de mejorar la propagación *in vitro* de esta especie. La mayoría de las investigaciones se han realizado en medios semisólidos, por lo que en la presente investigación se busca establecer un medio de cultivo en suspensión celular, que nos permita un mejor control a la homogeneidad de la suspensión, y así mismo mejorar la absorción de los elementos externos, en este caso tratamientos a los que serán expuestas las células. Este sistema nos permitirá tener un mejor control en relación con el crecimiento y la caracterización del cultivo, dando la oportunidad de realizar, más adelante, estudios morfológicos, bioquímicos y moleculares que estén relacionados en la embriogénesis somática (ES).

CAPÍTULO I

Antecedentes

1. *Cocos nucifera* L.

Cocos nucifera (Figura 1.1), fue descrita por Carl Nilsson Linaeus (latinizado como Carlos Linneo) y publicado en *Species Plantarum* 2: 1188 en 1753. El cocotero es descrito como una palma perenne monoica, perteneciente al grupo inferior de plantas con flores (monocotiledóneas). En un comienzo, *C. nucifera*, estaba agrupado en el género *Cocos* que incluía más de 30 especies, distribuidos principalmente en América Central y del Sur. Se ubica en la familia *Arecaceae* (anteriormente *Palmaceae* y la subfamilia *Arecoideae* en la cual también se incluyen otras cuatro subfamilias de las *Arecaceae*) que incluye 600 especies agrupadas en 25 géneros (Dransfield et al., 2008)

Ciento sesenta y tres años después Becarri (1916) distinguió el género *Cocos* como monotípico, con *Cocos nucifera* como única especie y el resto de las especies que comprendían este género fueron clasificadas en otros nueve géneros. Más tarde, sobre la base de un examen anatómico detallado de estos géneros se justificó la clasificación sistemática de *Cocos*. La información taxonómica del cocotero se enumera a continuación de acuerdo con Niral et al., (2021).

Reino: Plantae

Subreino: Tracheobionta

Super división: Espermatofita

División: Magnoliophyta

Clase: Liliopsida

Subclase: Arecidae

Orden: Arecales

Familia: *Arecaceae*

Subfamilia: *Arecoideae*

Género: *Cocos*

Especie: *Cocos nucifera*



Figura 1.1. *Cocos nucifera* L. De Franz Eugen-Köhler's Medizinal-Pflanzen-List of Koehler. Images del dominio público.

1.1 Origen y distribución

Los factores relacionados para determinar el origen y distribución de la palma de coco ha sido descrito y publicado por Harries (1990; 1992; 1995) en una serie en la que recopila información sobre registros de esta palma. Describiendo así la importancia del coco a

través de los siglos, desde la domesticación, cuando los primeros asentamientos humanos costeros comenzaron a utilizar a esta especie en cultivos mientras lo domesticaban en estas áreas. A pesar de que los orígenes de la palma de coco son objeto de controversia por diversos grupos de científicos, éstos se agrupan en dos puntos de pensamiento divergentes en donde en el primero, la mayoría de las investigaciones indican que su origen se encuentra en el sur de Asia. Y un segundo grupo que afirma que su origen está situado en la costa oeste de América Central y en las islas adyacentes del Pacífico. Hasta el momento, podemos decir con certeza que el coco se considera una especie antigua con una o más historias a lo largo de su proceso de domesticación.

El nombre de Cocos, para coco y especies cercanas en otros idiomas europeos, se remonta a la palabra española coco que significa “espectro o monstruo”, con referencia a las tres marcas en las nueces (poros de germinación) que lo hacen tener un aspecto de cara misteriosa o tenebrosa por la forma tan peculiar del endocarpio de este fruto. Dando origen a diversos relatos, mitos, y leyendas, alrededor de la transmisión que se relacionaba con personajes, en la mayoría de los casos, con figuras con una fuerte connotación psicológica de terror por su aspecto maleficente relatado a los niños. El aspecto del coco se le da una interpretación libre según la cultura, país o persona que escucha o cuenta la historia.

Son diversos los posibles orígenes para esta leyenda, tomando en cuenta su etimología existente, en donde el vocablo ha sugerido una expresión que tiene un paralelo en distintas lenguas, donde la mayoría hacen referencia y descripción a la cabeza o su forma esférica. El nombre de la especie botánica nucifera es una formación neolatina que significa “nueces de rodamiento” (**nux** = nuez y **ferre** = traer/llevar/oso).

En la India, el coco se conoce como narikela en sánscrito, y la mayoría de los nombres de coco en idiomas índicos se basan en este, p. e., Hindi nariyal, urdu nariyal, marathi nara, Parsi nargil y en telugu Kobbarikaya/nalikeram. Además, el elemento en las lenguas índicas se asemeja a varios nombres austronesios de coco, p. e., Tagalog niyog nyiur malasio y niu hawaiano. El término polinesio y melanesio niu y el término filipino y guamaniano niyog se basan en la malabra malaya nyiur. Algunos de otros nombres vernáculos para el coco incluyen: tengu y kobbari en Kannada; nalikeram y thenga en malayo; tengai en tamail, kokosneut en afrikaans; coco en catalán, español; kokoyashi en

japonés; kelapa y nyoiur en indonesio/malayo; kelapa en portugués; pol en cingalés, cot dua en vietnamita y maprao en tailandés (Krishnajumar et al., 2019).

Durante décadas, ha habido un interés creciente en el origen y distribución de la palma de coco, el cual ha sido plasmado en grandes obras en cuanto a la creencia popular de seres fantásticos que han estado entrelazadas con el aspecto del fruto de esta palma como en la segunda parte del Ingenioso Hidalgo Don Quijote de la Mancha, de Miguel de Cervantes Saavedra en donde lo identifica como el espantapájaros y *el coco* en el epitafio que el bachiller Sansón Carrasco colocó en la sepultura de Don Quijote.

Tuvo a todo el mundo en poco,
fue el espantajo y el coco
del Mundo, en tal coyuntura,
que acreditó su ventura
morir cuerdo y vivir loco.

Hasta rimas con origen en el siglo XVII por Juan Caxés, en las que se hace referencia al coco. La rima ha evolucionado a lo largo de los años, pero aún conserva su significado original:

Duérmete niño, duérmete ya...
Que viene el coco y te comerá.

Brasil, que es uno de los principales países productores del coco, también tienen su versión de rima del coco, en la que en un principio la palabra Coca, refiriéndose al significado de “ir a la parte superior del techo”, en una canción portuguesa registrada por José Leite de Vasconcelos, refiriéndose así a lo que posteriormente se cambiaría el nombre de coca a la de “Papao negro” (comensal negro) el nombre que hace referencia al hombre del saco o boogymán, el cual es un monstruo que está conformado por lo que cada niño teme, al momento de ser relatada en sus hogares por las noches, cuando un niño no obedecía a sus padres.

Durante la colonización portuguesa y española de América Latina, la leyenda del Coco se extendió a países como México, Argentina y Chile. Llevando consigo la historia de este ser ficticio popular en la Península Ibérica, con la semejanza de la semilla del coco, el cual se parecía al “coco” o cocuy de su infancia. Además de estas obras e historias, se comenzaron a presentar diversos argumentos y evidencias con respecto al origen del cocotero.

El coco, está ampliamente distribuido en los trópicos costeros y se considera una especie semidomesticada. En ausencia de formas verdaderamente silvestres y parientes silvestres desconocidos, el origen de la palma de coco se ha postulado con base en relatos históricos y registros fósiles, que abarcan una vasta región que va desde el Océano Índico Norte, Malasia, Melanesia y Micronesia. Sin embargo, se cree que la domesticación del cultivo del cocotero ocurrió de manera independiente en las regiones del Océano Pacífico e Índico, con una diferenciación genética sustancial entre las poblaciones de cocoteros de estas dos regiones. Se ha observado una considerable diversidad intraespecífica y heterocigosidad en el coco y diversos investigadores han intentado una clasificación sistemática de la diversidad genética teniendo en cuenta la estatura de la palma, las características de la hoja/inflorescencia/fruto y también la polinización (Niral et al., 2021).

Un poco de historia.

El centro de origen del coco, se consideró en la costa oeste de América Central, por Martius en 1850. Algunos años atrás Candolle (1886) opinó que el origen del coco apuntaba al archipiélago Indio en la segunda edición del libro “El Origen de las Plantas Cultivadas”. Así mismo Beccari (1917) defendió el origen asiático del coco, junto con investigadores posteriores que sostenían dicho origen (Nayar, 2017).

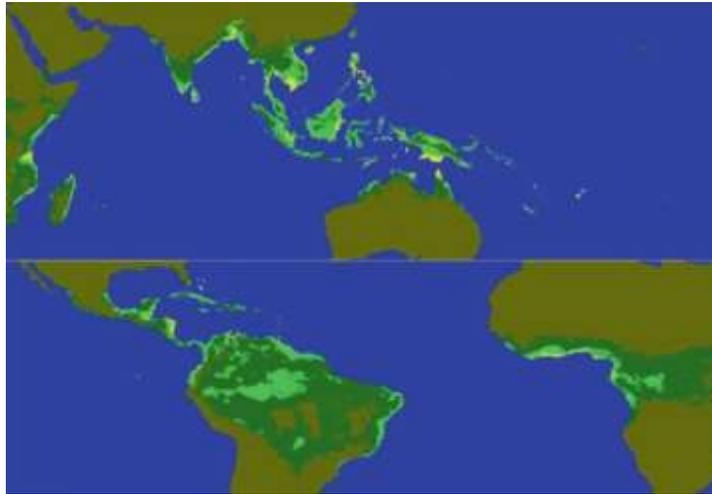


Figura 1.2. Distribución potencial del cocotero (sin riego).

Figura 1.2: Las áreas verde oscuro corresponden a condiciones marginales climáticas; las áreas de color verde claro a naranja corresponden a climas cada vez más favorables. Fuente: Estrategia COGENT (Coppens d'Eeckenbrugge et al., 2018). Figura tomada de Foale et al., (Foale et al., 2020)

En una revisión de literatura realizada por Chid (1974), se postuló el origen del coco en el Viejo Mundo y que no sería posible asignar un hábitat preciso en el Océano Pacífico como centro de origen. Esta propuesta también fue apoyada por Purseglove (1972).

Harries (1978) opinó que la especulación sobre el origen, sin una evidencia adicional, era inútil, considerando así la distribución generalizada de la palma y en opiniones divergentes que implicaban que esta distribución abarcaba una gran área desde África hasta América del Sur. Harries (1978) postuló que la evolución del coco había surgido a partir del Cocos primordial, designado como niu kafa. Y que de este se derivaba el coco cultivado (niu vai). También sugirió que el gran fruto del coco podría haberse originado de un progenitor fructífero de una característica más pequeña, al que incluso se le podía comparar con la pequeña palma monotípica *Nypa frutal*, *Nypa fruticans* Wurm y contrastarla con el coco grande (doble coco), *Locoicea maldivica* (Gimel) Pers.

Una vista hacia el pasado en el oeste de Gondwana, parece dar un origen para toda la tribu Coccoeae, dada la situación actual de su distribución. Por lo que se ha planteado la hipótesis de que la tribu probablemente se diferenciara poco antes de la ruptura de este supercontinente. Distribuyendo los miembros en diversas placas por las Américas, África, y Madagascar, donde aún sobreviven en la actualidad (Figura 1.2). Algunos de los

miembros se dispersaron hacia la actual placa de la India, en donde se extinguieron. Con la propiedad de flotar y permanecer durante mucho tiempo en navegación sobre el mar, el fruto del coco se independizó del movimiento de las placas tectónicas para su dispersión. Por lo que se postuló que el hogar ancestral del coco podrían haber sido las costas e islas del Mar de Tetis. Donde este tipo silvestre se pudo haber dispersado flotando entre islas que bordean las placas continentales. De las islas del Mar de Tetis, se pudieron dispersar flotando a otras islas en el Océano Índico y de allí al Océano Pacífico, pero no hacia el Atlántico Harries (1990; 1992; 1995).

Con forme la tecnología fue avanzando, las diferentes hipótesis fueron sometidas a prueba. Gunn (2004), basado en un análisis genético extenso, demostró que existe una diferenciación genética entre las poblaciones de coco de las regiones del océano Índico y del océano Pacífico. También determinó la ausencia de una mezcla genética sustancial entre las dos subpoblaciones genéticas principales, esto a pesar de la ausencia de barreras reproductivas conocidas y del extenso movimiento de los cocos a través de viajes realizados por el hombre entre estas cuencas oceánicas. Por ello concluyó que los orígenes del cultivo de coco en las cuencas del Océano Pacífico e Índico fueron independientes.

El origen y distribución del cocotero, se ha basado e hipotetizado a base de relatos históricos, estado actual de su difusión, distribución y algunos registros fósiles. Se han descubierto fósiles de coco en la India [frutas de 10 a 13 cm de largo en la meseta de Deccan (Srivastava y Srivastava, 2014; Prasad et al., 2013) y frutas de 3 a 16 cm de largo en la región centro oeste (Kaul, 1951)], Madagascar [fragmentos de cáscara de coco (Crowther et al., 2016)], Nueva Zelanda [frutas de tipo Cocos de 3 a 5 cm de largo (Endt y Hayward, 1997; Hayward et al., 1990)], Australia [frutas similares a Cocos de 10 a 13 cm de largo (Rigby, 1995)], Polinesia Francesa [Cocos enteros (Lepofsky et al., 1992)], Vanuatu (Fragmentos de endocarpio de coco)] y Colombia, Sudamérica [Cocos de 25 cm de largo como frutos con solo 4 mm de grosor (Gomez-Navarro et al., 2009)]. Nayar (2017) observó que, entre los fósiles de frutas similares a Cocos recuperados hasta el momento, algunos presentan las características morfológicas de los cocos actuales, así como su tamaño, así como algunos ejemplares encontrados especialmente en las islas Nicobar y Lakshadweep; Ambas islas se encuentran en la India, en donde estos fósiles han presentado dichas características similares, junto con ejemplares de Australia y Colombia (Jerard et al., 2017; Samsudeen et al., 2006; Balakrishnan y Nair, 1979), el este

de Filipinas y Nueva Guinea (Dwyer, 1938), mientras que algunos materiales de Nueva Zelanda y algunos de la India parecen ser de otros taxones relacionados con el coco. También se planteó la hipótesis de que el proceso de domesticación o ennoblecimiento del coco podría haber comenzado en las islas y regiones costeras que bordean el norte del Océano Índico (Mar Árabe y la Bahía de Bengala), Malasia y la región occidental del Océano Pacífico.

Nayar (2017) ha revisado detalladamente el origen y domesticación del coco en su libro "*The Coconut: Phylogeny, Origins, and Spread*". El autor concluye que "existe una falta general de acuerdo sobre cualquiera de los aspectos del origen del coco; y que la gran brecha en la información sobre la mayoría de los aspectos. Por lo tanto, se necesitará mucho trabajo experimental por hacer antes de que se pueda llegar a conclusiones más definitivas. También indica que una investigación sobre el origen de una planta de cultivo implica investigar cuatro aspectos: lugar de origen, tiempo de origen, especie/taxón ancestral y modo de diferenciación de la forma silvestre a la cultivada. En las últimas décadas se han realizado estudios filogenéticos que no respaldan el origen americano del coco, a pesar de que los miembros de la subtribu Attaleinae se distribuye predominantemente en América del Sur (Gunn et al., 2015; Baudouin et al., 2014).

A pesar de esclarecer el origen y distribución de *C. nucifera* a lo largo de los siglos, postulando hipótesis y reescribiendo la historia a través de las herramientas que han estado disponibles, desde registros fósiles hasta análisis genéticos, hemos de concluir que, si bien es cierto, el progenitor del coco actual aún no ha sido caracterizado y registrado debidamente, quizás el supuesto origen de la palma de coco se localiza en una vasta región que abarca, el archipiélago indio, el norte del Océano Índico, Filipinas en el sudeste asiático, Nueva Guinea y el Pacífico occidental, y que también abarca el norte del Océano Índico, Malasia, Melanesia y Micronesia. Algunos estudios filogenéticos han indicado una afinidad de Cocos, con la de Attaleina, *Syagrus* y *Parajubaea* (Meerow et al., 2015; Baker et al., 2009; Meerow et al., 2009). Sin embargo, los resultados no han sido consistentes, difiriendo entre los diversos estudios realizados (Meerow et al., 2015; Baker y Couvreur, 2013a; Baker y Couvreur, 2013b; Baker et al., 2009; Meerow et al., 2009; Gunn, 2004). Por otro lado, también Prebble y Dowe, (2008) postularon que el pariente más cercano del cocotero podría haberse extinguido, ya que gran parte de esta región estuvo sujeta a graves perturbaciones geológicas y climáticas en el pasado.

Independientemente de su origen, *C. nucifera* se ha extendido por un amplio territorio, la mayor parte situado en los trópicos, ayudado por tormentas y el flujo de las corrientes marinas llegó a conquistar otras islas y espacios costeros, en donde el ser humano al tener contacto con él lo fue utilizando para su beneficio, ya sea por sus propiedades nutricionales y refrescantes, o por su importancia en el aprovechamiento de su materia vegetal. Por lo tanto, esta especie es considerada semi-domesticada con evolución de asentamientos humanos locales, que tuvieron y siguen teniendo diversos grados de dependencia de la humanidad, como se menciona en el libro “The Coconut Palm (*Cocos nucifera* L.) - Research and Development Perspectives” (Krishnakumar et al., 2018).

Como se menciona en el párrafo anterior, la distribución a lo largo de la costa y el interior de casi todos los países tropicales, entre los trópicos de Cáncer y Capricornio, representa un importante componente en el ingreso económico de millones de familias que se dedican a su cultivo (Salum et al., 2020).

En México, se encuentra en regiones costeras del océano Pacífico, en los estados de Sinaloa, Nayarit, Jalisco, Colima, Michoacán, Guerrero, Oaxaca y Chiapas; Mientras que, del lado del Océano Atlántico, se le cultiva en los estados de Quintana Roo, Yucatán, Campeche, Tabasco y Veracruz (Figura 1.3) (Zizumbo et al., 1993).

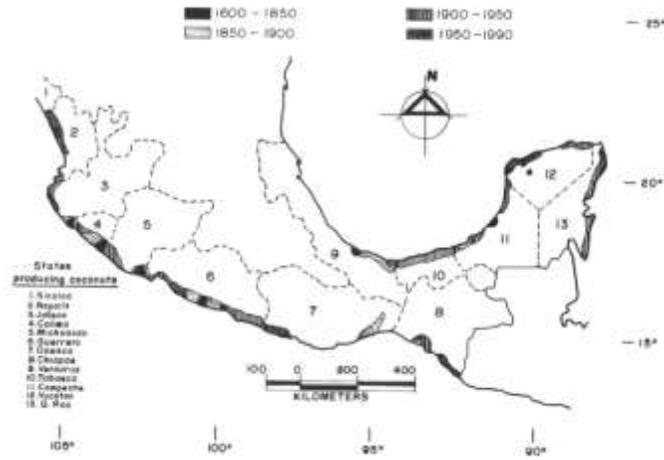


Figura 1.3. Historia del establecimiento de las plantaciones en México (Zizumbo



et al., 1993).

Figura 1.4. Diferentes tipos de corona en el cocotero.

Figura 1.4: A. Corona de un coco tipo alto del sur de Asia con fruto alargado. 1B. Corona de una palma de coco de tipo alto del sudeste de Asia y la región del Pacífico que tiene una fruta grande de forma esférica. 1C. Corona de un cocotero de tipo enano (amarillo) que tiene frutos más pequeños. Fotografías tomadas de Perera et al., (2020a)

1.1.1 Variedades de coco

La especie de palma de coco es una especie monotípica, sin parientes silvestres/domesticados conocidos y exhibe una variabilidad intraespecífica considerable, que difiere ampliamente entre sí en caracteres morfológicos como en la observación de una diversidad amplia en el tamaño del fruto, su forma y color. Además, presenta caracteres particulares en el hábito de las plantas.

El color de la fruta varía desde amarillo, tonos de verde hasta marrón a naranja (Figura 1.5). Las formas del fruto del coco se clasifican generalmente como redondas, y oblongas elípticas (Figura 1.6). Además, según la vista ecuatorial, la forma de los frutos de coco se puede clasificar como angulada, redonda o planta según sea la curvatura del fruto y la presencia de crestas en el fruto. Las variaciones se registran en la forma de la nuez dentro de la fruta, y éstas se clasifican en términos generales como redondas, ovales y oblongas.



Figura 1.5. Diversidad de colores en los frutos del cocotero. Fotografía tomada de Niral et al., (2021).



Figura 1.6. Variabilidad intraespecífica del cocotero.

Figura 1.6: Lada izquierdo islas Laccadive; lado derecho poblaciones silvestres de Areca y cocotero en las islas Andaman y Nicobar. Fotografía tomada de Nayar (2017).

En el hábito relativo de la planta y un grupo de características morfológicas, las palmas de coco se clasifican ampliamente en dos grupos: altos y enanos (Niral et al., 2021). Las palmas altas crecen hasta una altura aproximada de 20-30 metros, presentan un tallo robusto, comienzan a florecer entre los 5 y 7 años después de la siembra y continúan produciendo hasta la edad de 80 a 100 años (Figura 7). Las palmas altas son normalmente de polinización cruzada y, por lo tanto, altamente heterocigóticas. Los frutos son generalmente de tamaño mediano a grande y producen una cantidad mayor de copra de buena calidad con contenido de aceite bastante elevado.

Entre los cultivares indígenas de altura se encuentran; West Coast Tall, East Coast Tall, Benaullim Tall, Tiptur Tall, Andaman Ordinary Tall y Laccadive Ordinary Tall. Se cultivan predominantemente en diferentes áreas. Algunos cultivares altos exóticos populares en otros lugares son: Fiji Tall, Rennell Tall, Filipinas Ordinary Tall, Sri Lankan Tall, West African Tall, Panama Tall, Malayan Tall, Jamaican Tall y San Ramon Tall.



Figura 1.7. Comparación de cocoteros enanos y altos. Fotografía tomada de Foale et al., (2020).



Figura 1.8. Híbrido de cocotero de alto x enano. Fotografía tomada de Nampoothiri et al., (2018).

Las palmas enanas han ganado importancia comercial debido a su aporte temprano, baja estatura, cualidades de nuez tierna y resistencia a ciertas enfermedades. Son de estatura más baja, aproximadamente de 8 a 10 metros de altura cuando tienen 20 años, y comienzan a producir unos 3-4 años después de la siembra y tienen una corta vida productiva de aproximadamente 40-50 años (Figura 1.7). Las palmas enanas son más homocigóticas que las altas, debido a un alto grado de autopolinización. Producen nueces que generalmente son de tamaño pequeño a mediano. Se presume que los enanos se originaron de los altos, ya sea por mutación o por endogamia (Purseglove, 1972; Swaminathan y NAMBIAR, 1961). Los cultivares enanos populares que se cultivan en la India son Chowghat Green Dwarf, Chowghat Orange Dwarf, Kenthali Orange y Gangabondam Green Dwarf. Entre los cultivares enanos exóticos, Malayan Yellow Dwarf, Malayan Orange Dwarf y Malayan Green Dwarf se han vuelto populares en la mayoría de los países productores de coco del mundo. Además, la selección y la hibridación en la naturaleza dieron como resultado tipos intermedios.

Los tipos altos y enanos se han utilizado para el desarrollo de híbridos, combinando el rasgo de floración temprana de los enanos con la robustez y el carácter de alto rendimiento de los padres altos, explotando simultáneamente el vigor híbrido (Figura 1.8).

1.1.2 Variedades nativas y sistemas de clasificación

La referencia documentada más temprana que habla sobre las variedades nativas del cocotero fue la del Herbarium Amboinense de Rumphius (1741), que enumeró 13 variedades de cocotero de las Indias Holandesas. Posteriormente se han realizado números intentos para documentar las diferentes formas del cocotero. Miquel en 1855 enumeró 18 variedades con nombres y descripciones en latín, que fue utilizado por los trabajadores holandeses de aquella época, para referirse a las diferentes variedades de coco en Filipinas, junto con algunos nombres de variedades latinas. En la década de 1950, la FAO inició una encuesta basada en un cuestionario y documentó los diferentes tipos de coco en 18 países; 20 años después, en 1970, la FAO publicó una lista de descripciones de coco sobre la base de la información obtenida de 30 fuentes independientes (Harries, 1978).

Algunos investigadores, reconociendo la necesidad de categorización como esencial para una comprensión adecuada de las variaciones y formas del coco, intentaron la primera clasificación sistemática de las variedades de coco (Cuadro 1). Clasificaron las variedades de cocotero en dos grupos, a saber, altos y enanos como ya se mencionó previamente. Los altos se diferenciaron aún en tres variedades y nueve formas, mientras que los enanos se diferenciaron en dos variedades y dos formas. Estas variedades y formas se nombraron principalmente por los países de donde se obtuvieron originalmente o en donde se cultivan en gran medida o por un carácter distintivo particular (Narayama y John, 1949).

Este método de clasificación fue citado por Gangolly et al., (1957) en su revisión de la literatura sobre variedades de cocotero, que también formó base del capítulo sobre variedades. Sin embargo, al ser este sistema engorroso no se utilizó más para clasificar las variedades de cocotero. Por otro lado ya que no se incluyeron las variedades de las islas del Pacífico, África y América, esta clasificación no se consideró exhaustiva.

Adoptando la clasificación de Narayana y John (1949), basada principalmente en el tamaño y la apariencia del fruto, para clasificar las variedades de Sri Lanka, se redujeron las variedades de coco a tres, típicas, nana y aurantiaca, y no se incluyeron las variedades andrógena y spicata. La nueva variedad, aurantiaca, se consideraba semi alta, distinta de los grupos altos o enanos. Los formularios se correspondían con algunos de

los del sistema indio, pero tenían nombres diferentes (Liyanage, 1958; Gangolly et al., 1957).

La variedad típica tenía ocho formas, típica, kamandala, bodiri, navasi, thembili, gon thembili, pora pol y dikri pol; la variedad nana tenía tres formas; pumila, ebúrnea y regia; y aurantiaca tenía dos formas, King Coconut/rath thembili y navasi thembili. En Tailandia los cocoteros han sido clasificados en tres variedades en función de las características de la nuez y la edad de fructificación (Harries et al., 1982).

Por otro lado, también se han presentado sistemas de clasificación con base en las características de polinización. En este sistema se divide a las variedades en dos grupos. Por un lado, se encontraban las autógamas o autopolinizantes como en el caso de la mayoría de los enanos y alógamo o polinizador cruzado como en el caso de los altos. Sin embargo, esta clasificación también tiene limitaciones, ya que los enanos se polinizan fácilmente cuando están rodeados de altos, y los altos también son capaces de auto polinizarse (Whitehead, 1965). Además, este método de clasificación requiere probar el comportamiento de polinización de las formas locales en los diferentes países bajo condiciones controladas, lo que presenta muchas dificultades prácticas.

Para permitir la comparación de variedades independiente de su país de origen y las condiciones en que se desarrollan se presentó un método para la identificación práctica de variedades de coco abogando por el uso del análisis de componentes de frutas para caracterizar y clasificar variedades (Harries, 1978). Según Harries (Harries, 1978), los frutos de la palma son los sumideros fisiológicos, no solo los más interesantes sino también los más uniformes a pesar de la exposición de las palmas a las variaciones en condiciones de crecimiento. Además, razonó que, al considerar la relación entre los componentes de la fruta en lugar de los valores absolutos, se reducen los efectos del tamaño de la fruta y el número de frutas. Con base en estos supuestos, Harries (1978) recomendó un sistema de clasificación basado en contrastar la proporción de la cáscara en la fruta con el peso fresco de la fruta. Introdujo el concepto de identificación de variedades de coco basado en el método niu kafa-niu vai-introgresión. Según este investigador, el tipo niu kafa representa los cocos, que han evolucionado a través de la selección natural en islas deshabitadas y atolones de coral.

Estos cocos llevan el nombre de una variedad caracterizada por frutos largos, angulosos y de cáscara gruesa. Tiene la capacidad de germinación lenta, lo que facilita su

supervivencia en condiciones naturales. El tipo niu kafa, que tiene un gran fruto, es adecuado para la producción de copra y el procesamiento de fibra de coco y, por lo tanto, se ha introducido en las zonas del interior del cultivo comercial. Como resultado, se ha perdido la identidad de su hábitat natural distintivo.

El tipo niu vai, por otro lado, deriva su nombre de una variedad utilizada como fuente de agua dulce no contaminada. Según Harries (1979), la palma de coco fue utilizada por primera vez por los humanos como fuente de agua. Por lo tanto, esta presión de selección condujo a un aumento en el volumen del endospermo líquido en la fruta inmadura. Esto causó un cambio en los caracteres de la fruta, siendo estos esféricos con una cavidad interna más grande y una cáscara menos gruesa. La competencia por la luz y el espacio dio como resultado que estas nueces desarrollaran la capacidad de germinar rápidamente y producir plántulas vigorosas. Harries no incluyó variedades enanas en esta clasificación bajo los tipos niu vai y niu kafa, ya que evolucionaron mucho más tarde y solo pueden sobrevivir bajo cultivo.

Los dos tipos ancestrales mantienen sus características distintivas en el istmo centroamericano, donde estas poblaciones están geográficamente aisladas. Sin embargo, en Asia y el Pacífico, la intervención humana a través de la migración y el cultivo ha unido estas formas y la oportunidad resultante para la polinización cruzada ha permitido el desarrollo de formas intermedias a través de la introgresión. Esta hibridación introgresiva ha dado como resultado el desarrollo de diversos tipos cultivados disponibles en la actualidad.

También se han estudiado y clasificado algunas de las poblaciones actuales de coco en los tipos niu vai y niu kafa. Los cocos del Alto de África Occidental y los cocos a lo largo de la costa atlántica y caribeña de América, como Jamaica Tall, pertenece al tipo niu kafa, mientras que el Malayan Tall pertenece al tipo niu vai. Se considera que el Tahiti Tall era una población variante, como resultado de una mayor introgresión entre los tipos niu vai y niu kafa. Las poblaciones de coco en la mayoría de las islas en el Océano Pacífico son formas introgresiva similares a Tahiti Tall, pero suficientemente diferente para justificar nombres distintos. Dentro de estos tipos se observó que los tipos niu vai y niu kafa se presentan como variantes menores. Las técnicas como la electroforesis de las enzimas polimórficas muestran la relación entre las variedades y apoyan la teoría de la introgresión del tipo niu kafa-niu vai (Harries, 1981).

Sobre la base de la proporción de rasgos de los componentes del fruto, las variedades altas de coco se clasifican en cinco grupos, mientras que las variedades enanas se clasifican en tres grupos bajo cada uno de los grupos de colores, verde, amarillo y rojo/naranja. El grupo I correspondiente a nueces pequeñas con menos contenido de copra, el grupo II con frutos medianos a grandes con contenido de copra medio y el grupo III con frutos medianos a grandes y más contenido de copra. Esta clasificación no considera las enanas marrones y la enana Niu Leka, que tiene una fruta mucho más grande con un mayor contenido de copra y concha que muestra similitud con las palmas de la variedad alta y a diferencia de las enanas verdes, amarillas y naranjas/rojas normales (Karun y Niral, 2019; Thomas et al., 2018).

Por lo tanto, el método ampliamente utilizado para clasificar las variedades de cocotero se basa en su morfología y hábito de desarrollo. Las variedades de cocotero generalmente se clasifican como altas y enanas, con el prefijo del país de origen.

A pesar de la ausencia de parientes silvestres, la población actual de la palma de coco presenta una amplia gama de variabilidad conjuntada en dos grupos, altos y enanos, en función de algunos caracteres importantes como la altura y las características de crecimiento de la palma, naturaleza precoz en floración y caracteres de nuez y copra. Esta es la clasificación ampliamente aceptada y utilizada para distinguir los cultivares de cocotero. Los altos son los más comúnmente cultivados para la producción comercial en todas las regiones de cultivo de cocotero, mientras que los enanos se cultivan cada vez más por su valor estético, como padres para la producción de híbridos de alto rendimiento, así como para nueces tiernas.

Para concluir, el hábito de la planta, el color de la fruta y otras características de la fruta son actualmente los más convenientes para agrupar a las variedades. En la mayoría de los casos, estos rasgos están determinados genéticamente y no solo el efecto del medio ambiente. Sin embargo, es posible realizar más ajustes para un sistema de clasificación más infalible. Según los estudios de marcadores moleculares, las poblaciones actuales de cocotero se han clasificado en dos grupos principales: el grupo del Pacífico con cinco subgrupos (Sudeste de Asia, Melanesia, Micronesia, Polinesia y la costa del Pacífico de América Central y del Sur) y el grupo Indo-Atlántico. El grupo del Pacífico incluye el coco domesticado, mientras que el grupo del Indo-Atlántico incluye los tipos de coco niu kafa. Sin embargo, la intervención humana a través de la migración y el cultivo ha unido las

diferentes formas y la oportunidad resultante para la polinización cruzada ha permitido el desarrollo de formas intermedias a través de la introgresión. Actualmente, no existe un método único de clasificación que pueda explicar toda la variabilidad observada en las poblaciones mundiales de coco (Niral et al., 2021; Perera y Manimekalai, 2021; Karun y Niral, 2019; Niral y Jerard, 2018).

Además de la variación descrita anteriormente, se han reportado variaciones en la textura y calidad del endospermo de coco, variedades con agua aromática, nueces de cáscara gruesa, frutas de cáscara delgada, frutas de cáscara rosa, inflorescencia y hojas persistentes en diferentes poblaciones de coco natural. Además de estos caracteres se ha informado de una serie de anomalías en el tallo, las partes vegetativas, la inflorescencia y la forma del fruto de diferentes regiones de cultivo de coco. Estas anomalías, son fenómenos de la naturaleza y no variedades distintas, desde el punto de vista botánico (Nayar, 2017).

1.1.3 Botánica y morfología

La palma de coco es una planta monocotiledónea. El tallo único de la palma carece de corteza, cambium y características de crecimiento secundario, características de las gimnospermas y dicotiledóneas, y, por lo tanto, el tallo una vez formado nunca cambia de grosor, excepto por una ligera contracción cuando el tallo envejece. Del mismo modo, la raíz carece de una raíz principal, y las raíces una vez formadas nunca crecen en espesor (Nayar, 2017). La palma no está ramificada y no forma yemas vegetativas en el tallo. Las características de las diferentes partes de la palma se describen a continuación.



Figura 1.9. Producción de raíces a partir de la base del tallo. Fotografía tomada de Jerard et al., (2021).

1.1.3.1 Crecimiento y desarrollo de la raíz

Al ser una planta monocotiledónea, la palma de coco tiene un sistema radicular fibroso primario uniformemente grueso. Las raíces emergen desde la base del tallo y continúan produciéndose durante toda la vida de la palma (Figura 1.9). Las raicillas se producen a partir de estas raíces primarias, que se extiende en todas direcciones. En las raíces primarias también se encuentran algunos neumatóforos o raíces respiratorias. La longitud media de la raíz principal es de unos 6 m, tiene un espesor uniforme y unos 8 mm de diámetro. La raíz principal y las raíces que se ramifican a partir de ella son longevas, mientras que las raicillas terciarias y las ramas son de corta duración (Sudha et al., 2021).

Las raicillas se producen a partir de las raíces primarias, que se extiende en todas direcciones. En la raíz primaria de la palma conforme envejece, el número total de raíces primarias aumentan. El número de raíces también es influenciado por el genotipo, la salud de la palma, la fertilidad del suelo y las prácticas culturales. Una palma adulta tiene desde 2000 hasta 3000 raíces vivas principales, si bien se han documentado cocoteros con un mayor número de raíces al promedio, más de 7,000. El color de la raíz varía de blanco en el punto de crecimiento a oscuro marrón en la parte más vieja. Las raíces están desprovistas de pelos radiculares. El agua y los nutrientes son absorbidos por la zona blanca, que está a unos 2-5 cm detrás del meristemo de la raíz (Sudha et al., 2021).

Las raíces no tienen pelos radiculares. A partir de las raíces y raicillas principales, se desarrollan numerosos neumatóforos y sirven como órganos respiratorios, lo que facilita el intercambio gaseoso entre las raíces y la atmósfera. El meristemo radical de las raíces está protegido de lesiones por una capa. La punta de la raíz tiene una cubierta. Anatómicamente, no hay cambium en raíces. Su centro tiene una estela rodeada por una sola cubierta, el periciclo. De las raicillas y protuberancias aerenquimatosas (intercambio respiratorio) o surgen neumatóforos.

El hábito de la raíz en el coco varía según el tipo y la profundidad del suelo. Según sus funciones, las raíces se pueden clasificar de la siguiente manera: (i) verticales o las raíces de agua, (ii) las raíces horizontales, (iii) las raíces oblicuas o de apoyo, (iv) las raicillas o raíces secundarias y (v) los neumatóforos o raíces respiratorias.

Louis y Balasubramaniam (1983) investigaron el patrón de las raíces de 32 palmeras cultivadas bajo diferentes condiciones agronómicas. En una palma adulta produciendo

5,570 raíces, el 41.81% de las raíces se desarrollan horizontalmente en un ángulo de 90° en todas las direcciones y se encuentran a 30 cm por debajo de la superficie del suelo. Estas raíces, en condiciones óptimas, absorben 30-35 mL de agua por día y por lo tanto un promedio de 5,000 raíces absorberían ~150 L de agua. La tasa de crecimiento de la raíz es de 4.2 m por año, y está muy influenciada por el tipo y la humedad del suelo. Davis et al., (Davis et al., 1954) estudiaron el poder de absorción de agua de las raíces primarias y mostraron que los extremos cortados tenían mayor potencia que las puntas normales. El poder de absorción también varía con la longitud de la raíz. En general las raíces miden alrededor de 5-10 metros de longitud y 8 mm de diámetro. Sin embargo, ocasionalmente, también se han encontrado raíces más largas, de hasta 25 metros de longitud.

Los neumatóforos aparecen como proyecciones blancas a lo largo de la raíz. Ellos se caracterizan con una epidermis como capa externa, una hipodermis/exodermis justo debajo de la endodermis como capa interior. Las raicillas y los neumatóforos emergen del periciclo. Inmediatamente debajo del periciclo hay 30-55 grupos dispuestos radicalmente de pequeñas células divisorias llamadas hebras procambiales, que se diferencian en el xilema y el floema. Los vasos del xilema (son grandes) se alternan con los vasos del floema (son discretos). A menudo, dos vasos de xilema se unen para formar un vaso más grande, y una raíz madura puede contener alrededor de 25 vasos de metaxilema grandes. Las células compañeras de los haces vasculares, que inicialmente son de paredes delgadas, luego se convierten en vainas de haces esclerenquimatosos de paredes gruesas y contribuyen a la resistencia a la tracción de la estela. En el centro de la estela se encuentra la médula estrecha, que comprende células vivas, que posteriormente se desintegran a medida que la raíz envejece. Entre dos filas de floema y xilema, hay un estrecho rayo de células, que conecta el tejido interno del suelo que bordea el hueco central con el periciclo (Foale et al., 2020; Niral y Jerard, 2018).

El mesodermo que encierra la cámara de aire consta de tejido parenquimatoso grande y células sueltas. El núcleo interno de la raíz se forma por celdas vacías o llenas de taninos. El núcleo interior de las células de la corteza ayuda a las raíces a ponerse en contacto con la atmósfera exterior durante el estancamiento del agua. Las raíces poseen varios xilemas, vasos del floema ubicados en la periferia del estilo. Se ha reportado que cada raíz posee 20 o más haces de xilema y floema (Jerard et al., 2021).



Figura 1.10. Cicatrices que dejan las hojas en el tallo.

Figura 1.10: Fotografía de la izquierda tomada de Sudha et al., (2021).
Fotografía de la derecha tomada de Jerard et al., (Jerard et al., 2021).

1.1.3.2 Tallo

La palma de coco tiene un solo tallo recto, de color grisáceo, coronado por una corona de hojas. Tiene un brote terminal único, también llamado “repollo”, cuya muerte resulta en la muerte de la palma. El tallo está marcado por las cicatrices de las hojas (Figura 1.10). El grosor del tallo está determinado por su vigor y las condiciones del suelo, además de las diferencias varietales. En ciertas variedades, la base del tallo denominada bole está hinchada. El tallo de la palma de coco se hace visible una vez que el tronco alcanza la etapa completa de su desarrollo. En condiciones favorables, el tronco de una palma joven se forma en 3 a 4 años. En los años iniciales, el tallo gradualmente se vuelve grueso, y una vez que se alcanza el tamaño máximo, no hay muchos cambios en la circunferencia del tallo con la edad. En la variedad alta, la base del tronco (tronco) tiene hasta 0.8 metros de diámetro, disminuyendo rápidamente a aproximadamente 0.4 metros (Child, 1974). Sin embargo, el tallo se vuelve más delgado a medida que la palma envejece, así como en condiciones de crecimiento desfavorables.

La longitud del tallo está determinada por la edad de la palma, variedad y condiciones ecológicas. Las variedades enanas tienen troncos más cortos que las variedades altas. Las palmeras bajo prácticas de manejo desfavorables, incluyendo la siembra con sombra excesiva y la siembra muy cercana, exhiben un alargamiento rápido del tallo. El crecimiento del tallo es más rápido en sus primeras etapas, con un incremento de altura anual de hasta 1.5 metros. El crecimiento incremental se reduce y el tallo se reduce a lo largo de los años y se nivela a medida que las palmas envejecen, con un alargamiento anual del tallo de aproximadamente 10-15 cm desde el año 40. En raras ocasiones, se

observan palmas con ramificaciones, debido al daño en la yema terminal, y se han reportado hasta 5 ramas (Davis, 1969). El tallo, que es predominantemente fibroso, combina rigidez con flexibilidad adecuada y es lo suficientemente resistente como para soportar una tensión lateral considerable, particularmente cuando está expuesto a fuertes vientos, debido a la presencia de numerosos haces vasculares (hasta 18,000 en una palma madura).

El tallo se deriva del brote terminal, que tiene un tamaño de aproximadamente 0.5 mm x 0.5 mm, visible como una pequeña protuberancia en el ápice del tronco y bien protegido por las hojas en varios estadios de desarrollo. El punto de crecimiento se compone de una masa de células diminutas con citoplasma denso y grandes núcleos multinucleolados (de cuatro a diez nucleolados). Esta región tiene tres o cuatro capas y tiene actividad meristemática. Inmediatamente debajo de esta región, en el tallo interno, las células son grandes y contienen numerosas hebras procambiales junto con grandes gránulos de almidón y reservas de azúcar. Estos hilos procambiales luego se diferencian en paquetes de xilema y floema. Los haces derivados de los hilos procambiales son cerrados y se encuentran dispersos por todo el tallo. Los primeros paquetes formados son comparativamente de corta duración, pero más grandes que los formados posteriormente a partir del meristemo terrestre. Los primeros vasos de protoxilema formados son más pequeños que el metaxilema formado posteriormente. En un tallo joven, se observan de tres a nueve vasos de xilema, y estos forman un tejido en forma de V, con la base hacia el centro del vástago.

Se ven pequeños grupos de vasos de xilema fuera o por encima del xilema, y ambos están encerrados dentro de una capa de células de paredes delgadas que posteriormente se separan con la edad y forman la vaina fibrosa. Sin embargo, algunas células en ciertos parches de la vaina fibrosa, así como el parénquima cerca del xilema y el floema, no se engrosan ni siquiera en tallos viejos. Esto se limita principalmente al ápice del paquete como un tejido redondo amplio, y la base del paquete prácticamente no tiene fibras. El tejido del xilema, en forma de V cuando es joven, cambia de forma con la edad. El xilema se puede encontrar en dos o tres grupos. Sin embargo, los paquetes grandes con muchos vasos de xilema son raros. El tejido de paquete más común en el tallo antiguo es el que tiene un solo vaso de xilema grande, un pequeño tejido de floema arriba y un tejido fibroso ancho que se encuentra en la parte más externa del paquete. Los haces vasculares hacia el centro están más espaciados que hacia la periferia. El número de haces vasculares e la

periferia también es pequeño o insignificante, en cambio, un gran número de pequeños grupos de fibras. Derivados del suelo se observan meristemos. Entre la parte central del tallo y la periferia, los haces vasculares están estrechamente empaquetados con pocas capas de células intervinientes. Ocasionalmente, el parénquima separador está ausente y, por lo tanto, dos paquetes se unen en un paquete doble. El tamaño de los haces vasculares aumenta considerablemente con la edad de la palma. El xilema y el floema están encerrados por células que inicialmente tienen paredes delgadas, pero posteriormente engruesan y forman la vaina fibrosa.



Figura 1.11. Tronco de *Cocos nucifera*.

Fotografía por Salil Kumar Mukherjee, Calcuta, India. Fotografía del dominio público.

La corteza se compone de varias capas de parénquima de pared delgada y una sola capa de epidermis con una pared externa más gruesa (Figura 1.11). En el parénquima, se producen células de tanino y conductos de aire, principalmente hacia la periferia. Tanto el tallo como la raíz carecen de la peridermia o del tejido de corcho que se observa en la mayoría de las plantas. Sin embargo, la periferia del tallo contiene un tipo peculiar de células de corcho, llamado ritidoma.

No hay engrosamiento secundario del tallo en las palmas de coco ya que carecen de corteza y cambium (el tejido vivo y en crecimiento entre la corteza y la madera). Sin embargo, el tallo de una plántula es delgado, mientras que el de una palma adulta es robusto. El tallo más grueso a medida que la plántula envejece es el resultado de una mayor actividad meristemática del punto de crecimiento que resulta en la formación de

más y más células y haces vasculares, formando así el tronco, que aparece como un cono invertido. Una vez que se forma el tronco, comienza a aparecer el tallo de la circunferencia casi uniforme (Nayar, 2017).

1.1.3.3 Hojas

Las primeras hojas de una plántula de coco en crecimiento tienen las pinas fusionadas y aparecen como hojas enteras. Después de haber formado entre seis y ocho hojas, las hojas posteriores tienden a dividirse en foliosos. Alrededor de 3 a 4 años, como monocotiledónea el tallo es el único punto de crecimiento terminal, desde donde se desarrollan las nuevas hojas.

La palma de coco adulta lleva una corona de hojas en el ápice, que comprende hojas abiertas y las que rodean la yema en varias etapas de desarrollo. El número de hojas en la corona varía con la variedad y con las condiciones edafológicas y medio ambientales, así como las condiciones de su cultivo. En general, la corona de una planta adulta lleva, además de las hojas abiertas, un número similar de primordios foliares, en diferentes etapas de la diferenciación. Estas hojas pertenecen a cuatro conjuntos distintos. El primer conjunto se compone de las 10-13 hojas más antiguas, de las axilas de las cuales se han cosechado racimos de frutas. El siguiente conjunto se compone de las siguientes 10-14 hojas más viejas, que sostienen racimos de frutas en diferentes etapas de desarrollo. El tercer conjunto incluye las 10-12 hojas abiertas más jóvenes, con espádices en diversas etapas de desarrollo en sus axilas. El último conjunto comprende las hojas en el repollo con las más externas en diferentes etapas de despliegue y los restantes que aún no han surgido.



Figura 1.12. Hoja pinnada de coco con folíolos.

Fotografía tomada de Sudha et al., (2021).

Las hojas son largas y varían de 3 a 6 metros de longitud según la variedad, edad de la palma, fertilidad del suelo y vigor de la palma. La hoja individual consta de un pecíolo fuerte, que se extiende para formar un raquis con numerosos folíolos (150-250) insertados en él (Figura 1.12). Los folíolos a ambos lados del raquis no están exactamente emparejados, la mitad tiene alrededor de dos a diez folíolos más que el otro lado. Los folíolos son también largos (60-150 cm), estrechos, lineales, afilados y lanceolados. Las hojas, cuando son jóvenes retienen las estípulas en sus bases, formando un tejido fibroso que más o menos rodea todo el tallo. A medida que la hoja envejece, las estípulas se secan y se caen. En las palmas jóvenes, las estípulas persisten hasta que la hoja muere.

La progresión del crecimiento de la hoja que va desde el diminuto brote hasta la hoja adulta toma varios años. En promedio, el tiempo transcurrido desde el inicio hasta la abscisión final de la hoja, es de aproximadamente 5 años. Diversos investigadores han explicado las etapas del desarrollo de la hoja (Sudha et al., 2021; Padmanabhan, 1963), formación de folíolo (Venkatanarayana, 1957) y secuencia de eventos involucrados en la diferenciación de los primordios foliares en las hojas adultas (Periasamy, 1965). El primordio de la hoja se diferencia casi 28-32 meses antes de su salida de la vaina de la hoja. En condiciones favorables, las hojas portadoras de buenas palmas permanecen en la corona durante 3-3.5 años después de su emergencia.



Figura 1.13. Composición de las hojas pinadas.

Fotografía tomada del catálogo virtual de flora del Valle de Aburrá por la Universidad EIA. Fotografía del dominio público.

En general, la vida útil de las hojas es menor en las portadoras pobres que en las portadoras medianas y pesadas (Sudha et al., 2021). Además, la temporada y las condiciones del suelo afectan la caída de las hojas. Se ha observado que los cocoteros que rinden más fruto tienen un mayor número de hojas en la corona, lo que indica su longevidad, así como la tolerancia a la sequía de la palma (Sudha et al., 2021). En regiones en donde las estaciones son más marcadas, hay una considerable variación cíclica en la tasa de apertura de las hojas que parece ser más dependiente de la temperatura en lugar de la lluvia. En general, las plántulas de un año contienen de siete a nueve hojas, con la mayoría de las plántulas con ocho hojas. El número de hojas en la corona aumenta a 30-35 durante la madurez, y una palma adulta en promedio lleva alrededor de 30 hojas (Figura 1.13).

La longitud de la hoja varía desde 4 metros en cocoteros enanos hasta 7 metros en cocoteros altos, dependiendo de la variedad, estado de crecimiento y edad de la palma. El pecíolo representa aproximadamente un cuarto de la longitud total de la hoja, pero varía con la variedad. El pecíolo continúa como el nervio central de la hoja. Un pecíolo corto y robusto puede resistir mejor la presión verticalmente ejercida por el grupo en desarrollo en su axila. Los folíolos se llevan en cualquier lado de la nervadura central y tienen longitud diferencial en función de su posición en la hoja. Los primeros folíolos en la base son cortos, seguidos de un aumento gradual en la longitud de los folíolos posteriores con la longitud máxima alcanzada a aproximadamente un tercio del nervio central, seguido de una disminución gradual de la longitud hacia la parte superior de la hoja. Los folíolos más pequeños en la punta tienen aproximadamente 25 cm de largo, mientras que los folíolos más grandes miden aproximadamente 80-120 cm. El número de folíolos en una hoja de palma madura varía de 200 a 250.

Las hojas en una palma de coco están dispuestas de tal manera que garantizan la máxima disponibilidad de luz que tiene cada hoja. Están dispuestas en 5 espirales, ya sea en sentido horario o en sentido antihorario, y la espiralidad en una palma puede ser diestra (los racimos cuelgan hacia la derecha del pecíolo) o izquierda, pero sigue siendo el mismo a lo largo de la vida de la palma. Basado en la filotaxia, la sexta hoja se posiciona sobre la primera hoja, la undécima hoja sobre la sexta, y así sucesivamente.

Los dos tipos de espirales son distribuidos casi por igual en una población, con una ligera preponderancia de la espiral a la izquierda (Louis y Balasubramanium, 1983; Chidambaram y Henry, 1976; Davis, 1962).

Se ha visto que el número de hojas en el meristemo sin abrir es de 1 a 1.5 veces las hojas abiertas en la corona de la palma (Sudha et al., 2021). La diferenciación del primordio foliar ocurre entre los 28-32 meses antes de la salida de la vaina de la hoja como una pequeña protuberancia indistinta en el lado del punto de crecimiento. Dentro de un mes, se somete a divisiones celulares periclinales y anticlinales repetidas y se convierte en una estructura conformada de siete a diez capas celulares en forma de dedo que contiene tres capas que forman el meristemo primario, a saber, el dermatógeno externo, el periblema de tres capas de células medias y la capa más interna del pleroma. En el siguiente mes, la creciente protuberancia forma un cono hueco que encierra la siguiente hoja más joven y el punto de crecimiento. En esta etapa, cuando se inicia el procambio, posteriormente se forman los haces vasculares que aparecen en el pleroma. La hoja en desarrollo inicialmente contiene solo la porción del pecíolo, y la diferenciación de los folíolos ocurre ocho meses después, aproximadamente en la séptima hoja rudimentaria desde el punto de crecimiento. Venkatanarayana (1957) observó la formación de una masa rectangular de células de 18 capas que se desarrolla en los folíolos, seguida de una división longitudinal posterior en medio de este tejido, formando los lados de los folíolos. La epidermis de los folíolos, ambos superiores e inferiores, se deriva solo del tejido del pleroma y no del dermatógeno. El inicio de las replicaciones y la separación de los folíolos en las hojas de palma tiene como base las tensiones de crecimiento vertical y transversal (en la expansión y alargamiento de las caras laterales del raquis) que actúan en la base de la lámina no duplicada que lleva líneas alternas de partes más débiles entre filas paralelas de hebras provasculares cuyas células se alargan en ángulo recto a las fuerzas de tensión vertical y se resisten a ellas (Padmanabhan, 1984).

Las hebras procambiales de las valvas se forman después de los vasos de xilema. Del primero se forman haces vasculares del pecíolo y el raquis principal se engrosa. Dentro del prospecto, se forman primero las hebras procambiales, a partir de la nervadura central, seguidas de los de los lados dos meses después. Esto es seguido por la formación de las venas cruzadas. En un folíolo maduro, hay una fuerte nervadura central desde la cual se inclinan dos lados del prospecto. La epidermis se observa a ambos lados con una capa externa de cutícula gruesa. La epidermis está conformada por dos capas de

hipodermis que sirve como tejido de almacenamiento de agua, mientras que debajo de la epidermis inferior hay una sola capa de hipodermo. Debajo de la parte superior del hipodermo, y que se extiende casi al hipodermo inferior, está el tejido de la empalizada ancha compuesto por células de paredes delgadas, alargadas y muy compactas. Debajo de la empalizada, el tejido es un parénquima esponjoso escaso. Los cloroplastos se forman en el mesófilo, justo antes de la aparición de la hoja. Cada foliolo contiene alrededor de 20-25 haces vasculares que recorren toda su longitud y ocupan todo el grosor del prospecto de la hipodermis superior a inferior. De estos, cinco a seis paquetes son grandes mientras que el resto son estrechos. Entre dos grandes haces vasculares y justo por encima del hipodermo inferior hay tres pequeños haces vasculares formados por unas pocas traqueidas, tres a cuatro elementos del floema y un pequeño grupo de fibras. La parte superior del pecíolo contiene hasta 500-1,000 haces vasculares diminutos que se alternan con un pequeño grupo de fibras, que proporcionan resistencia mecánica adicional a la hoja. La epidermis superior está altamente cutinizada. En la epidermis inferior hay numerosas escamas multicelulares de color oscuro a marrones de tallos cortos, que contienen tanino en los tricomas y se presentan a intervalos regulares en pequeñas depresiones. Además, se ven haces de cristales de rafidios por todas partes.

En la epidermis inferior los estomas se forman por primera vez aproximadamente un año después de la aparición de la hoja e inicialmente están confinados al margen de los folíolos lejos de la nervadura central, mientras que la mayoría de los estomas se forman solo unos 3 meses antes de la aparición de la hoja. Los estomas están confinados a la superficie inferior de los folíolos y se distribuyen a lo largo de su longitud de dos a cuatro filas longitudinales entre cada dos haces vasculares/de fibra. Los estomas son elípticos con dos células guarda que contienen grandes granos de almidón y una pequeña abertura. Las células guarda están bordeadas por células subsidiarias, y una pequeña célula cuadrada en cada extremo del estoma que se une a estas células subsidiarias. Los estomas son bastante grandes, con una dimensión de $38 \mu \times 19 \mu$, que se extiende hasta $38 \mu \times 40 \mu$ junto con las células subsidiarias. Normalmente, un foliolo contiene alrededor de 170-220 estomas mm^2 . Sin embargo, la densidad estomática es un carácter varietal.

Las variedades enanas, en general tiene una mayor densidad estomática que las variedades altas (Sudha et al., 2021). Los estomas maduros son tetracíticos, con ambos polos y las células subsidiarias laterales cortadas por las células protodérmicas vecinas. Cada célula subsidiaria lateral es el resultado de una división longitudinal de una célula

trapezoidal formada por dos divisiones oblicuas de una célula protodérmica. La ontogenia de los estomas se ajusta al tipo periginoso con división oblicua no intersectante (Ghose, 1979).

La nervadura central del prospecto es una estructura muy fuerte con un anillo central de siete a ocho haces vasculares encerrados dentro de una vaina fibrosa formada por dos o tres filas de células engrosadas. La epidermis externa está altamente cuticularizada y es continua con el de los lados de los folíolos. Entre la epidermis y la vaina fibrosa, hay dos capas de hipodermo (continua con la hipoderma superior de los lados del folíolo) seguido de dos a tres capas de parénquima. El apego de cada mitad del prospecto a la nervadura central es estrecho, pero el lugar de fijación está reforzado por un grupo de fibras. También hay un tejido motor especial que bordea la epidermis interna que es continua con la epidermis inferior del prospecto. Detrás del tejido motor hay un haz vascular y un parche de esclerénquima. En folíolos jóvenes, este tejido motor no es funcional y se compone de muchas más células pequeñas alargadas comprimidas, de pared delgada. Para cuando los folíolos están a punto de abrirse, el tejido motor se desarrolla considerablemente y consta de dos filas de células grandes. Estas células absorben el agua suministrada por el haz vascular detrás de él y se vuelven turgentes, haciendo que se ejerza un empuje lateral a lo largo de los lados del folíolo, que se separa de su posición oprimida en el brote y permanecen en ángulo. El haz de fibras en la base de la unión de los lados actúa como un pivote sobre el cual se dan los movimientos laterales. Sin embargo, como los pliegues epidérmicos están muy cutinizados los movimientos repentinos son muy marcados. Los márgenes exteriores de los lados de los folíolos están doblados como un gancho; una orilla está doblada en la epidermis superior y la otra en la parte inferior para que ambas orillas apunten en la misma dirección. En la curva del pliegue, la epidermis se encuentra formando pliegues cortos, e inmediatamente detrás del pliegue hay un tejido motor similar al de la base de los lados de los folíolos. Las células en el tejido motor son inicialmente estrechas, alargadas y están muy comprimidas, pero se desarrollan en el tiempo de despliegue del tejido. Cuando las células se vuelven grandes y turgentes, ejercen una presión hacia afuera, y como resultado, el pliegue se endereza y los márgenes entrelazados se liberan, lo que ayuda al desarrollo de los folíolos. Este tejido motor en el margen de los folíolos persiste en algunas de las hojas más viejas, mientras que en otras se pierde y los pliegues epidérmicos se enderezan y, por lo tanto, el margen se vuelve una estructura truncada en lugar de doblada. Además de estos dos

tejidos motores, otros dos tejidos motores se ven en la base del prospecto. De estos dos, uno está ubicado en el ángulo formado por la mitad interna o superior del prospecto en el raquis principal y ayuda a que se extienda el folíolo en su conjunto, mientras que el otro se encuentra en el lado interno de la mitad externa del folíolo en el lugar de fijación en el raquis principal y ayuda a mantener la mitad exterior del prospecto en posición. Por lo tanto, hay cuatro tejidos motores diferentes en el folíolo: uno que recorre todo el nervio central, uno en los márgenes y dos en la base.

La vaina del pecíolo se ve por primera vez como un ala blanda a cada lado del pecíolo, aproximadamente un año después de que la hoja se diferencia. La vaina joven está formada por una masa de parénquima que forma el tejido del suelo en el que se encuentran dispersos algunas hebras procambiales a medida que madura, estos filamentos se convierten en haces vasculares de considerable tamaño y longitud con una amplia masa de esclerénquima, como los del tallo. Además de los haces vasculares, se producen grupos aislados de fibras en toda la vaina, especialmente hacia la periferia. Una corteza estrecha también es visible en la vaina joven. La vaina vieja consiste en fibras estrechamente tejidas y haces vasculares con una masa de esclerénquima y sin gran parte del parénquima terrestre de paredes delgadas. La importancia del tejido mecánico de la vaina del pecíolo es evidente, ya que en una etapa temprana rodea al tallo y soporta en parte el peso de la hoja en desarrollo; a medida que se desarrolla el pecíolo de las otras hojas jóvenes encerradas en la vaina gradualmente se rompe. El grosor de la vaina de la hoja, la fibra de la trama y los hilos de urdimbre tienen relevancia a la adaptación, afinidad geográfica, sistema de polinización y formas taxonómicas (Arunachalam et al., 2005).

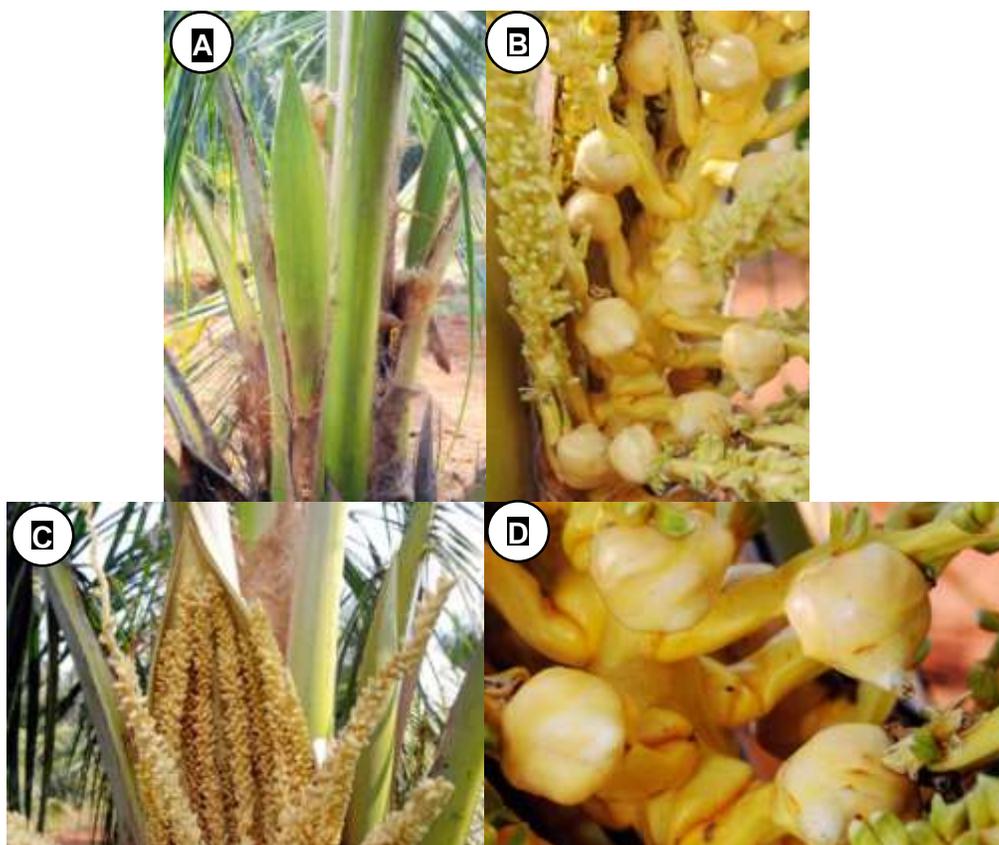


Figura 1.14. Inflorescencias del cocotero.

Figura 1.14: A. Una inflorescencia sin abrir. B. Espiguillas con flores masculinas y femeninas. C. Flores masculinas. D. Flores femeninas. Fotografías tomadas de Sudha et al., (2021).

1.1.3.4 Inflorescencia

La palma de coco es monoica con flores masculinas y flores femeninas que nacen en la misma inflorescencia (Figura 1.14). La inflorescencia emerge de las axilas de las hojas. En las palmeras, en condiciones favorables de crecimiento, se produce una inflorescencia cada mes desde las axilas foliares sucesivas. La edad en la floración inicial varía con la variedad, así como las condiciones de crecimiento, el rango puede ser de 3 a 7 años después de sembradas las plantas en el campo. La variedad enana comienza a florecer antes que las variedades altas. La inflorescencia, conocida como “espádice”, es inicialmente visible como un plano oblongo, una estructura encerrada por una vaina doble llamada espata y cuando está completamente madura se vuelve más cilíndrica. Debido a la presión ejercida por la creciente inflorescencia, la ruptura de la espata a lo largo de un surco longitudinal, expone la inflorescencia. La longitud de la inflorescencia varía de 60 a 200 cm y tiene aproximadamente de 8,000-10,000 flores masculinas y 0-400 flores femeninas, dependiendo de la variedad, condiciones del cultivo, estación y edad de porte (Sudha et al., 2021; Niral et al., 2008). El eje central de la inflorescencia, conocido como

raquis (pedúnculo), sostiene alrededor de 30-35 ramas, las espiguillas. Las espiguillas llevan numerosas flores masculinas, con pocas flores femeninas (generalmente 1 a 2, a veces ninguna y ocasionalmente hasta 5) nacidas cerca de la base de las espiguillas (Figura 1.15). Ocasionalmente algunas flores hermafroditas se ven junto a las flores femeninas en algunos cultivos. Todas las flores son sésiles/subsésil.

El primordio de la flor se forma aproximadamente cuatro meses después del inicio del primordio de la hoja y unos 32 meses antes de la apertura de la espata. Las flores masculinas y femeninas se diferencian unos 12 meses antes de la apertura del espádice emergido de la planta. En general, las flores masculinas comienzan a formarse un mes después de las femeninas y maduran un mes antes de que el estigma sea receptivo. El ovario se diferencia 6-7 meses antes de la apertura de la espata. Alrededor del 75% del crecimiento total en la duración de la inflorescencia ocurre durante el período de aproximadamente seis meses antes de la apertura de la espata. Poco después de la apertura del espádice, las flores masculinas completan su ciclo de vida, mientras que las flores femeninas tienen una duración más larga. Es necesario otros doce meses para que las nueces maduren por completo.



Figura 1.15. Biología reproductiva de la palma de coco.

Figura 1.15: (1) Espiguillas de una enana roja de Tahití desde la apertura de la inflorescencia hasta los 3 meses de edad. (2) Inflorescencia de coco. (3 y 4) Flores femeninas receptoras con gotas de néctar polinizadas. Imagen tomada de Bourdeix et al., (2020a).

Sudha et al. (2021) estudiaron el desarrollo de la inflorescencia. La inflorescencia surge en cada axila de la hoja. El primordio de la inflorescencia se forma casi al mismo tiempo que el brote de la hoja, y por lo tanto las inflorescencias están presentes en las axilas de las hojas rudimentarias jóvenes cerca del punto de crecimiento. El primordio de inflorescencia es una protuberancia en forma de cono de aproximadamente $77 \mu \times 107 \mu$ y se encuentra en la axila de la hoja, a un cuarto desde el punto de crecimiento, unos 32

meses antes de la apertura (Figura 1.15). Toda la inflorescencia, el grupo consiste en un eje central (el raquis) del cual surgen las raquillas en sucesión en espiral. Las raquillas en sus vértices llevan las flores masculinas (ya sea individualmente o en pares) en las axilas de las brácteas terciarias (brácteas florales), con flores femeninas en la base. La inflorescencia comienza inicialmente como una protuberancia diminuta al final de dos brácteas de agarre, una de las cuales está situada hacia la columna y la otra entre el pecíolo y la inflorescencia inicial. La primera bráctea envuelve a la segunda. La bráctea primaria luego envuelve todo el racimo floral y forma el exterior y los espasmos internos que envuelven la inflorescencia creciente. La inflorescencia encierra al primordio y tiene en su ápice un anillo de células que se dividen activamente, las que muestran signos de formación de la bráctea interna primaria que luego se convierte en una inflorescencia. En la inflorescencia, las brácteas secundarias aparecen como diminutas protuberancias laterales. Las brácteas secundarias inferiores tienden a alargarse más rápidamente que las del ápice, de modo que sus puntas son casi tan largas como el ápice del raquis principal de la inflorescencia.

La siguiente etapa en el desarrollo de la inflorescencia está marcada por la aparición de los primordios de las raquillas, en las axilas de las brácteas secundarias. Estos primordios se alargan rápidamente vertical y lateralmente al raquis principal dejando atrás las brácteas secundarias. El raquis principal siempre termina con una sola raquilla, casi similar a las ramas laterales. En las raquillas, terciarias o florales, aparecen brácteas, y en la axila de estas brácteas florales hay una zona de división activa de células que forman el inicio del primordio de las flores.

1.2. Plagas y enfermedades del cocotero

En el mar Caribe, entre la isla de Cuba y la Costa de Honduras, muy precisamente en las Islas Caimán se tiene la descripción más antigua de los síntomas que coinciden con la enfermedad del amarillamiento letal del cocotero (ALC) en 1834 (Figura 1.16). Debido a las limitantes de la época, la información sobre los primeros registros reportados para esta enfermedad en el Caribe fueron escasos, esporádicos y hasta cierto punto, inciertos. En 1870 se observó por primera vez en Cuba y se le llamó “podrición del cogollo”, posteriormente apareció en Jamaica, pero fue denominado con un nombre distinto. Hasta los años cincuenta del siglo pasado se sugirió el término de “amarillamiento letal” para

referirse a la enfermedad que hasta la fecha sigue atacando los campos de cocotero (Nutman y Roberts, 1955).

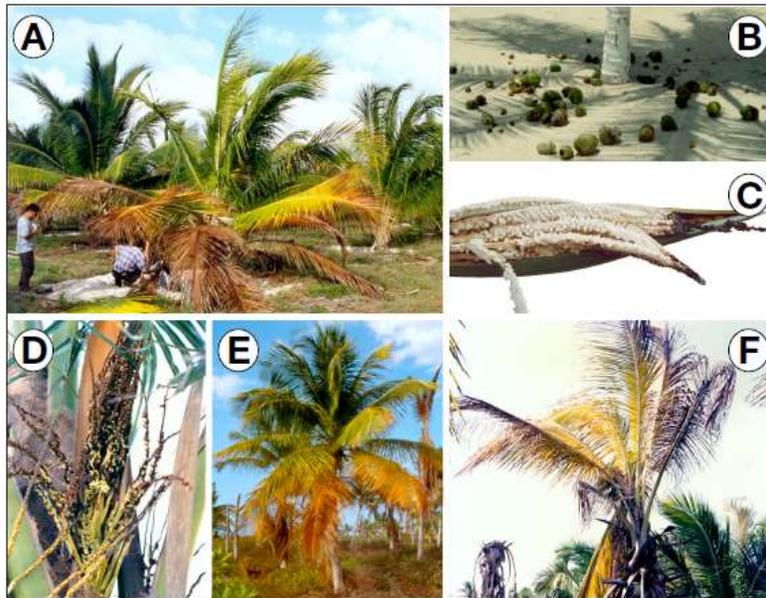


Figura 1.16. Síntomas de amarillamiento letal.

Figura 1.16: (A). Palmas no portadoras que muestran follaje amarillento (A). Palmas que presentan caída de nuez (B). (C) y (D) muestran necrosis en su inflorescencia. Comienzo de amarillamiento en follaje (E), continuó con hojas (F). fotografía tomada de Zizumbo-Villarreal et al. (2008).

En México, los primeros cocoteros que se reportaron enfermos fueron detectados en la isla de Cozumel, en 1977. Para 1982, mediante el uso de microscopía electrónica de transmisión se detectó la presencia del fitoplasma del ALC en los tejidos de las palmas afectadas (Arellano y Oropeza, 1995). Los fitoplasmas son fitopatógenos restringidos al floema que se transmiten por insectos hemípteros (Solomon et al., 2018).

Hoy en día aún no se tienen evidencias de cómo llegó este patógeno al territorio de la Península de Yucatán. Se ha hecho referencia a diversos factores que propiciaron este evento, uno de ellos es la intensa actividad turística que se realiza en la zona, y también factores climáticos señalando a los huracanes como posibles transportadores del patógeno y sus vectores. Por aquellos años, cuando el ALC fue detectado en la Península de Yucatán no existían indicios de que la población nativa de cocoteros fuese resistente al ALC, lo que desencadenó una cadena de eventos que llevaron a la pérdida de un gran

número de plantaciones de cocotero. La enfermedad cruzó la primera frontera estatal e infectó a las plantaciones situadas en El Cuyo, Yucatán, para mayo de 1985 (Carrillo Ramírez y Razo, 1990). Para 1990 el ALC había llegado a la zona norte del estado de Campeche y para finales de ese mismo año, la enfermedad se documentó en Isla Aguada, en el extremo noroeste de la laguna de Términos (Robert et al., 1991). En sólo tres años se detectó el primer caso positivo de ALC en el estado de Tabasco, en el municipio de Centla. En ese momento, el progreso de la enfermedad se ralentizó (Escamilla et al., 1995) y para finales de la década aún no existían reportes de la enfermedad en los estados vecinos de Chiapas y Veracruz, ya que se anticipaba que, para esos años, la enfermedad ya estuviera presente en los estados por su intensa actividad coprera. Este cambio se debió, a que, aunque los cocoteros del centro de Tabasco, visualmente eran similares a las variedades susceptibles de la península, comparten cierto grado de parentesco genético con las poblaciones de la costa del Pacífico mexicano, las cuales presentan un mayor grado de resistencia al ALC. La enfermedad cruzó finalmente el río Tonalá hacia el estado de Veracruz y actualmente continúa activa, en mayor o menor medida, en todas las entidades anteriormente señaladas. Desde su llegada a México, el ALC ha destruido alrededor de 700 mil cocoteros, teniendo registro de uno de los últimos brotes que se registraron en Tuxpan, Veracruz, a escasos kilómetros de la frontera con Tampico (Mora-Aguilera et al., 2014). En gran medida se han cumplido las predicciones realizadas por Zizumbo et al., (1999), sobre la dispersión de la enfermedad en México (Figura 1.17).

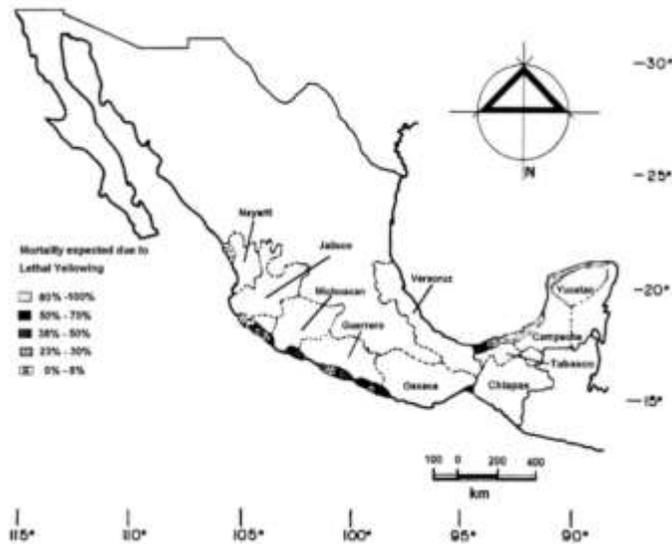


Figura 1.17. Mortalidad esperada debida al amarillamiento letal del cocotero en las áreas productoras de copra en México (Zizumbo et al., 1999).

El ALC, no es exclusivo del cocotero, ya que este problema también se ha documentado en otras palmas en México, como *Thrinax radiata* Lodd, ex Desf. y *Adonidia merrillii* Becc. El agente causal del ALC es un fitoplasma conocido como 16SrIV-A. En el estado de Tabasco ocurrió un hecho que ha introducido una nueva variante en el estudio del ALC. En un principio el brote de ALC se concentró en la ciudad de Frontera y zonas aledañas. Sin embargo, a poco más de 80 kilómetros al suroeste, en el corazón del estado, se reportaron cocoteros con síntomas que alertaron la posible llegada de la enfermedad a la zona del sureste. Pero a diferencia de los síntomas reportados inicialmente para el ALC, las hojas afectadas presentaban una coloración café-rojiza (Tymon et al., 1998). A esta la enfermedad se le dio el nombre de *Yucatan coconut lethal decline* (Declinamiento letal del cocotero de Yucatán) o DLY. Y en cuanto al agente causal se nombró fitoplasma 16SrIV-B. Este fitoplasma, comparte la mayoría de los síntomas que presenta el ALC, pero su virulencia es mucho menor. Mientras que el ALC provocó una mortandad de importancia en los cocoteros a su llegada a la península de Yucatán, el DLY se ha reportado en contadas ocasiones, y no ha causado pérdidas considerables en las plantaciones afectadas. La distribución geográfica de estas enfermedades refleja que ostenta un área de influencia mayor el ALC sobre el DLY, tanto a nivel mundial como en México. En el caso específico del DLY, no se ha reportado su presencia en la península de Yucatán. En México, el fitoplasma 16SrIV-B ha sido asociado a cocoteros enfermos únicamente en los estados de Tabasco, Oaxaca y Guerrero (Harrison et al., 2002) y fuera de territorio mexicano en Honduras. Otro aspecto que distingue a las dos cepas de micoplasma, es la

diversidad de hospederos que tienen. El fitoplasma que causa el ALC tiene un mayor número de especies que actúan como hospederos.

Por otro lado, durante el periodo de apogeo del ALC en la zona norte de la península de Yucatán, en 1994, en el municipio de Calkiní, en Campeche se reportó una enfermedad desconocida en plantaciones comerciales de la especie *Carludovica palmata* Ruiz & Pav., coloquialmente denominada como jipi-japa o palma de jipi, perteneciente a la familia *Cyclanthaceae*. El padecimiento fue denominado *Carludovica palmata yellows* o CPY. Todos los síntomas sugerían que el agente causal era el fitoplasma que provoca el ALC (Cordova et al., 2000); sin embargo, en este caso se trató de un nuevo fitoplasma, al que se le designó como fitoplasma 16SrIV-D. Hay muy pocos artículos que aborde la problemática del fitoplasma 16SrIV-D, y la mayoría omite mencionar a *C. nucifera* como uno de sus hospederos. Este fitoplasma está ligado a una grave enfermedad en las palmas datileras conocida como *Texas Phoenix palm decline* (TPPD), observada por primera vez en Brownsville, Texas, en 1978. A esta enfermedad se le propuso ser nombrada como “bronceamiento letal” (*Lethal brozing*) para unificar ambas nomenclaturas bajo una sola patología, ya que la misma enfermedad recibe nombres distintos dependiendo de la parte del mundo en la que la reportan y el hospedero involucrado.

Desafortunadamente el ALC no es la única enfermedad que afecta al cocotero. Existe todo un catálogo de las diferentes enfermedades que lo afectan, con los consecuentes daños a la producción. Al ser el cocotero una palmera perenne con una vida útil de muchas décadas, sufre una serie de estreses bióticos y abióticos durante varias etapas de su crecimiento. Se sabe que los patógenos microbianos que la afectan incluyen hongos, bacterias, virus, viroides y fitoplasmas. Entre las 173 especies de hongos reportadas en el coco, solo unas pocas son letales, mientras que otras causan pérdidas económicas de diversa magnitud. Actualmente ya se han podido determinar los agentes causales de diversas enfermedades, antes consideradas enfermedades de etiología desconocida. Si bien hay medidas curativas disponibles para algunas enfermedades como el sangrado del tallo, la profilaxis es la mejor opción para algunas de las enfermedades letales como la pudrición del cogollo. Se ha determinado que algunas de las enfermedades debilitantes no letales responden favorablemente a las medidas de manejo nutricional. Por lo tanto, adoptar un enfoque integrado que involucre variedades tolerantes, medidas culturales, nutricionales, profilácticas y fitosanitarias es la mejor opción para el manejo de las enfermedades del coco en la actualidad. En vista de las dificultades debidas a la alta

estatura de la palma, se deben desarrollar tecnologías modernas como drones controlados a distancia asistidos por computadora para las operaciones de protección de plantas. Métodos de teledetección que utilizan tecnologías avanzadas pueden ayudar en la vigilancia regular de la incidencia, intensidad y propagación de la enfermedad. Las técnicas moleculares también pueden ayudar en el diagnóstico precoz y en la mejora de la resistencia. También deben desarrollarse estrategias de manejo de enfermedades integradas específicas de cada región para enfermedades específicas para lograr la máxima eficacia en el control de las enfermedades que afectan al cocotero (Cuadro 2) (Iyer et al., 2018).

Cuadro 1.1. Lista de enfermedades reportadas para el cocotero (Iyer et al., 2018).

Enfermedad	Patógeno/agente causal	Distribución
I: Principales enfermedades causadas por hongos		
Pudrición del cogollo	<i>Phytophthora palmivora</i> , <i>P. heveae</i> , <i>P. katsurae</i> , <i>P. nicotianae</i> , <i>Fusarium moniliforme</i> , <i>F. solani</i> , <i>Graphium</i> sp.	Indias Occidentales, India, Costa de Marfil, Indonesia, Jamaica, Puerto Rico, África, Malasia Peninsular y Filipinas
Pudrición de la fruta o mahalí	<i>P. arecae</i> , <i>P. katsurae</i>	India, Sri Lanka y Costa de Marfil
Pudrición de la base del tallo	<i>Ganoderma lucidum</i> , <i>G. applanatum</i> , <i>G. zonatum</i> , <i>G. boninense</i>	India, Florida, Estados Unidos, América del Sur, Java, África tropical, Australia, Japón, Indonesia, Malasia, Filipinas, Samoa, Sri Lanka y Tasmania
Stem bleeding	<i>Thielaviopsis paradoxa</i> / <i>Chalara paradoxa</i>	Sri Lanka, India, Indonesia, Malasia, Filipinas, Fiyi, Ghana, Trinidad
Pudrición de la hoja	<i>Exserohilum rostratum/Colletotrichum gloeosporioides/Fusarium solani F. moniliforme</i>	India
Grey leaf blight	<i>Pestalotiopsis palmarum</i>	Guayana, India, Malasia, Nueva Hébridias, Sri Lanka, Trinidad, Nigeria

Leaf blight	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	India
II. Enfermedades causadas por virus		
Decaimiento foliar del cocotero o marchitamiento de Vanuatu	Virus de la pudrición foliar del coco (CFDV)	Vanuatu
III. Enfermedades causadas por viroides		
Cadang-cadang del cocotero	Viroide cadang-cadang del cocotero (CCCVd)	Las Filipinas
Tinangaja del cocotero	Viroide de la tinangaja del cocotero (CtiVd)	Guam en las islas Mariana
IV. Enfermedades producidas por protozoarios		
Marchitez fatal o pudrición del corazón	<i>Phytomonas staheli</i>	Costa Rica, Honduras, Nicaragua, Brasil, Colombia, Ecuador, Guyana, Perú, Surinam, Venezuela, Granada, Trinidad y Tobago
V. Otras enfermedades menores		
Podredumbre letal del tallo	<i>Marasmiellus cocophilus</i>	Kenia y Tanzania
Antracnosis	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Brasil, India
Manchado en las hojas	<i>Bipolaris incurvata</i>	Hawái, Florida, Jamaica, Asia, Australia, Oceanía (Polinesia francés, Fiyi), Filipinas, Seychelles
Manchado foliar de algas	<i>Cephaleuros virescens</i> , <i>Cephaleuros parasiticus</i>	Hawái
Tizón del hilo	<i>Pellicularia filamentosa</i> , <i>Corticium penicillatum</i>	Sri Lanka, Fiyi, Papúa, Nueva Guinea, Samoa y las Islas Salomón en Oceanía

El estudio de las enfermedades que afectan al cocotero también se ha visto beneficiado del uso de las herramientas ómicas. Rajesh et al., (2021b; 2018b) han creado un modelo para explicar los mecanismos de defensa del cocotero a la enfermedad de la marchitez de la raíz (Figura 1.18). Este modelo está basado en los genes expresados diferencialmente entre plantas sanas y plantas enfermas y analizado por su enriquecimiento. Como ejemplo, mostramos su uso para la enfermedad del marchitamiento de la raíz. La mayoría de las variedades o híbridos de coco en la India analizados son susceptibles a la enfermedad del marchitamiento de la raíz; sin embargo, se ha informado que CGD (Chowghat Green Dwarf) posee mayor tolerancia a esta enfermedad (Thomas et al., 2018; Nair et al., 2004). Para obtener información molecular sobre los mecanismos de resistencia, Rajesh et al. (2018b; 2015) llevaron a cabo un estudio del patrón de expresión génica global de plantas sanas y enfermas mediante RNA-Seq comparativo en una plataforma Illumina. Los análisis de expresión génica diferencial revelaron un total de 2718 transcritos que se expresan diferencialmente entre las palmas sanas y las enfermas; además, 136 transcripciones se expresan específicamente en palmas enfermas, mientras que 454 transcritos son exclusivos de las palmas sanas. Las diferencias más significativas entre ambos tipos de palmas fue un enriquecimiento significativo en las rutas de unión a iones metálicos, la fijación de carbono, y la biosíntesis de metabolitos secundarios. Cabe destacar la regulación al alza de ciertas proteínas, que son típicas de las interacciones planta-patógeno, como las proteínas de unión al ADN WRKY y 41 proteínas similares a la calmodulina. Las abundancias diferenciales de genes clave se corroboraron mediante PCR cuantitativo en tiempo real.

Con base en los resultados obtenidos de este estudio, se elaboró un modelo para la interacción cocotero-patógeno (Figura 1.18). El desencadenante principal de las respuestas de defensa del cocotero se ve afectado por la interacción entre los receptores de la membrana del hospedero y los efectores similares a los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP). La interacción entre el receptor y los PAMP inicia las cascadas de transducción de señales. Las proteínas cinasas son actores clave en estas cascadas regulatorias; influyen en la entrada de Ca^{2+} y, a su vez, en la señalización del calcio. También se incluye al ácido salicílico, que da lugar a la activación de genes implicados en las respuestas de defensa (p. ej., la chalcona sintasa) en palmas sanas con la ayuda de diferentes clases de factores de transcripción que contienen dominios WRKY y NAC (Rajesh et al., 2018b) (Figura 1.18).

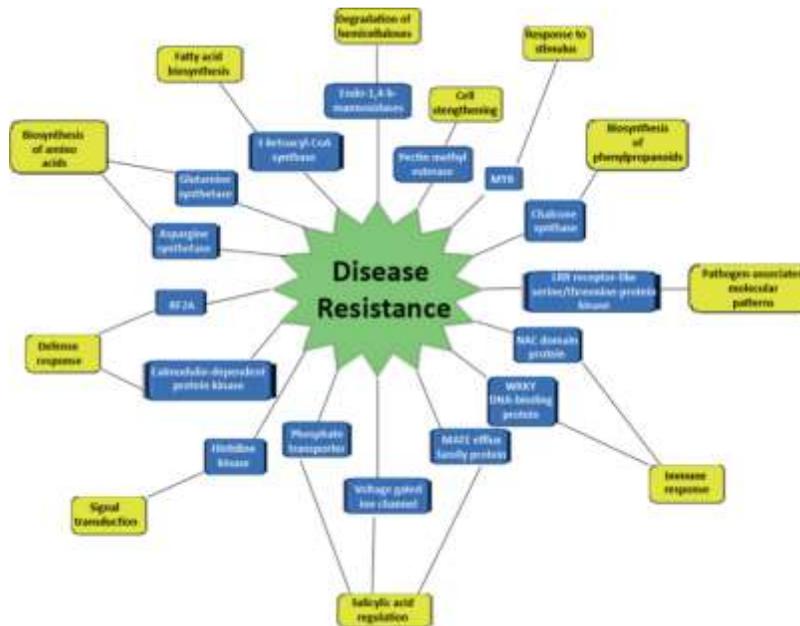


Figura 1.18. Modelo para explicar los mecanismos de defensa del cocotero a la enfermedad de la marchitez de la raíz.

Figura tomada Rajesh et al., (2021b; 2018b).

Afortunadamente durante las últimas décadas, los fitomejoradores han determinado que ciertos genes están directamente involucrados en la resistencia a enfermedades, se les conoce como genes de resistencia (genes R). La mayoría de estos genes R codifican proteínas (proteínas R) con un sitio de unión a nucleótidos y un dominio repetido rico en leucina (NBS-LRR por sus siglas en inglés). Sin embargo, existen ciertas secuencias de función desconocida que codifican para estos motivos y que han sido ligadas a genes R conocidos y han sido denominadas como 'candidatos a genes de resistencia' (RGC por sus siglas en inglés). Actualmente, se han identificado 340 RGC en el genoma de *C. nucifera*, y se han caracterizado filogenéticamente 231 secuencias (Figura 1.19) (Puch-Hau et al., 2021), lo que indica la existencia de clados específicos de genes en *C. nucifera*. Otros clados también comprenden una mezcla de secuencias NBS de *C. nucifera*, *E. guineensis* y *P. dactylifera* (Figura 1.20), lo que indica que genes de resistencia similares se comparten en diferentes géneros de las Arecales (Puch-Hau et al., 2021).

La distribución de las RGC de la palma de coco en los seis clados muestra un alto nivel de divergencia (Figura 1.21), posiblemente debido a la naturaleza de la presión de

selección impuesta por sus patógenos. La historia evolutiva de las RGC de la palma de coco indica que su diversificación podría haber ocurrido a través de eventos potenciales de recombinación, tándem o duplicación genómica y por su historia de domesticación.

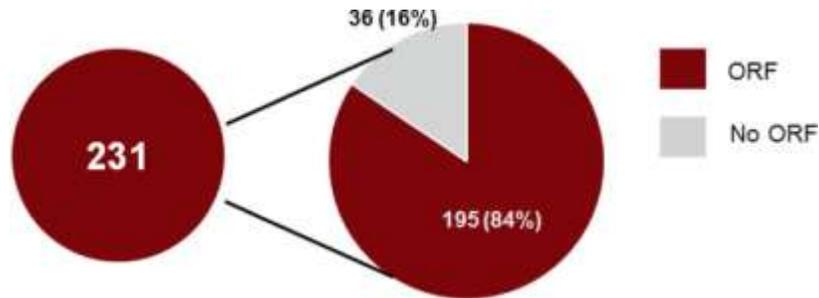


Figura 1.19. Número total de RGC aislados en la palma de coco por Puch-Hau et al. (2016; 2015).

Figura 1.19: Los RGC con ORF se indican en rojo, mientras que los RGC sin ORF están en gris. Figura tomada de Puch-Hau et al., (2021).

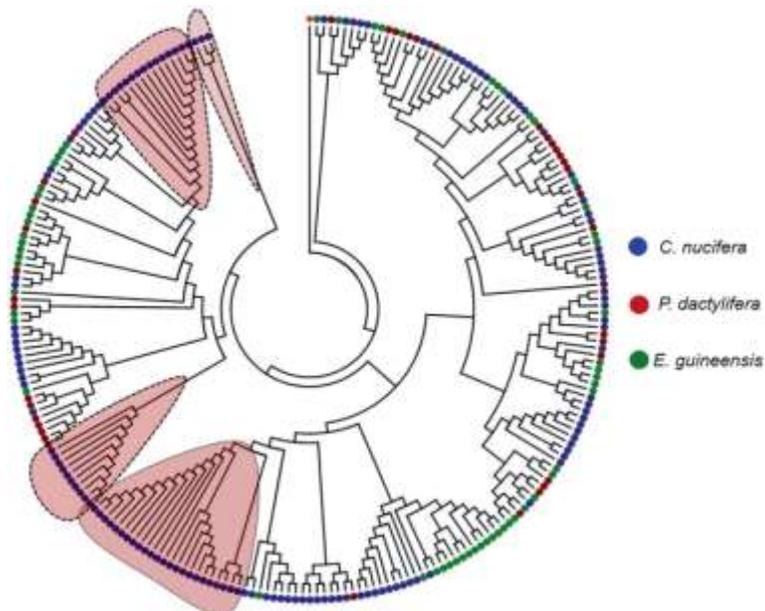


Figura 1.20. Relación filogenética de las secuencias de NBS de *C. nucifera*, *P. dactylifera* y *E. guineensis*.

Figura 1.20: Los clados indicados con líneas discontinuas representan secuencias únicas de NBS de palma de coco. Los círculos azul, rojo y verde representan secuencias NBS de *C. nucifera*, *P. dactylifera* y *E. guineensis*, respectivamente. Figura tomada de Puch-Hau et al., (2021)

Recientemente, el grupo del CICY encabezado por los doctores Carlos Oropeza y Luis Sáenz construyó un árbol filogenético para inferir la historia evolutiva de las RGC en *C. nucifera* y lo comparó con otras especies de plantas (monocotiledóneas y dicotiledóneas). En este análisis, se identificaron seis clados (I-VI) (Figura 1.21). Los clados I-IV comprendían principalmente RGC de monocotiledóneas (*C. nucifera*, *E. guineensis*, *P. dactylifera*, *O. sativa* y *S. bicolor*). Por el contrario, los clados V y VI comprenden principalmente secuencias NBS de plantas dicotiledóneas (*A. thaliana*, *B. napus* y *B. oleracea*). Como era de esperar, la mayoría de las RGC identificadas en la palma de coco estaban estrechamente relacionadas con secuencias NBS de plantas de la misma clase (monocotiledóneas) y más aún con aquellas de la misma familia (Arecaceae: *E. guineensis* y *P. dactylifera*). Por otra parte, las relaciones filogenéticas identificadas entre monocotiledóneas y dicotiledóneas (principalmente en los clados V y VI) respaldan la propuesta de Cannon et al. (2002) por el cual todavía existen varios clados antiguos de RGC y que algunos de ellos son anteriores a la división entre monocotiledóneas y dicotiledóneas.

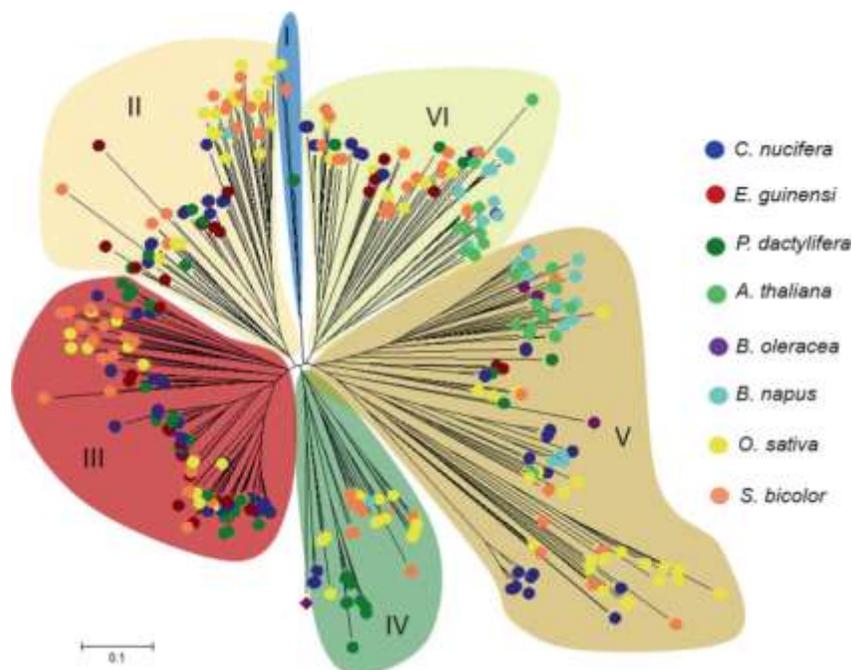


Figura 1.21. Relación filogenética entre las RGC de diferentes especies de plantas.

Figura 1.21: Se identificaron seis clados principales. Las monocotiledóneas están representadas por *C. nucifera*, *E. guineensis*, *P. dactylifera*, *O. sativa* y *S. bicolor* y las dicotiledóneas por *A. thaliana*, *B. napus* y *B. oleracea*. Figura tomada de Puch-Hau et al., (2021)

1.3. Usos e Importancia del cocotero

El coco es uno de los principales cultivos de plantación que se cultiva en las regiones tropicales húmedas; se le conoce justificadamente como el árbol de la vida, especialmente en las regiones de Asia y el Pacífico. Casi todas las partes de la palma, desde la corona hasta las raíces, sirven a la economía humana. La palma proporciona alimento rico en nutrientes (el endospermo), el agua de la nuez tierna como bebida de agua dulce refrescante, la savia de la inflorescencia y el aceite es apto para fines comerciales e industriales. Desde luego también se utiliza la fibra y la concha se utiliza para producir carbón activado. Su contribución tanto a la cadena alimentaria como a la no alimentaria tiene un impacto significativo en el bienestar socioeconómico de grandes poblaciones rurales del mundo tropical que dependen de ella (Figura 1.22) (Jayasekhar y Chandran, 2021; Rajesh et al., 2021a; Salum et al., 2020). El coco se cultiva en más de 90 países, pero solo en unos 50 países hasta la fecha lo utilizan comercialmente para la generación de ingresos además de los usos tradicionales y domésticos conocidos. Si bien un volumen significativo se consume a nivel nacional, los productos y subproductos exportados llegan a los consumidores en más de 110 países importadores. Las plantaciones de cocotero son en su mayoría pequeños agricultores en la naturaleza y la operación, que ocupan un área de tierra que mide menos de una ha en la mayoría de los casos. Las estadísticas indican que más del 95 % de la población mundial de cocoteros es propiedad de pequeños agricultores (Salum et al., 2020).



Figura 1.22. Usos del cocotero.

Figura 1.22: La palma del cocotero tiene un uso integral. Se utilizan todos sus componentes. Figura cortesía del Dr. Carlos Oropeza Salín.

La fibra obtenida de la palma tiene un valor comercial importante. La cáscara encuentra un uso como combustible en diversas industrias, y la madera proporciona diversos productos básicos para uso doméstico e industrial. El cocotero y sus productos también se pueden ver como potenciadores de la salud; entre estos potenciadores se tienen al aceite de coco virgen, al agua de coco tierno y la savia de las inflorescencias (Figura 1.23). A estos alimentos potenciadores también se les conoce como alimentos funcionales (Figura 1.24) (Karun et al., 2022a). La exportación de azúcar en Indonesia pasó de 15,000 t en 2012 a más de 35,000 t en 2018 (Salum et al., 2020).



Figura 1.23. Usos del cocotero II.

Figura 1.23: El cocotero sirve para producir una gran cantidad de productos, desde aceite, hasta sustrato para la horticultura, pasando por la construcción de autopartes. Figura cortesía del Dr. Carlos Oropeza Salín



Figura 1.24. Usos del cocotero III.

Figura 1.24: En los últimos años el cocotero se ha estado utilizando para la producción de una gran variedad de alimentos, desde la tradicional agua de coco, hasta azúcar. Figura cortesía del Dr. Carlos Oropeza Salín.

Un uso de la palma de cocotero que ha aumentado exponencialmente en los últimos años es el agua de coco embotellada (Figura 1.25). La importación de agua por los Estados Unidos pasó de 40,000 t en 2010 a más de 340,000 t en 2018 (Salum et al., 2020).

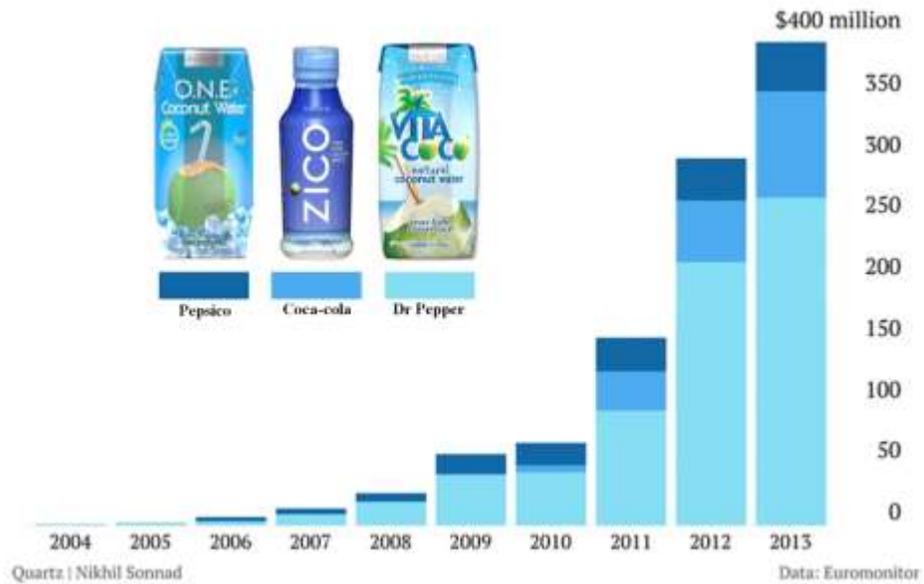


Figura 1.25. Usos del cocotero IV.

Figura 1.25: El agua de coco ha tomado por asalto al mercado. Las grandes embotelladoras del mundo han creado un enorme mercado para el agua de coco en los últimos diez años. Esto ha generado una gran presión para el cultivo del cocotero. Figura cortesía del Dr. Carlos Oropeza Salín.

1.4. Problemática del cocotero a nivel mundial

El cocotero se enfrenta a diversos desafíos debido al cambio en las condiciones climáticas, el aumento del nivel del mar, la salinización del suelo y el brote de plagas/enfermedades (Oropeza-Salín et al., 2020; Iyer et al., 2018; Solomon et al., 2018). También son problemas importantes el envejecimiento de las plantaciones, los largos tiempos que lleva la producción de nuevas variedades y el crecimiento de la industria que tiene como base el cocotero, principalmente el agua envasada y la producción de azúcar. Por lo que diversos autores han sugerido que la conservación de la diversidad genética del cocotero es imperativa para la seguridad alimentaria y nutricional. La urbanización y la industrialización de las áreas tradicionales para el cultivo del cocotero han causado una importante erosión genética. Por lo que se ha sugerido la conservación sistemática de los cocoteros nativos como necesidad para proteger las poblaciones existentes (Karun et al., 2022b).

El crecimiento de la demanda del cultivo debe ser compensado con el crecimiento a la par de la producción. Esta es la tarea más difícil considerando la propia morfofisiología de planta, la amenaza de diversas plagas y enfermedades, y lo más importante que la mayoría de las plantaciones en los países productores de las palmas de coco son viejas. En cuanto a las amenazas fitosanitarias, quizás la más preocupante son las enfermedades producidas por fitoplasmas. En América, la enfermedad de amarillamiento letal asociada a fitoplasma (LY) ha matado millones de palmas en diferentes países de la región del Caribe. Por lo que se han realizado esfuerzos importantes llevados a cabo en Jamaica y México para identificar la resistencia del cocotero ante LY. Se han identificado con éxito ecotipos resistentes en ambos países (Oropeza et al., 2005). Este esfuerzo se ha ampliado a otras zonas en el mundo (Bourdeix et al., 2020b; Thomas et al., 2018).

1.5. La biotecnología y el cultivo de tejidos vegetales como herramientas para el mejoramiento genético de las plantas

De lo expuesto líneas arriba es claro que el cocotero, así como todos los cultivos de plantación de larga vida tienen problemáticas diferentes a los cereales y por lo tanto

requieren de estrategias diferentes para su mejoramiento genético y producción de nuevas variedades. Desde hace unos cincuenta años, la biotecnología se ha convertido en una poderosa herramienta para solucionar la problemática de estos cultivos, entre ellos el cocotero (Adkins et al., 2020).

Entre las diferentes herramientas que nos proporciona la biotecnología se encuentra el cultivo de tejidos vegetales (CTV). Se define como cultivo de tejidos vegetales (CTV), al cultivo de cualquier parte de una planta (órganos, tejidos, células) en medios artificiales, en un entorno controlado y condiciones asépticas (Loyola-Vargas y Ochoa-Alejo, 2018). Este conjunto de técnicas surgió como un enfoque experimental para demostrar la teoría celular, que establece que las unidades básicas de estructura y reproducción están constituidas por células. Así como su concepto de totipotencia, que es el potencial genético de una célula vegetal para generar un organismo multicelular completo (Haberlandt, 1902).

En la mayoría de las principales familias de plantas terrestres, el tejido herido es cicatrizado por un callo formado por células no diferenciadas. Si se altera artificialmente el balance de los reguladores del crecimiento vegetal (RCV) se puede propiciar la formación de una gran cantidad de las células desdiferenciadas. Estas células pueden cultivarse *in vitro* y se les conoce con el nombre de callo. Los callos pueden aislarse y cultivarse en medios de cultivos definidos por tiempo indefinido. Por ejemplo, en nuestro laboratorio contamos con callos que tienen 40 años de haber sido iniciados.

Los callos pueden manipularse de tal forma que de ellos se pueden originar suspensiones celulares. Las suspensiones celulares son el mismo callo sólo que se le ha disgregado en un medio líquido. Estos cultivos crecen mucho más rápido que los callos y se les puede utilizar para seleccionar células resistentes a diferentes tipos de extremos ambientales y/o inducir a formar embriones somáticos. También se puede hacer que las suspensiones celulares regresen a callo, y de éste regenerar una planta completa, la cual puede llevar las características con las que se seleccionaron las células. Las suspensiones celulares también pueden convertirse en protoplastos, células sin pared, los cuales permiten formar verdaderas clonas y llevar a cabo en los protoplastos el proceso de selección. Este proceso permite acortar en muchos años la obtención de una nueva variedad vegetal. El primer ejemplo que se publicó en la literatura, utilizando esta metodología, fue la

obtención de papas por Sherpard et al. (1980). Este grupo utilizó hojas para la obtención de los protoplastos.

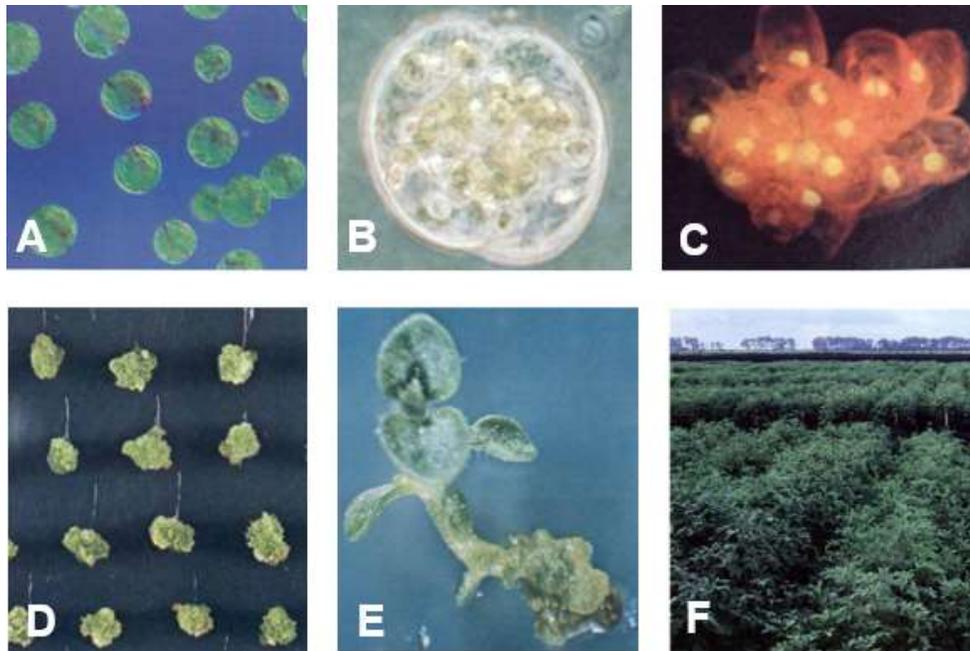


Figura 1.26. Plantas obtenidas a través del cultivo de protoplastos.

Figura 1.26: A. Protoplastos preparados a partir de las células foliares de una planta de patata se contraen en esferas cuando se separan de su pared de soporte. B. Protoplastos en crecimiento; ha sintetizado nuevas paredes celulares y está en proceso de dividirse por primera vez en esta micrografía de contraste de fase, que se realizó después de seis días de cultivo. C. Microcallo de células indiferenciadas cultivadas a partir de un protoplasto de una sola célula de hoja de papa se tiñó con naranja de acridina y se iluminó con radiación ultravioleta para hacer esta micrografía. El núcleo de cada célula aparece como una mancha amarilla brillante. D. Callos derivados de protoplastos de células foliares de papa se ven creciendo en una placa de Petri unas cuatro semanas después de que se transfirieron al segundo medio de cultivo, que induce brotes. Los callos suelen empezar a ponerse verdes en esta etapa del proceso de regeneración. E. El brote inicial emerge del callo después de seis semanas de incubación en el medio inductor de brotes. El aumento es de unos 20 diámetros. F. Campo de clones derivados de protoplastos (llamados protoclones) Fotografías tomadas de Shepard et al. (Shepard, 1982).

Si bien hoy en día obtener protoplastos y convertirlos en Plants completas y saludables aún es difícil, todos los días vemos en la literatura que el número aumenta constantemente (Naing et al., 2021; Wang et al., 2013). Los protoplastos también están siendo utilizados de manera eficiente para ser modificados con la nueva herramienta de CRISPR/Cas9. Así por ejemplo, se ha transformado arroz (Bes et al., 2021), papa (Londenberg et al., 2020) y trigo (Cui, 2017).

1.5.1. La embriogénesis somática

La embriogénesis somática (ES), forma parte del CTV. Es el proceso mediante el cual una célula, o un conjunto de células somáticas, producen un embrión somático, el cual es capaz de germinar y producir una planta sana y vigorosa (Loyola-Vargas et al., 2019; Loyola-Vargas y Ochoa-Alejo, 2016).

Los embriones fueron un paso importante en la evolución introducido por las plantas terrestres, y son esenciales para la reproducción de las plantas superiores (Friedman y Williams, 2004). Los embriones pueden tener diferentes orígenes. 1) Los embriones cigóticos se originan a partir de la fusión de los gametos. 2) Las células somáticas dan origen a embriones somáticos. 3) Las células del primordio de las semillas se pueden desarrollar en embriones bajo ciertas condiciones y subsecuentemente en una semilla sin pasar por la fertilización, en un proceso conocido como apomixis. 4) Se pueden formar embriones a partir de las microesporas en un proceso denominado androgénesis; las microesporas pueden formar embriones haploides en respuesta a diferentes tipos de extremos ambientales. 5) En los primeros estadios de desarrollo de la embriogénesis cigótica existe una conexión entre el eje embrionario y el tejido materno, a esta estructura se le conoce como el nombre de suspensor. El suspensor está formado por unas cuantas células; sin embargo, en algunos casos pueden ser miles de células y ser capaces de formar un embrión (Figura 1.27) (Radoeva y Weijers, 2014).

La ES es un fenómeno natural que se le puede encontrar en plantas del género *Kalanchoë*, perteneciente a la familia de las crasuláceas. En la orilla de las hojas de estas plantas aparecen pequeñas estructuras bipolares. Algunas plantas de este género las producen de forma constitutiva, otras en respuesta a extremos ambientales y un tercer grupo en una combinación de los dos anteriores (Garcês y Sinha, 2009).

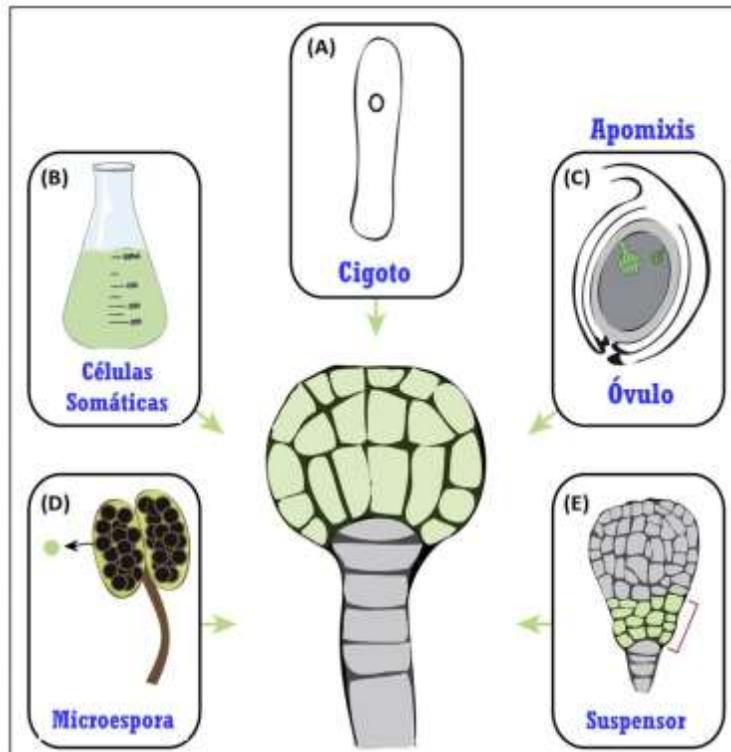


Figura 1.27. Diferentes orígenes de los embriones vegetales.

Figura 1.27: (A) La embriogénesis cigótica ocurre después de la fertilización del óvulo, dando lugar al cigoto. El cigoto luego se convierte en un embrión (o una semilla). (B) La embriogénesis somática se produce de forma natural o después de la inducción experimental, como por ejemplo mediante un tratamiento con RCV. Los embriones somáticos pasan por las mismas etapas de desarrollo que los embriones cigóticos. (C) La embriogénesis apomíctica, que tiene lugar en el primordio de la semilla (óvulo), es otro camino hacia la identidad embrionaria, también conocida como reproducción asexual. Los embriones generados son genéticamente idénticos a la planta madre. (D) En la embriogénesis de microsporas, las microsporas también pueden convertirse en embriones cuando se cultivan en condiciones particulares. (E) La embriogénesis extraembrionaria (suspensor) ocurre cuando las células del suspensor cambian de identidad a células embrionarias. Figura modificada de Radoeva y Weijers (2014).

La ES es un proceso complejo que aún no se comprende del todo y que es afectada por diferentes factores (Figura 1.28). Sabemos que las células somáticas contienen toda la información para generar una nueva planta. Por lo tanto la ES forma la base de la totipotencialidad celular en las plantas superiores, una característica ausente en los animales.

Entre los principales factores que afectan la ES se tienen a los reguladores del crecimiento, la fuente de nitrógeno del medio de cultivo, el origen del explante, el estadio fisiológico de la planta que se utiliza como fuente del explante, las condiciones de incubación, y desde luego la especie vegetal, la variedad de la planta, su edad, entre otros factores (Loyola-Vargas y Ochoa-Alejo, 2016). También afecta la respuesta embriogénica el medio de cultivo, las fuentes de nitrógeno y carbono, el tiempo de exposición a diferentes RCV, así como a las condiciones del cultivo *in vitro* para cada especie vegetal (Nic-Can et al., 2016; Loyola-Vargas et al., 2008; Fuentes-Cerda et al., 2001; Quiroz-Figueroa et al., 2001).



Figura 1.28. Factores que afectan la embriogénesis somática.

Figura 1.28: Entre los principales factores que afectan la ES se tienen a los reguladores del crecimiento, la fuente de nitrógeno del medio de cultivo, el origen del explante, el estadio fisiológico de la planta que se utiliza como fuente del explante, las condiciones de incubación, y desde luego la especie vegetal, la variedad de la planta, su edad, entre otros factores.

Uno de los factores más determinantes del proceso embriogénico son los RCV, en particular la presencia de auxinas, tanto endógenas como exógenas (Uc-Chuc et al., 2020). Se sabe que se requiere que se dé una acumulación de la auxina endógena

para que se induzca la ES (Ayil-Gutiérrez et al., 2013). También sabemos que si se inhibe el transporte de la auxina endógena, el proceso de ES no se da (Uc-Chuc et al., 2020). La auxina se va acumulando en células específicas del embrión de tal manera que van dirigiendo el desarrollo de los diferentes tejidos como puede apreciarse en la Figura 1.29.

Dado que el proceso de ES puede producirse a partir de suspensiones celulares, puede ser un método muy eficiente de propagación. A diferencia de la embriogénesis cigótica, durante el desarrollo de la ES, los embriones somáticos pueden ser colectados en grandes cantidades en estadios específicos de desarrollo (Quiroz-Figueroa et al., 2006). Por ello la ES representa un interesante sistema para investigar eventos relacionados con la diferenciación celular, desde el estadio de célula somática hasta embrión somático, así como los eventos bioquímicos, moleculares y fisiológicos que permiten el desarrollo del embrión.

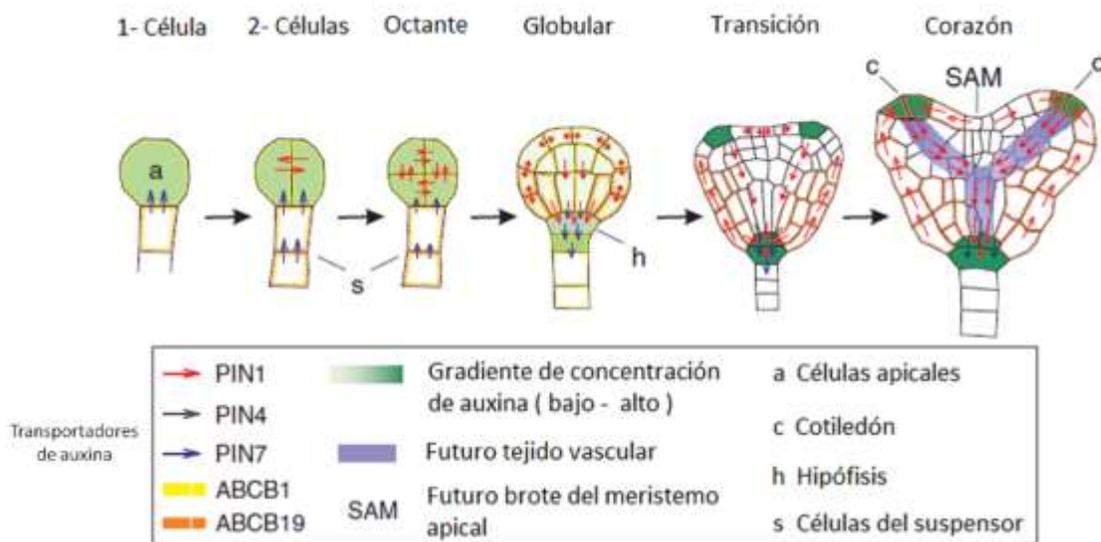


Figura 1.29. Gradientes de auxina y transportadores de auxina durante la embriogénesis cigótica.

Figura 1.29: Representación esquemática de la distribución de auxinas y la localización de los transportadores de auxinas durante el desarrollo embrionario temprano de la planta. La distribución de auxinas (representada como un gradiente verde) se ha deducido de la actividad de DR5 y la inmunolocalización del ácido-3-indol acético (Benková et al., 2003; Friml et al., 2003a; Friml et al., 2002). La localización de los transportadores de salida PIN1, PIN4 y PIN7, así como la de los transportadores ABCB1 y ABCB19, se basa en estudios de inmunolocalización y en observaciones *in vivo* de proteínas etiquetadas con

proteína verde fluorescente (Dhonukshe et al., 2008; Mravec et al., 2008; Friml et al., 2003b). Las flechas indican el flujo de auxina mediado por un transportador particular; las líneas punteadas indican la localización específica del tipo celular de transportadores de auxina particulares sin polaridad obvia. PIN7, localizado en los lados apicales de la(s) célula(s) del suspensor, transporta auxina hacia la célula apical (a) que forma el proembrión; allí, PIN1, que se localiza en todos los lados internos de la célula, distribuye la auxina de manera homogénea. Los transportadores ABCB1 y ABCB19 cooperan durante esta etapa inicial y se localizan de forma apolar en todas las células o solo en la célula superior del suspensor, respectivamente. El momento crucial en el establecimiento del extremo basal del eje embrionario apical-basal ocurre durante la etapa globular temprana, cuando PIN1 comienza a localizarse basalmente en las células proembrionarias, y PIN7 se desplaza simultáneamente del plasmalema apical al basal de las células del suspensor. Estos reordenamientos de polaridad de PIN invierten el flujo de auxina hacia abajo y, con la ayuda de PIN4, conducen a la acumulación de auxina en la hipófisis en formación (h) (ver Glosario, parte inferior derecha de la figura). En esta etapa, El transportador ABCB19 ayuda a mantener la distribución de auxinas en las capas externas del embrión. En los embriones en estadio triangular y de corazón, la simetría bilateral se establece a través de máximos de auxina en los incipientes primordios cotiledonares (c). Estos máximos de auxina son generados por la actividad de PIN1 en la epidermis; sin embargo, en las células internas de los primordios de los cotiledones, PIN1 media el transporte de auxina basipetalmente hacia el extremo de la raíz. SAM, es el meristemo apical del brote. Figura redibujada de Petrášek y Friml (2009).

Los primeros reportes sobre ES se produjeron en un periodo de dos años, a finales de la década de los 50s. El primer investigador en obtener un sistema embriogénico fue Harry Waris, un científico finlandés, en una planta de la familia de las Umbelliferae, la *Oenanthe aquatica* (Krikorian y Simola, 1999). Poco después Steward et al. (1958) y Reinert (1959) observaron la formación de embriones somáticos a partir de suspensiones celulares de *Daucus carota* (Loyola-Vargas, 2016). El proceso embriogénico se inició cuando las suspensiones celulares fueron cultivadas en un medio libre de auxinas. Estos reportes abrieron la puerta a la demostración de la totipotencialidad de las células vegetales, además de desarrollar una poderosa herramienta para el estudio de las características morfológicas, los eventos fisiológicos, moleculares y bioquímicos que suceden durante el inicio y desarrollo de la ES.

Desde entonces ha sido posible obtener respuesta embriogénica en diferentes grados en cientos de especies diferentes. En algunos casos, como la zanahoria la respuesta es muy eficiente, mientras que en otros casos como el de *Capsicum*

chinensi (Regla-Márquez et al., 2019) y *Phaseolus vulgaris*, no ha sido posible. El caso de cocotero es intermedio. Se ha obtenido respuesta embriogénica, pero aún requiere de trabajo para tener un protocolo lo suficientemente eficiente como para que sea económicamente viable producir plantas de cocotero por medio de ES.

1.6. Embriogénesis somática en cocotero

El CTV de cocotero se inició en los años 50' del siglo pasado con diferentes niveles de éxito. Estos estudios iniciales y hasta mediados de la década de los 80' del siglo pasado estuvieron enfocados a la obtención de callos a partir de diferentes explantes, con un énfasis en el rescate de embriones y la generación de la raíz por los embriones cultivados *in vitro* {Cutter Jr., 1954 1267 /id; Davis, 1969 49262 /id; Balaga, 1971 1281 /id; Apavatjirut, 1977 1270 /id; Fisher, 1978 1271 /id; Blake, 1983 49350 /id}. A partir de los años 80' del siglo pasado se empezó un esfuerzo sistemático para desarrollar metodologías que permitieran la propagación masiva del cocotero. En este esfuerzo participaron diferentes grupos, pero principalmente un grupo inglés encabezado por la Dra. Jennet Blake. En primer lugar se iniciaron los esfuerzos por obtener plántulas a partir de callos (Brackpool et al., 1984; Branton y Blake, 1983; Blake, 1983a; Blake y Eeuwens, 1982) y poco más tarde la obtención de embriones somáticos (Karunaratne y Periyapperuma, 1989; Engelmann y Dereuddre, 1988; Bhalla-Sarin et al., 1986). Los diferentes grupos empezaron a producir lo que llamaron embrioides como los que se muestran en la Figura 1.30 del grupo inglés (Blake, 1990). Estos embrioides se llegaban a desarrollar en plantas completas (Figura 1.31). Como puede apreciarse claramente en la Figura 1.30B las estructuras que se forman tienen la forma de los embriones globulares, lo cual se puede confirmar en el corte histológico presentado en la Figura 1.30C.

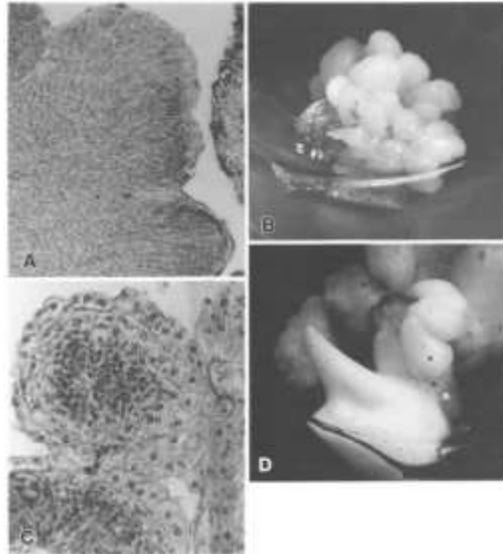


Figura 1.30. Cultivo de tejido de inflorescencia de coco var. Enano Malayo. Primera parte.

Figura 1.30: (A) Una sección de la etapa temprana de formación de calloides a partir del meristemo de una flor joven. (B) Nódulos calloides (después de 5 meses en cultivo) de meristemos florales cultivados con 10^{-4} M 2,4-D. (C) Sección del nódulo. (D) Embrioides en desarrollo a partir de nódulos calloides (después de 7 meses en cultivo). Fotografía tomada de Blake (1990).



Figura 1.31. Cultivo de tejido de inflorescencia de coco var. Enano Malayo. Segunda parte.

Figura 1.31: (E) Desarrollo de brotes desde embriote (después de 9 meses). (F) Desarrollos frondosos anormales a partir de embrioides fusionados. (G)

Tejido del haustorio y raíces desarrollados a partir de embrioides. (H) Plántula desarrollada a partir de un embriode (después de 11 meses). Figura tomada de Blake (1990)

Algunas de las plantas regeneradas se llevaron a campo y se desarrollaron normalmente. Estas fueron unas de los primeros cocoteros obtenidos a partir de embriones somáticos (Figura 1.32).



Figura 1.32. Planta regenerada a partir de cultivo de tejido de inflorescencia.

Fotografía tomada 3.5 años después del establecimiento en las Islas Salomón.
Fotografía tomada de Blake (1990).

Muy poco tiempo después, en la década de los años 90' del siglo pasado, el grupo encabezado por el Dr. Carlos Oropeza en el Centro de Investigación Científica de Yucatán, CICY publicó el primero de los que es ahora una larga lista de artículos sobre la embriogénesis del cocotero (Chan et al., 1998). En esta primera publicación, el grupo del CICY abordó la problemática de la ES del cocotero de forma diferente. En este trabajo se desarrolló un protocolo para la regeneración de coco utilizando plúmulas de embriones cigóticos maduros como explantes y medios con los RCV ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y 6-benciladenina (6-BA). Los embriones somáticos obtenidos fueron capaces de germinar, desarrollarse posteriormente en plántulas y transferirse con éxito al vivero (Figuras 1.33 y 1.34). En la publicación se indica que los rendimientos fueron mayores

que los reportados previamente con explantes de inflorescencias, casi el doble para los callos y más de diez veces para los callos con embriones somáticos. Estos resultados representaron una mejora en el tiempo y el rendimiento con respecto a los protocolos para ES del cocotero previamente reportados. Desde luego las plúmulas no son la fuente de tejido ideal debido a su heterogeneidad genética. En esta primera publicación ya se hizo mención a que la micropropagación de coco usando plúmulas es potencialmente útil cuando se obtienen de frutos producidos a partir de progenitores seleccionados de desempeño sobresaliente, como aquellos resistentes a enfermedades (Chan et al., 1998). Esta publicación es una de las primeras en las que menciona el uso de dos medios. Un primer medio para inducir al explante a la formación de callo o de las estructuras embriogénicas, y un segundo medio para inducir la germinación del embrión. Este procedimiento está ahora muy extendido en la inducción de la ES.

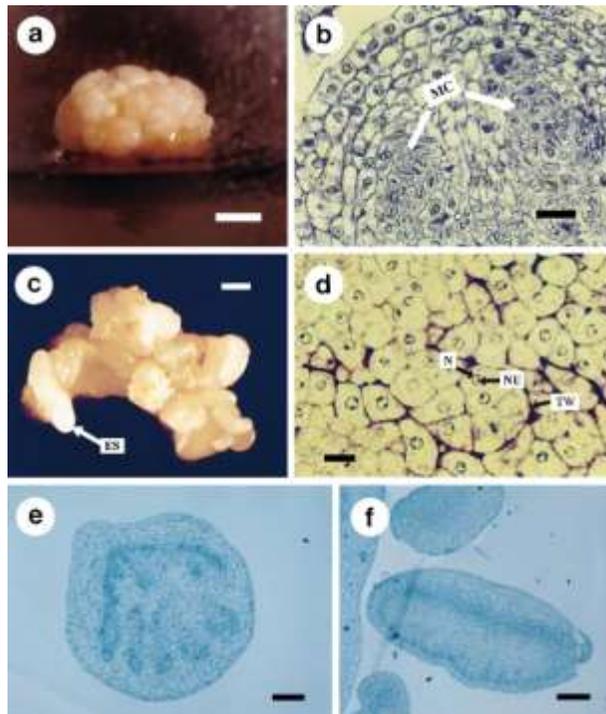


Figura 1.33. Embriogénesis somática del cocotero a partir de plúmula.

Figura 1.33: **a** Tejido de callo desarrollado a partir de explantes de plúmula después de 3 meses de cultivo en medio I (0.1 mM 2,4-D) (barra 2 mm). **b** Sección transversal histológica que muestra centros meristemáticos (MC) en tejido calloso (barra 27 μ m). **c** Callos con estructuras embriogénicas (ES) desarrollados a partir de tejido de callos cultivado adicionalmente en medio I durante otros 3 meses (o 6 meses desde el inicio del cultivo) (barra 1 mm). **d** Células embriogénicas, núcleo (N), nucléolo (NU) y pared gruesa (TW) (bar 10 μ m).

μm). **e, f** Proembriones (**e**, barra 100 μm) y embriones (**f**, barra 200 μm) en secciones histológicas de callos con estructuras embriogénicas representadas en **c**. Fotografía tomada de Chan et al. (1998).

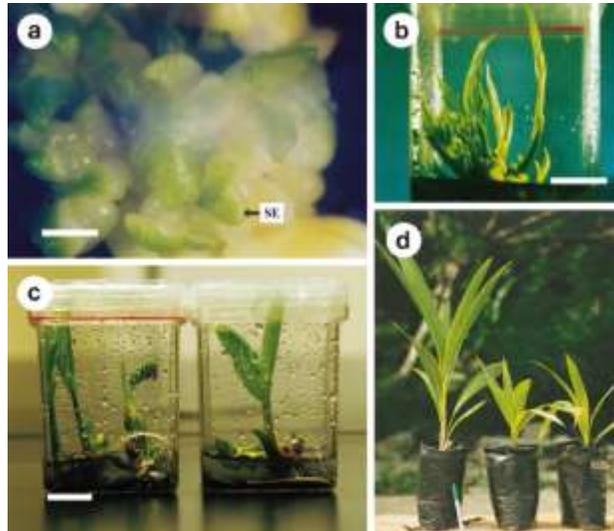


Figura 1.34. Regeneración de plántulas de cocotero a partir de embriones somáticos.

Figura 1.34: **a** Embriones somáticos (SE) desarrollados en callos portadores de estructuras embriogénicas tras 3 meses de cultivo en medio II (1 μM 2,4-D y 50 μM 6-BA) y un fotoperiodo de 12 h luz/12 h oscuridad (barra 4 mm). **b** Grupos de brotes formados a medida que germinan los embriones somáticos (barra 20 mm). **c** Brotes individuales extirpados de grupos de brotes desarrollados en plántulas individuales (barra 20 mm). **d** Plántulas en vivero después de la aclimatación en invernadero (pluma 14 cm). Fotografía tomada de Chan et al. (1998).

A partir de entonces, el grupo del CICY ha publicado una gran cantidad de trabajos. Se mencionarán y analizarán los que produjeron saltos cualitativos hacia la obtención de embriones somáticos de manera más eficiente. Se estudió el efecto de los brasinólidos (Azpeitia et al., 2003), así como del ácido abscísico y el polietilenglicol (Azpeitia-Morales et al., 2003). La dinámica en la absorción del 2,4-D durante la formación del callo embriogénico, con el fin de entender el mecanismo mediante el cual se produce la ES en el cocotero (Sáenz et al., 2005).

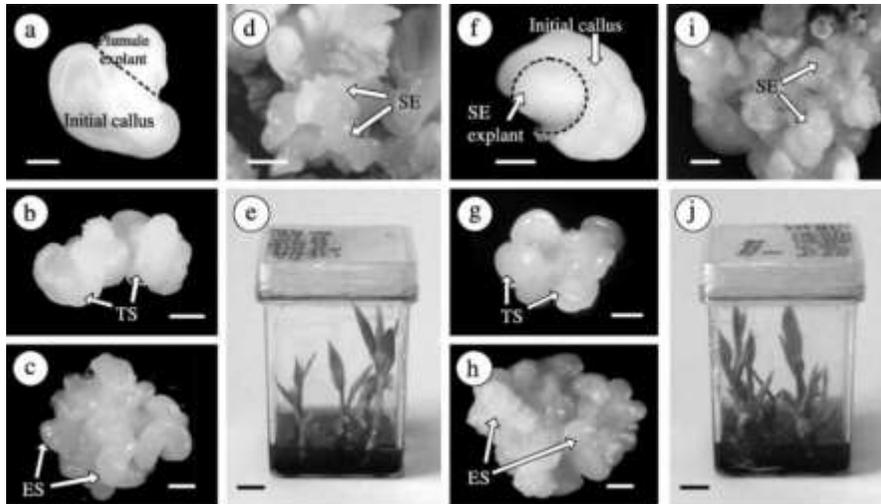


Figura 1.35. Desarrollo morfológico de cultivos de plúmulas de coco durante la embriogénesis somática primaria (a-e) y secundaria (f-j).

Figura 1.35: Explantes (plúmulas o embriones somáticos) cultivados en medio I/condición I formando el callo inicial (a, f). Estos callos finalmente desarrollan estructuras translúcidas en forma de oreja (TS) (b, g) antes de convertirse en callos embriogénicos (c, h) con estructuras embriogénicas características (ES). Luego, los callos embriogénicos se transfieren al medio II/condición II, donde forman embriones somáticos (SE) (d, i). Algunos de estos embriones germinan y se convierten en plántulas (e, j). Barras de escala para a-d y f = 1 mm; y para e y j = 1 cm. Fotografía tomada de Pérez-Núñez et al. (2006).

Pérez-Núñez et al. (2006) publicaron la primera mejora al protocolo publicado inicialmente. Hasta ese momento la eficiencia era de solo 4 a 10 embriones somáticos por plúmula dependiendo del método. Lo que hicieron los investigadores fue tomar dos enfoques diferentes: la embriogénesis somática secundaria y la multiplicación del callo embriogénico. Los embriones somáticos primarios obtenidos a partir de explantes de plúmula los utilizaron como explantes y formaron callos embriogénicos y embriones somáticos secundarios. Los callos embriogénicos obtenidos después de tres ciclos de multiplicación fueron capaces de producir embriones somáticos. La eficiencia del sistema se evaluó para las diferentes etapas del proceso. El rendimiento total calculado de una plúmula fue de 98,000 embriones somáticos. Comparando esto con el rendimiento obtenido a partir de la embriogénesis somática primaria, se obtiene un aumento de aproximadamente 50,000 veces. Cuando se le compara con el rendimiento obtenido usando brasinólidos, se obtiene un aumento de aproximadamente 10,000 veces en el

rendimiento. La calidad de los callos embriogénicos y de los embriones obtenidos se puede apreciar en la Figura 1.35.

A este punto la ES del cocotero ya ha avanzado de forma importante, sin embargo, aún existían limitaciones con respecto al número de embriones somáticos formados y su germinación. Para resolver este problema se empleó ácido giberélico (GA; 0.5 μM). Esta concentración de GA aumentó 1.5 veces el número de callos que formaban embriones somáticos y dos veces el número de embriones somáticos por callo, los callos con embriones en germinación y el número de embriones somáticos en germinación por callo. Un hecho muy importante que reportan los autores es que durante la formación de callos y embriones somáticos, algunos cultivos muestran un desarrollo anormal. Algunos de los callos no eran embriogénicos (NEC, Figura 1.36A), ya que no tenían las características distintivas de los callos embriogénicos y no formaban embriones somáticos. En el caso de los embriones, algunos estaban fusionados (Figura 1.36B) o presentaban pérdida de conformación (Figura 1.36C); ambos tipos no tenían capacidad para germinar (Montero-Cortés et al., 2010a).

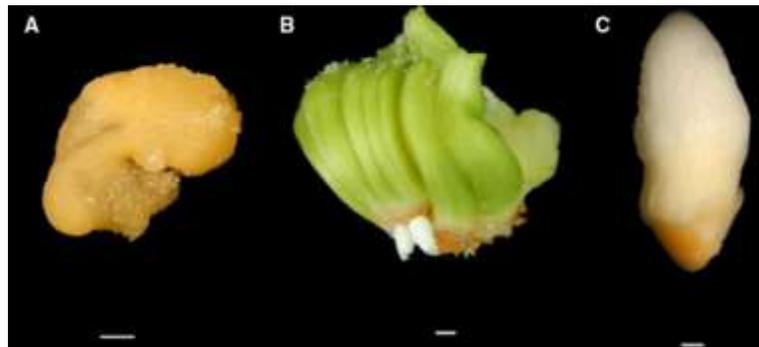


Figura 1.36. Callos y embriones somáticos que presentaban desviación del desarrollo normal.

Figura 1.36: Callo no embriogénico (A), embriones fusionados (B) y embrión aberrante (C). Barra 1 mm. Fotografía tomada de Montero-Cortés et al. (2010a).

El cultivo de tejidos del cocotero tiene una importante desventaja en relación con otros cultivos, se oxidan muy fácilmente. Esta oxidación deteriora muy rápidamente los callos y por lo tanto afecta la formación de embriones somáticos. Para tratar de evitar este problema Sáenz et al. (2010) introdujeron el uso del carbón activado. En este trabajo se estudiaron ocho tipos de carbón activado sobre el efecto que tenían sobre el nivel de 2,4-

D libre, el pH, la conductividad y osmolaridad del medio de cultivo y sobre la frecuencia de inducción de callos embriogénicos. Además, también estudiaron el efecto del tamaño de partícula del tipo de carbón óptimo en el desarrollo de los callos embriogénicos. Los autores determinaron que el tipo de carbón activado tuvo un efecto significativo en las propiedades del medio de cultivo empleado. El tipo de carbón activado también influyó en la inducción de los callos embriogénicos, ya que promovieron un 60% de callos embriogénicos, pero con diferentes concentraciones óptimas de 2,4-D. Los perfiles de tamaño de partículas variaron entre todos los tipos de carbón vegetal, aunque la fracción de partículas pequeñas (<38 μm) fue abundante en todas las ocho marcas de carbono empleadas. El uso de fracciones de partículas pequeñas produjo frecuencias más altas de callos embriogénicos (70%) que las fracciones de partículas grandes o de carbón vegetal completo. Esto último seguramente producida por el hecho de que partículas más pequeñas producen más superficie de contacto y por lo tanto adsorben más de los compuestos involucrados en la oxidación.

El uso de ionóforos, como el A23187 aumentan la eficiencia de la ES en *C. nucifera* (Rivera-Solís et al., 2018). La aplicación del ionóforo produjo un aumento significativo en el porcentaje de explantes que forman callo embriogénico. Con la concentración de ionóforo 1 μM hubo aumentos significativos en la formación de estructuras embriogénicas por callo (2,8 veces), de embriones somáticos por callo (1,5 veces) y también un mayor número absoluto (1,5 veces) de plántulas en desarrollo por callo (Figura 1.37). Los callos con embriones somáticos se subcultivaron en el medio 3 para la germinación de los embriones. Dentro de tres meses, los embriones en los dos tratamientos comenzaron a germinar y formar brotes (Figuras 1.38A, 1.38B). Luego, cuando los brotes se subcultivaron en el medio 4, en dos meses había cuatro plántulas en desarrollo por callo en el tratamiento testigo y seis en el tratamiento con el ionóforo A23187 1 μM . Los autores propusieron que si se combina el tratamiento del ionóforo A23187 con un proceso de multiplicación de callos embriogénicos, se podría producir un aumento potencialmente mayor en la eficiencia de la formación de embriones somáticos y plántulas de coco.

Además de los estudios ya mencionados para aumentar la producción de embriones somáticos de cocotero, se han explorado otras posibilidades, como la subdivisión de los callos embriogénicos (Azpeitia-Morales et al., 2009), el uso de otros tejidos como fuente del explante, como las anteras (Perera y Vidhanaarachchi, 2021; Perera et al., 2021; Perera et al., 2020b), o los ovarios (Perera et al., 2009; Perera et al., 2007). También se

ha intentado el uso de ABA para la maduración de los embriones somáticos (Fernando y Gamage, 2000).

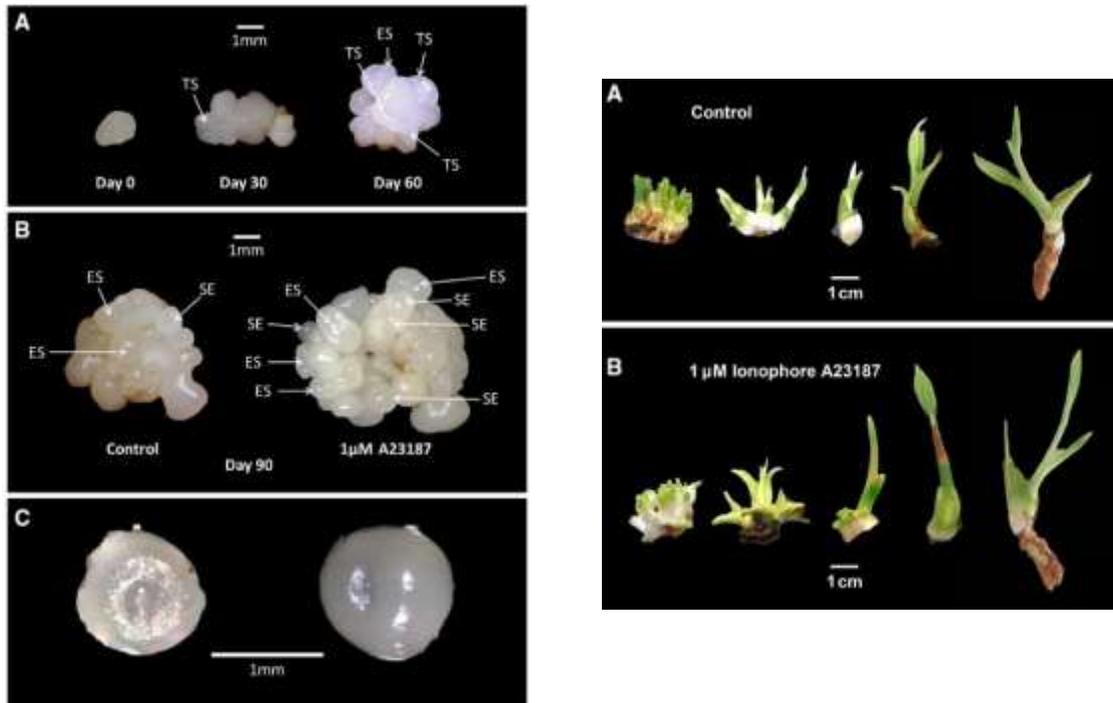


Figura 1.37. (lado izquierdo). Estadios de desarrollo durante la formación de callos embriogénicos a partir de explantes de estructuras embriogénicas.

Figura 1.37: (A) después de 30, 60 días; (B) callos embriogénicos completamente formados en el día 90 de cultivo sin (control) y con ionóforo A23187 1 µM; y (C) embriones somáticos globulares correspondientes. TS, estructuras translúcidas, ES, estructuras embriogénicas, SE, embriones somáticos. Figura tomada de Rivera-Solís et al. (2018).

Figura 1.38. (lado derecho). Desarrollo posgerminativo dentro de los dos meses de cultivo en medio (4) sin ionóforo.

Figura 1.38: (A) Los tejidos se cultivaron previamente en medio sin ionóforo. (B) Los tejidos se cultivaron previamente en medio 1 (inducción de callos) y medio 2 (formación de embriones) que contenía ionóforo A23187 1 µM, y medio 3 sin ionóforo (germinación de embriones). Figura tomada de Rivera-Solis et al. (2018).

Otro de los aspectos que central cuando se usa como herramienta el CTV son los estudios histológicos. El grupo del CICY ha sido pionero en este tipo de estudios y también por la calidad del material publicado. Por ejemplo, Desde la primera publicación del grupo en 1998, se incluyeron excelentes fotografías sobre la histología del proceso de

ES (Figuras 1.33b, 1.33d, 1.33e y 1.33f) (Chan et al., 1998). El efecto de la subdivisión del callo embriogénico en el aumento de la producción de embriones somáticos se documentó también espléndidamente desde el punto de vista histológico como se puede apreciar en la Figura 1.39.

Haciendo un resumen de los trabajos publicados hasta el día de hoy por los diferentes grupos de investigación que se dedican al trabajo de la inducción de la embriogénesis somática del cocotero podemos decir que se tiene un proceso que permite la producción de plantas a partir de embriones somáticos (Figuras 1.40 y 1.41). El proceso requiere de mejoras importantes para que se pueda utilizar en forma comercial. Por ello estos grupos han estado trabajando en la parte más básica del proceso. Seguramente estos estudios (que se describen a continuación) conducirán a un proceso embriogénico más eficiente para el cocotero.

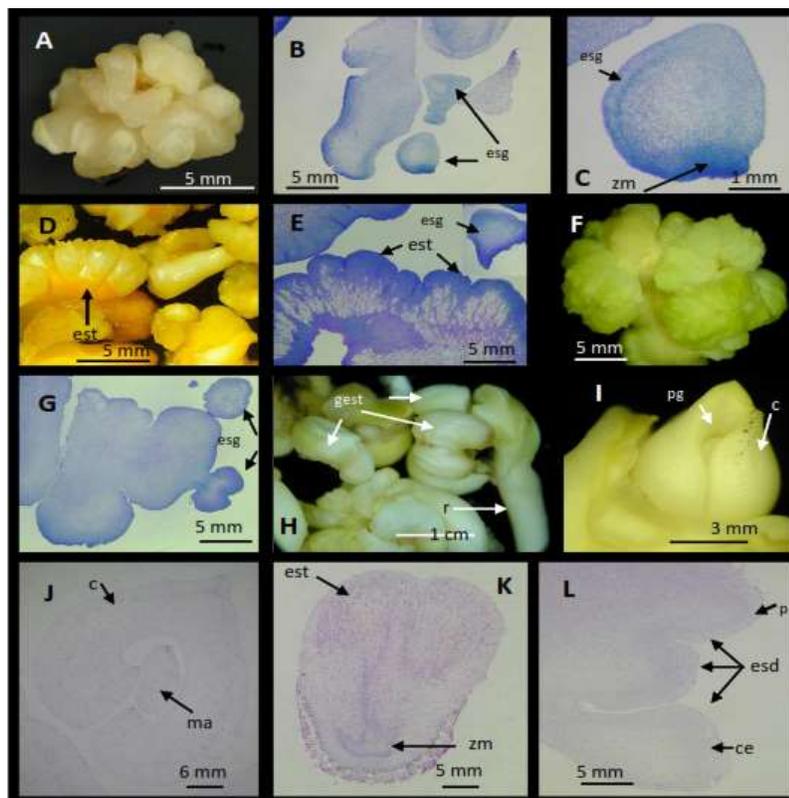


Figura 1.39. Formación de embriones somáticos (ES) a los 15 y 30 días de cultivo en callos embriogénicos (CE) y en subdivisiones de callos embriogénicos (SCE).

Figura 1.39: En A se presenta un CE a los 15 días de cultivo e histología del CE en B, observándose ES globulares (esg) y en C una zona meristemática (zm) de un ES donde se origina la raíz. En D se muestra un grupo de ES torpedo

(est) originados de SCE a los 15 días de cultivo, los cuales se observan sincronizados y en el corte histológico se observan ES tipo torpedo (est) elongados y fusionados (E) así como ES globulares (esg) observados en menor cantidad. En F se muestra el CE a los 30 días de cultivo y en G el corte histológico mostrando ES globulares (esg). En H se presentan grupos de ES tipo torpedo en SCE a los 30 días de cultivo. En algunos casos fue visible la raíz (r), un poro germinativo (pg) y coleótilo (c) (l). En J se observa un corte histológico de un ES con meristemo apical (ma). En la Figura K se muestra un corte histológico de un ES tipo torpedo (est) a los 30 días, observándose solamente la zm donde se origina la raíz. Por último, en L se presenta un grupo de ES en desdiferenciación (esd) y una zona de células. Fotografía tomada de Azpeitia-Morales et al., (2003).

Desde luego otros grupos también han estado realizando estudios histológicos, entre ellos destaca el de Lakshmi Jayaraj et al. (Lakshmi Jayaraj et al., 2016). Este grupo llevó a cabo un estudio histológico muy detallado en diferentes etapas del cultivo de las plúmulas. Los autores determinaron que no hay crecimiento apreciable en cultivos de 15 días de antigüedad. Después de 30 días, se pudieron identificar las células meristemáticas. A los 45 días se observó abundancia de células meristemáticas, principalmente para el desarrollo de callos. Después de 75 días, se formaron callos friables con estructuras globulares y los estudios histológicos revelaron la presencia de centros meristemáticos que eventualmente formaron embriones somáticos. El estudio histológico de embriones somáticos maduros formados después de 120 días de iniciación del callo mostró una clara zona meristemática de células parenquimáticas, rodeada de haces vasculares (Figuras 1.42 y 1.43). Los estudios histológicos, realizados para ciertas anomalías como callos compactos, embrioides somáticos anormales con brotes rudimentarios y raíces, revelaron la presencia de hojas cotiledonares intactas que parecían inhibir el desarrollo del meristemo apical de los embrioides somáticos (Figura 1.44). La presencia de haces vasculares en los primeros estadios de la formación de callos podría conducir a la formación directa de meristemoides.

Si los estudios histológicos son importantes en el CTV, cuando la fuente de los explantes con las anteras, estos estudios lo son aún más. En el caso de cocotero se acaba de publicar un estudio sobre la histología de la ES a partir de anteras (Perera et al., 2020b), Los autores determinaron identificaron eventos secuenciales de diferenciación, incluida la formación de hebras provasculares seguidas de un haz vascular, la diferenciación en el punto de crecimiento, que dio lugar a los embriones secundarios y la polarización en los brotes y raíces (Figura 1.45). Los embriones romos estaban desprovistos de cualquier

signo morfológico de brotación, mostraron una disposición celular diferente, como una estructura haustorial sin ningún punto meristemático (47%), estructuras bipolares con meristemos de tallo y raíz (8%) y unipolar con cualquiera de los polos (45%) (Figura 1.46). La gruesa cubierta haustorial condujo a la inactividad física que inhibe un mayor desarrollo de las estructuras polares. Los embriones en germinación, que contenían un solo brote, dieron lugar a las plantas sanas donde, como brotes dobles, múltiples o fusionados, formaron las plántulas.

1.6.1. Estudios básicos en la embriogénesis somática en cocotero

Para que se puedan llevar a cabo todo tipo de estudios que ayuden a comprender el proceso de inducción de la ES, se requiere antes que nada del proceso embriogénico. De otra manera nunca se estará seguro de si los datos obtenidos son causa o efecto de lo que se está estudiando. Por ello los estudios celulares, bioquímicos y moleculares sobre la ES del cocotero se iniciaron tarde y han sido muy pocos, en comparación con otros sistemas de ES.

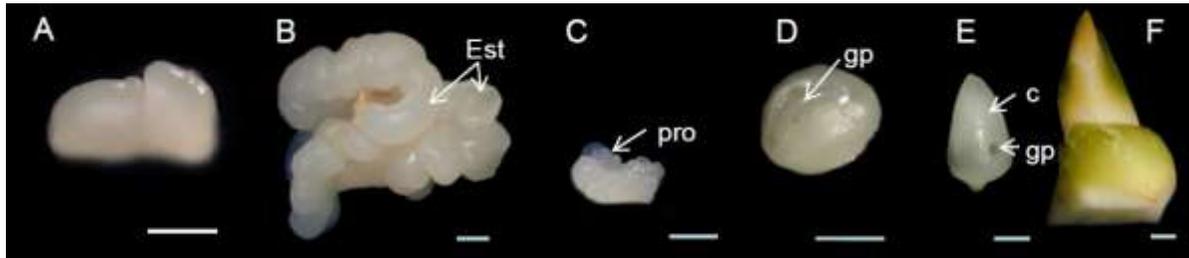


Figura 1.40. Estructura embriogénica derivada de callo embriogénico usado como explante.

Figura 1.40: (A), desarrollo de callo embriogénico (B) después de 90 días de cultivo en medio I. Después de transferencia de callos embriogénicos a medio II, callos con embriones somáticos a diferentes etapas ocurrieron. Piezas de callos con pro-embriones (C), embrión globular (D), embrión coleoptilar (E) y germinación de embrión (F). Bar= 1 mm. Coleóptilo [c], poro germinativo: [gp], pro-embrión [pro]. Figura tomada de Solís-Ramos et al., (2012).

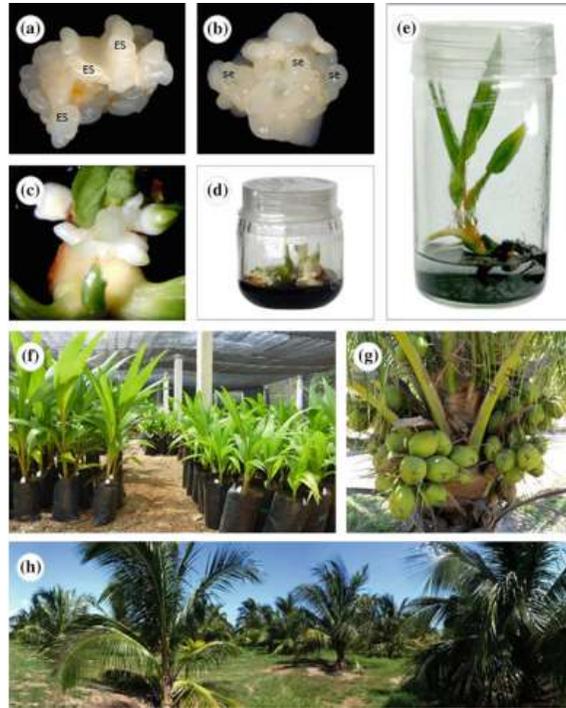


Figura 1.41. Propagación clonal de la palma de coco a través de la embriogénesis somática.

Figura 1.41: Callo embriogénico (a), callo con embriones somáticos (b), callo con embriones en germinación (c), brotes de embriones en germinación (d), plántulas *in vitro* (e), plántulas en vivero (f), cocotero clonal con frutos (g), cocoteros clonales en el campo (h). ES Estructuras embriogénicas; se embriones somáticos. Figura tomada de Sáenz-Carbonell et al., (2016).

Uno de los primeros estudios que se llevó a cabo fue la determinación del contenido de aminoácidos libres en callos sometidos a la inducción de la ES y callos en condiciones de multiplicación (Magnaval et al., 1995). Los autores determinaron que se forman principalmente dos grupos dependiendo de su morfología, y ésta se relaciona con su contenido de aminoácidos. Los callos en el medio de multiplicación fueron significativamente diferentes de los callos en el medio de inducción, caracterizados por una caída en los contenidos de prolina, valina y serina. Esta caída fue una reacción inicial al aumento de las concentraciones de 2,4-D y elementos minerales en los medios para iniciar la embriogénesis de tipo unicelular. El otro grupo tiende hacia la embriogénesis y se caracterizó por aumentos en los contenidos de prolina, valina y leucina y un contenido de alanina sin cambios; estos aumentos fueron concomitantes con la formación de

proteínas de almacenamiento observadas histológicamente en el momento del inicio de la embriogénesis.

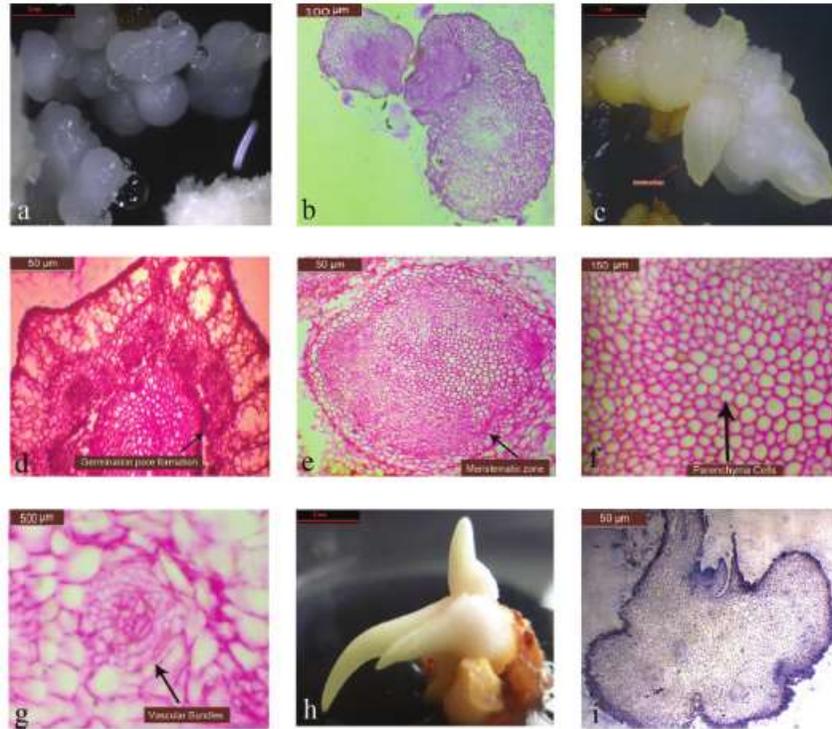


Figura 1.42. Análisis histológico de diferentes estadios de la de la calogénesis.

Figura 1.42: (a) Plúmula fresca extraída del embrión; (b) Plúmula que muestra el meristemo del brote y dos hojas plumulares; (c) Abultamiento morfológico observado después de 15 días de la inoculación; (d) Hoja plumular formando un anillo alrededor del meristemo del brote; (e) Iniciación del callo observada después de 30 días; (f) Células meristemáticas en división activa; (g) Proliferación celular observada después de 45 días; (h) Centros meristemáticos en la periferia (i) Células meristemáticas con citoplasma densamente teñido y núcleo visible; (j) Células ricas en polisacáridos que muestran una alta actividad metabólica; (k) Formación de callos después de 60 días; (l) Callo con centros meristemáticos densamente teñidos; (m) Sección transversal que muestra nódulos meristemáticos; (n) Callos globulares formados después de 75 días; (o) Sección transversal que muestra la formación de callos globulares. Fotografía tomada de Lakshmi Jayaraj et al. (2016)

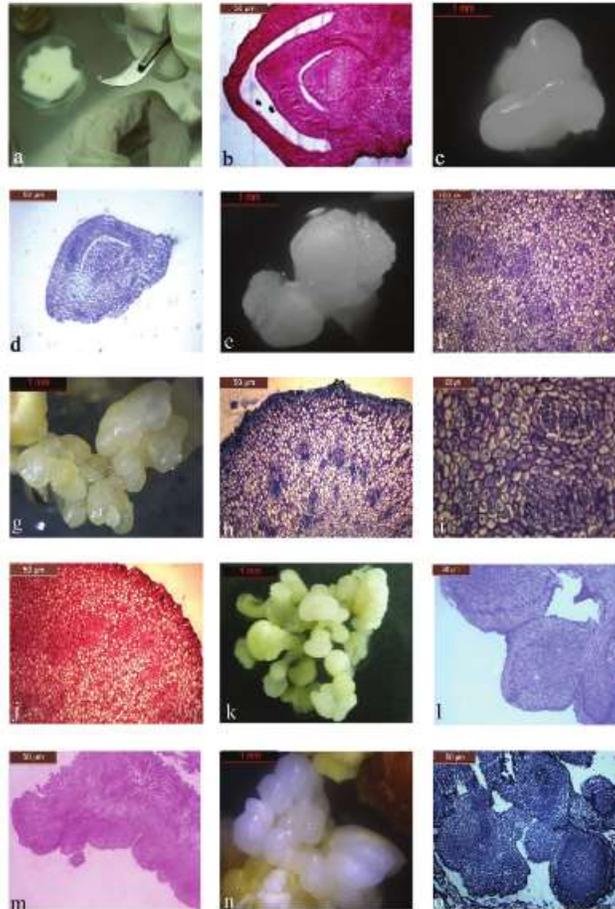


Figura 1.43. Análisis histológico de los diferentes estadios de la embriogénesis somática.

Figura 1.44: (a) Proembriones de forma globular; (b) Sección transversal de proembriones; (c) Proembrión en forma de torpedo blanco translúcido; (d) Formación de poros de germinación dentro del embrión somático maduro; (e) Zona meristemática bien definida dentro del embrión somático; (f) Capa interna de células de parénquima; (g) Sección transversal que muestra la formación de haces vasculares dentro del embrión somático diferenciado; (h) Embrión somático diferenciado que forma más de una hoja plumular; (i) Sección transversal que muestra el meristemo del brote con el meristemo de la hoja y la raíz plumular. Fotografía tomada de Lakshmi Jayaraj et al. (2016).

Desde hace un poco más de 20 años el grupo del CICY ha estado contribuyendo al conocimiento bioquímico y molecular de la ES del cocotero. La primer contribución en este aspecto fue sobre el mecanismo de transducción de señales durante la inducción de la ES del cocotero (Islas-Flores et al., 2000). En este trabajo se investigó la presencia de tirosina quinasa y proteínas fosforiladas en tirosina en tejidos de coco cultivados in vitro. Se detectaron bandas de proteínas fosforiladas con masas moleculares que oscilaban

entre 170 y 27 kDa. La mayor respuesta la exhibieron los callos formados a partir de las plúmulas. La inmunodetección específica se corroboró incubando las membranas con anticuerpo antifosfotirosina en presencia de fosfotirosina 1 mM. El análisis de los fosfoaminoácidos en hidrolizados de una proteína de 41 kDa marcada con [³²P] mostró la presencia de [³²P]-tirosina y [³²P]-treonina. La evaluación de la actividad de la tirosina quinasa en estos tejidos mostró que la actividad era más alta en el callo proveniente de plúmula y el explante inicial, mientras que en otros tejidos, la actividad de la tirosina quinasa disminuyó a valores cercanos a cero. La genisteína, un inhibidor específico de la tirosina quinasa, disminuyó la capacidad de los extractos solubles de tejidos de coco cultivados *in vitro* para incorporar ³²P (Islas-Flores et al., 2000).

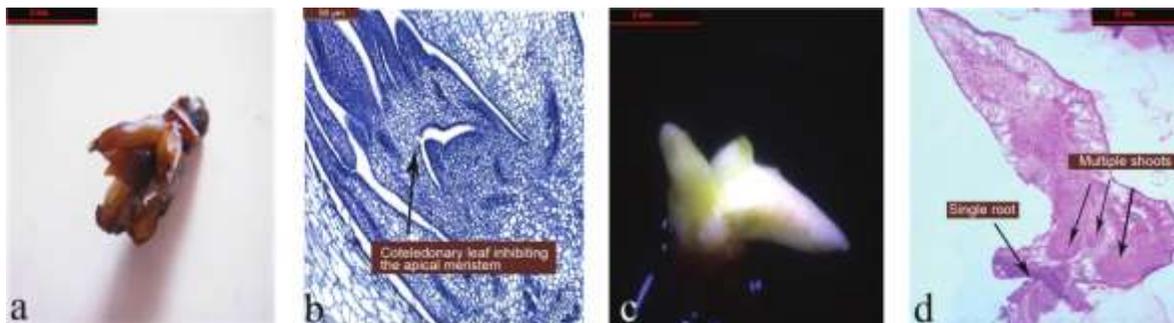


Figura 1.44. Análisis histológico de las anomalías observadas.

Figura 1.44: (a) Embrión somático aberrante; (b) Hoja cotiledónea intacta que inhibe el desarrollo del meristemo apical; (c) Embrión somático con múltiples brotes; (d) Sección transversal de un meristemoide con múltiples brotes y una sola raíz. Fotografía tomada de Lakshmi Jayaraj et al. (2016).

La búsqueda de marcadores que indiquen, o por lo menos que sugieran el potencial embriogénico de un tejido ha sido constante desde mediados de los años 80' del siglo pasado. Desde luego este también ha sido el caso del cocotero. Entre los candidatos más mencionados se tiene a los genes de la familia *SERK*. En cocotero, Pérez-Núñez et al. (2009) mostraron la aparición de un ortólogo de *SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-like KINASE* (*SERK*)¹ denominado *CnSERK*. El análisis de su expresión mostró que podía detectarse en tejidos embriogénicos antes de que pudiera observarse el desarrollo del embrión. Por el contrario, no se detectó o se detectó en niveles más bajos en tejidos no embriogénicos, lo que sugiere que la expresión de *CnSERK* pudiera estar

¹Se optó por dejar los nombres de los genes en inglés para que tengan congruencia con sus acrónimos y en las búsquedas en las bases de datos internacionales.

asociada con la inducción de la ES y que podría ser un marcador potencial de células competentes para formar embriones somáticos en tejidos de coco cultivados *in vitro* (Pérez-Núñez et al., 2009).

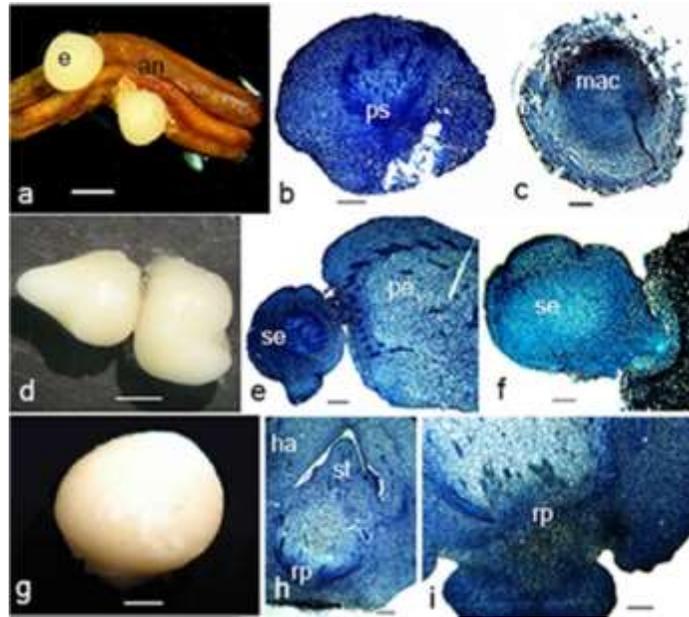


Figura 1.45. Aspectos morfológicos (a, d, g, j, m, p) e histológicos (otras figuras) de los embriones derivados de anteras de *Cocos nucifera*.

Figura 1.45: a–c Embriones inmaduros (e) derivados de una antera (an); (a), las células meristémicamente activas (mac) en la parte media del embrión que indican la iniciación y diferenciación del embrión (b), formación de hebras provasculares (ps) y la zona M en el embrión en desarrollo (c) en medio de inducción (barra a = 1,43 mm; b = 429 μ m; c = 250 μ m. d–f Embrionogénesis secundaria a partir de un embrión primario (pe), célula provascular (pv) diferenciación en medio de maduración (barra d = 3 mm; e = 300 μ m; f = 214 μ m) g–i Embriones romos no convertidos sin ningún signo de desarrollo del brote, un embrión bipolar completo con brote (st) y polo radicular (rp) encerrado en el haustorio (ha) un embrión incompleto que encierra el brote en desarrollo (barra g = 1,6 mm; h = 714 μ m; i = 727 μ m). Figura tomada de Perera et al. (2020b).

Otro gen que se ha detectado que se expresa durante la inducción de la ES es el gen de la *CYCLIN-DEPENDENT KINASE (CDKA)* (Montero-Cortés et al., 2010b). Este gen está ligado al control celular. La expresión del gen putativo *CnCDKA* aumentó constantemente durante la fase de formación del callo embriogénico cuando se alcanza la competencia embriogénica. La hibridación *in situ* especificó que la localización de los transcritos estaba principalmente en unas pocas capas celulares dentro de los centros meristémicos en los callos embriogénicos en cultivos de 90 días (Figura 1.47). El análisis de la expresión de

CnCDKA en diferentes estadios de la formación de embriones somáticos mostró que la expresión disminuyó progresivamente con la expresión más baja en embriones somáticos que inician su germinación (Montero-Cortés et al., 2010b).

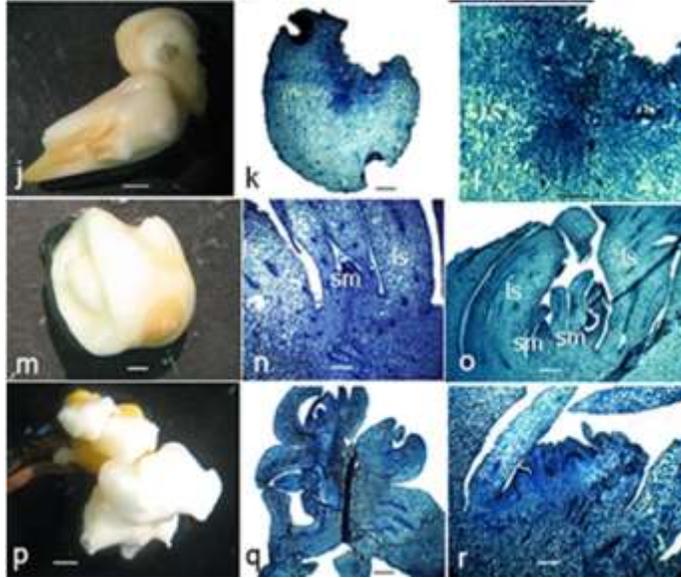


Figura 1.46. Aspectos morfológicos (a, d, g, j, m, p) e histológicos (otras figuras) de los embriones derivados de anteras de *Cocos nucifera*. Segunda parte.

Figura 1.46: j–l Embriones maduros con punto de germinación. Ver la depresión formada en el haustorio, Sección longitudinal a través del punto de germinación, Vista cercana del punto de germinación. Obsérvese el meristemo diferenciado del brote en el haustorio (barra j = 3 mm; k = 333 μ m; l = 250 μ m). m–o Conversión de embriones. Desarrollo de brotes normales con un meristemo de un solo brote (sm) y brotes dobles encerrados por las vainas de las hojas de lanza (Ls) (barra m = 1 mm; n = 833 μ m; o = 555 μ m). p–r Desarrollo de múltiples brotes, nótese la diferenciación de tres meristemos de brotes visibles dentro de las vainas de las hojas de lanza. Desarrollo de brotes fusionados. Tres brotes individuales están fusionados por el tejido haustorial central (barra p = 2 mm; q = 1,05 mm; r = 625 μ m). Figura tomada de Perera et al. (2020b).

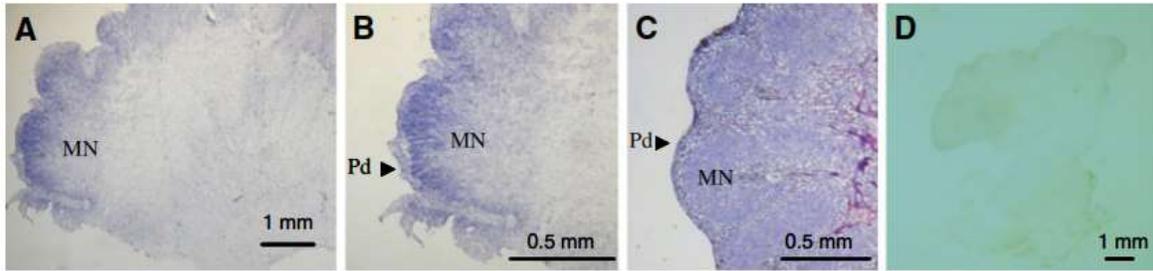


Figura 1.47. Localización de los transcritos de *CnCDKA* por hibridación *in situ* en callos embriogénicos.

Figura 1.47: Las secciones se probaron utilizando sondas antisentido de ARN (A, B). A. Descripción general de los callos embriogénicos en un cultivo de 90 días que muestra una señal específica elevada con la sonda *CnCDKA* antisentido. B. Un mayor aumento muestra las zonas con una señal *CnCDKA* más elevada. C. Callo embriogénico teñido con azul-negro de naftol y ácido peryódico de Schiff que muestra células densamente teñidas. D. Callo embriogénico hibridado con una sonda sentido como testigo negativo. MN, nódulos meristemáticos, Pd, protodermis. Fotografía tomada de Montero-cortés et al. (2010b).

Otro de los genes que se menciona en las publicaciones sobre ES es a los genes de la familia *KNOX*. En cocotero se obtuvieron las secuencias completas de dos genes *KNOX*-like para *CnKNOX1* y *CnKNOX2*. La expresión de *CnKNOX1* se detectó durante todo el proceso de embriogénesis, excepto en los embriones somáticos en el estadio proglobular, y fue más elevada en los embriones somáticos en la etapa coleoptilar. No se detectó la expresión de *CnKNOX1* en callos con embriones aberrantes. La adición de AG estimuló la expresión de *CnKNOX1* antes y la expresión relativa en todas las etapas fue mayor. La expresión de *CnKNOX2* se produjo en todos los estadios con un pico en la etapa globular, y el tratamiento con AG disminuyó su expresión (Montero-Cortés et al., 2010a).

Otro aspecto muy importante que se ha empezado a estudiar es el papel que puede tener la epigenética en la inducción de la ES. Está bien establecido que los mecanismos epigenéticos son reguladores de los programas de diferenciación celular (Duarte-Aké et al., 2019). Osorio-Montalvo et al. (2020) evaluaron los cambios morfogénéticos, la metilación global del ADN y los perfiles de expresión de los genes relacionados con la ES, así como las ADN metiltransferasas durante el proceso de ES, con y en la presencia de 5-azacitidina (AzaC). Sus resultados muestran que tres días de pretratamiento con 15 μM y 20 μM de AzaC aumentaron significativamente la formación temprana de embriones somáticos (cuatro y diez veces, respectivamente). Se determinó un pico claro del

porcentaje global de metilación del ADN (aproximadamente 13%) al comienzo del cultivo, seguido de una etapa de restablecimiento y un aumento constante a partir de entonces. En todos los casos, los niveles de metilación del ADN fueron menores después de los pretratamientos con AzaC. Además, la expresión de los genes *SERK*, *WUSCHEL (WUS)*, *BABBY BOOM (BBM)* y *LEAFY COTYLEDON 1 (LEC)* se modula durante el proceso de ES y los pretratamientos con AzaC afectan sus perfiles de expresión, incluso en estadios tempranos. Además, se observaron mayores niveles de expresión en los genes que codifican las metiltransferasas de ADN (*MET*, *CMT* y *DRM*) en los estadios tempranos y tardíos de la ES, lo que sugiere que la metilación del ADN es un factor importante en la ES.

La inducción de la ES es un proceso complejo, con múltiples autores (Figura 1.48). Si bien el énfasis se ha puesto en la concentración de una auxina exógena, 2,4-D en el caso del cocotero falta mucha más información de su efecto. Por ejemplo, en el caso del cocotero no se ha documentado que hace el 2,4-D cuando entra en el tejido, lo cual hace de forma activa utilizando energía. Es importante saber cómo es su acción dentro del tejido porque se ha documentado que las auxinas exógenas provocan un aumento en la concentración del AIA y de sus conjugados (Ayil-Gutiérrez et al., 2013). A su vez un cambio en la concentración del AIA conduce a un cambio en la concentración de las citosinas, ya que ambas se regulan mutuamente (Großkinsky y Petrášek, 2019; Skalicky et al., 2018; Chandler y Werr, 2015; Schaller et al., 2015). Otro aspecto que no se ha estudiado en la inducción de la ES del cocotero es el efecto de la fuente de nitrógeno. Es claro que la fuente de nitrógeno modifica la respuesta embriogénica en diferentes especies.

El efecto de las auxinas es mediado por su receptor en el núcleo TIR1/AFB (Gallei et al., 2020; Powers y Strader, 2019; Leyser, 2018). El cual desencadena la expresión de los genes responsivos a auxinas. No sabemos si el 2,4-D es aceptado por el receptor y ejerce su acción directamente o través de un aumento en la síntesis de AIA. Una vez que los genes responsivos a auxina son liberados de sus represores por la acción de las auxinas, se genera una cadena de señales que llevan a una segunda ola de expresión génica. En esta según ola se incluyen varios genes que están involucrados en la homeostasis de las auxinas, como los GH3, del GA como la GA3 oxidasa, cuya formación o degradación de productos lleva a la respuesta fisiológica, en este caso la emergencia de los embriones somáticos, a su desarrollo y a su maduración (Figura 1.48).

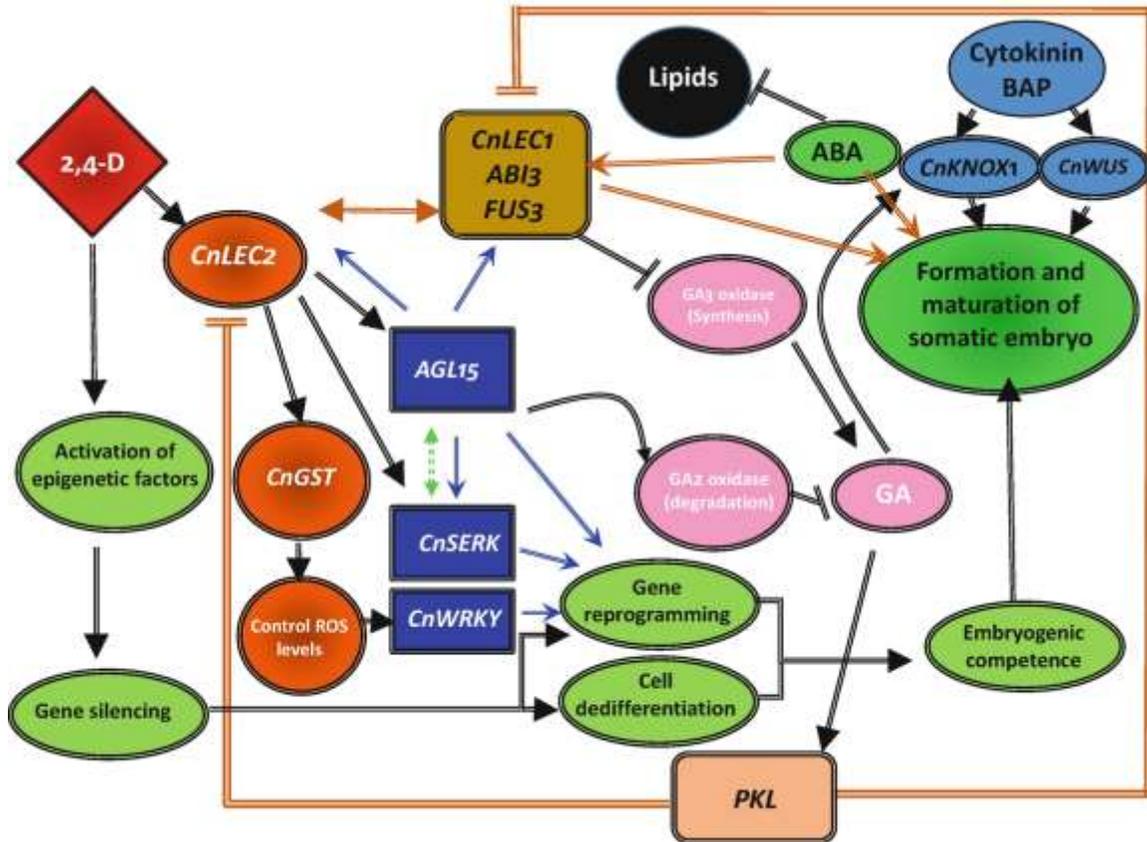


Figura 1.48. Control por reguladores del crecimiento vegetal de la expresión génica durante la embriogénesis somática del cocotero.

Los genes aislados del cocotero tienen el prefijo *Cn*. Ácido abscísico (ABA), Insensible al ácido abscísico 3 (ABI3), Agamous-Like 15 (AGL15), 6-benciladenina (BA), ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), giberelinas (GA), *LEAFY COTYLEDON 1* (*LEC1*) y *LEAFY COTYLEDON 2* (*LEC2*). Figura modificada de Sáenz-Carbonell et al. (2020).

En resumen, hasta la actualidad se han hecho avances muy importantes en el estudio de la inducción de la ES del cocotero, incluso se están produciendo comercialmente aunque de manera limitada. Para una mayor información sobre el tema, además de la bibliografía mencionada en este trabajo se pueden consultar las revisiones que se han publicado a la fecha sobre el tema (Kalaipandian et al., 2021; Rajesh et al., 2018a; Adkins et al., 2016; Sáenz-Carbonell et al., 2016; Nguyen et al., 2015; Solís-Ramos et al., 2012; Vendeil y Buffard-Morel, 1995; Ashburner y James, 1994).

Justificación

El mejor método para producir una gran cantidad de embriones es el uso de suspensiones celulares. En el caso del cocotero ha habido dos intentos para producir suspensiones celulares con el fin de obtener embriones somáticos. El primer intento por Basu et al. (1988) utilizaron explantes de hoja. Entre los factores que detectaron que modificaba el crecimiento del cultivo fueron el pH, el glutatión y la espermidina produjeron un pequeño aumento en el número de células. Más recientemente se publicó otro intento para producir suspensiones celulares para la obtención de embriones cigóticos (Bhavyashree et al., 2016). Estos autores pudieron producir una suspensión que crece alrededor de tres veces, medida como incremento en el paquete de volumen celular. Sin embargo, los callos de los que partieron eran poco friables por lo que la calidad de la suspensión celular obtenida fue de muy mala calidad y el cultivo no prosperó. Por ello en esta investigación se buscó establecer una suspensión celular de cocotero que sea embriogénica o potencialmente embriogénica, con el fin de hacer más eficiente el protocolo de embriogénesis somática.

Objetivos

Objetivo general

Establecer y evaluar la dinámica del crecimiento *in vitro* de una suspensión celular potencialmente embriogénica de *Cocos nucifera* L.

Objetivos específicos

- Estandarización de un protocolo para la obtención de callos friables de *Cocos nucifera* L.
- Establecimiento de línea de suspensión celular de *Cocos nucifera* L.
- Caracterización morfológica de los callos y suspensiones celulares de *Cocos nucifera* L.

Estrategia experimental

Como primer paso se pretende realizar el establecimiento de suspensiones celulares de cocotero, realizando diversas modificaciones en las técnicas y los compuestos que se

utilizan en el medio basal, así como la adición de diversos reguladores del crecimiento que nos ayuden a establecer este tipo de cultivos. Una vez establecido el cultivo se llevarán a cabo los procedimientos para la medida del crecimiento de las suspensiones celulares (Figuras 1.49, 1.50 y 1.51).

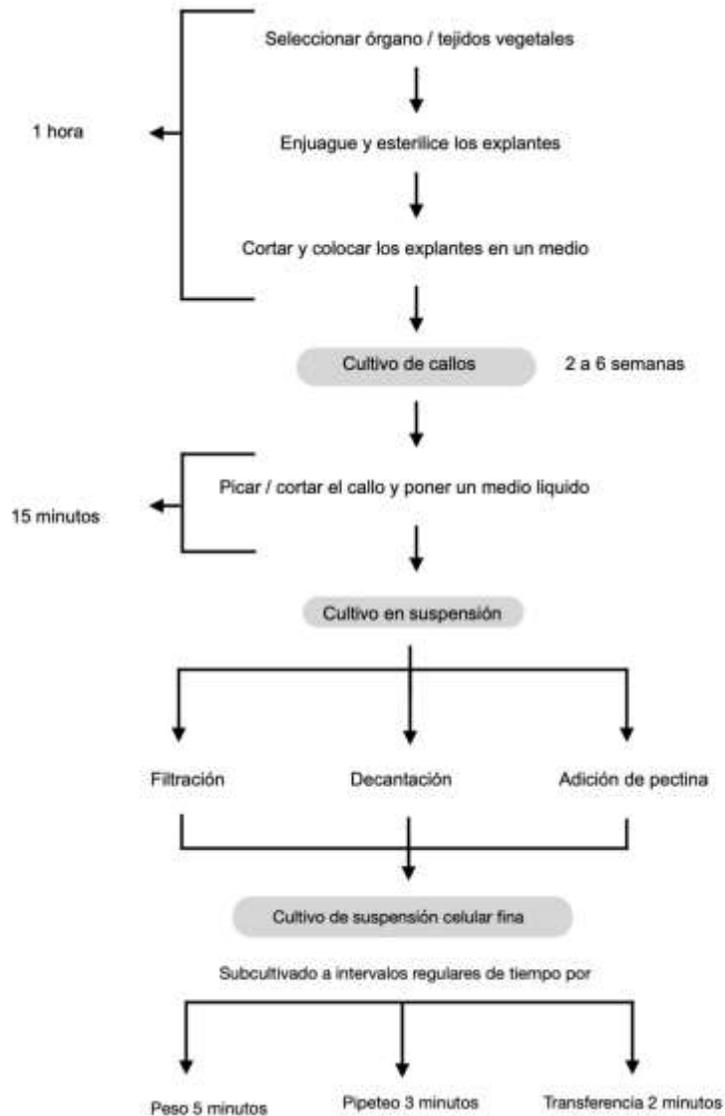


Figura 1.49. Esquema general de iniciación y mantenimiento de una suspensión celular.

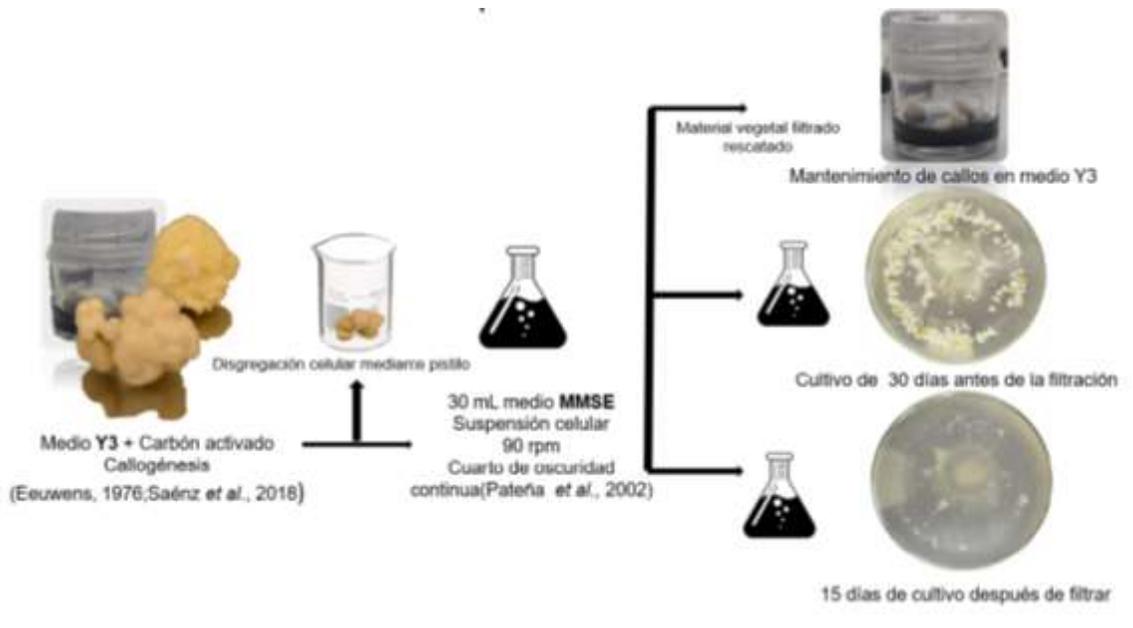


Figura 1.50. Esquema del procedimiento de iniciación y mantenimiento de cultivos en suspensión celular para *Cocos nucifera*.

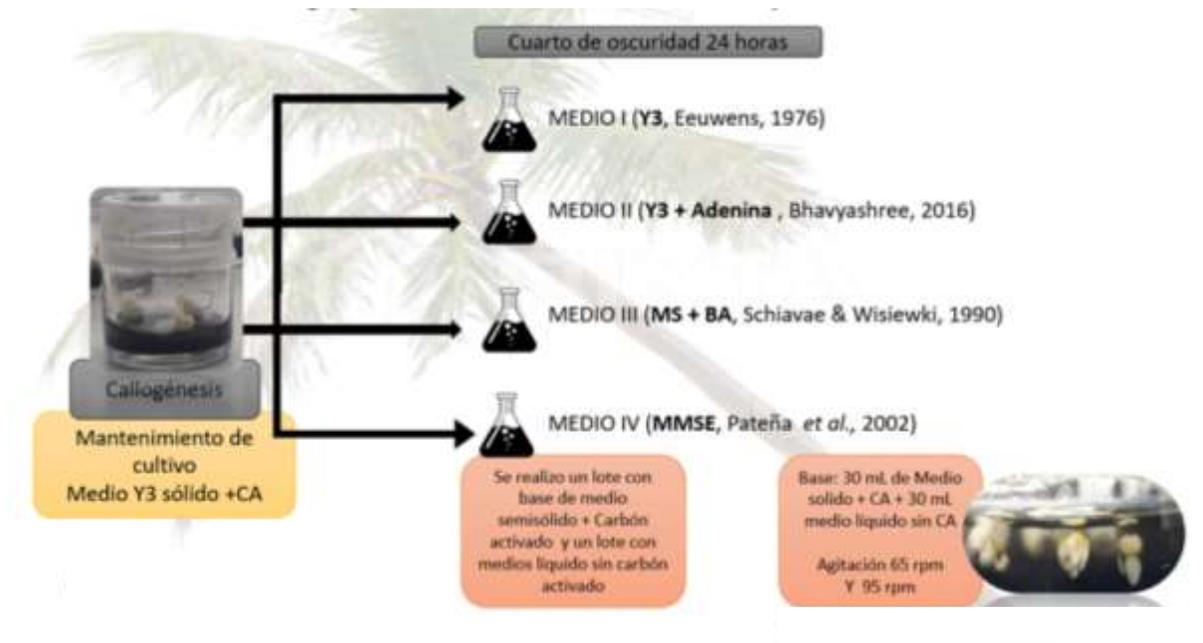


Figura 1.51. Estrategia para selección de medio de la suspensión celular.

Redibujado de Sáenz et al. (Sáenz et al., 2018). Fotografías de Rosa M. Galaz-Ávalos.

CAPÍTULO II

Materiales y Métodos

2.1. Introducción

La inducción de callos es necesaria, como primer paso, en muchos experimentos de cultivo de tejidos. El callo se produce cuando la respuesta inicial de los tejidos a una herida es seguida por la adición externa de RCV en un medio aséptico para mantener la respuesta de división celular rápida y sostenerla indefinidamente (Hall, 1991a). La formación de callos a partir de un explante implica el desarrollo de planos de división celular progresivamente más aleatorios, especialización menos frecuente de las células y pérdida de estructuras organizadas (Wagley et al., 1987; Thorpe, 1980).

Los callos se pueden obtener de casi cualquier parte de la planta. Sin embargo, hay que tener en cuenta que diferentes factores pueden influir en la inducción de los callos. Estos factores incluyen la edad fisiológica u ontogénica del órgano o tejido que servirá como fuente de explante; las condiciones ambientales en las que se cultiva la planta antes de tomar el explante; la organización de las células y el tamaño y ubicación del explante en la planta. Otra consideración a tener en cuenta es el objetivo final del cultivo celular (Smith, 1992) y el hecho de que no todas las células del explante producen callo.

La fuente del explante primario puede ser una plántula proveniente de una semilla recién germinada asépticamente o raíces, tallos, hojas o estructuras reproductivas esterilizadas en la superficie. El nivel y el tipo de RCV de las plantas, así como el medio de cultivo, son los principales factores que controlan la formación de callos. Las condiciones de cultivo también son importantes en la formación y desarrollo de callos, así como el nivel de gases dentro del matraz o recipiente.

Para el subcultivo de los callos, se deben transferir al nuevo medio de cultivo pequeñas porciones de callos friables, normalmente de 0.2 a 0.5 g, para tener callos frescos. Los callos se pueden utilizar como fuente de material para estudios bioquímicos y moleculares y para producir SC, protoplastos, organogénesis, embriones somáticos y metabolitos secundarios (Smith, 1992; Hall, 1991a). Los cultivos de callos normalmente se mantienen

en cámaras de crecimiento bajo condiciones de luz controladas, las cuales deben establecerse para cada especie y genotipo. Además, para la mayoría de las especies, los cultivos de callos deben mantenerse a una temperatura de 25 °C. Los cultivos de callos se subcultivan en estas condiciones cada 2-6 semanas dependiendo de la tasa de crecimiento (Collin y Edwards, 1998).

Las SC constan de una población de células individuales y grupos suspendidos de un solo callo, en frascos con medio nutritivo líquido (Hall, 1991b). A continuación, los matraces se colocan en un agitador con agitación constante para proporcionar aireación a las células (Morris y Fowler, 1981; Street, 1977; Gemborg et al., 1968). A medida que se forman nuevas células, se dispersan en el medio líquido y se convierten en grupos y agregados (Morris y Fowler, 1981). En general, las SC exhiben tasas de crecimiento mucho más elevadas que los cultivos de callos. Las SC se utilizan cuando se requiere una división celular rápida o una aplicación de tratamiento más uniforme, como durante los procedimientos de selección de células. Las SC se pueden mantener transfiriendo una pequeña porción del cultivo a un medio nuevo.

Las SC constituyen un sistema que permite realizar estudios sobre el ciclo celular, fisiológico y bioquímico de las células, sirven también para la obtención de la producción de metabolitos secundarios (Brzycki et al., 2021; Popova et al., 2021; Mohanlall, 2020), así como para el aislamiento de mutantes y la ES (Sinha et al., 2018; Moscatiello et al., 2013). Las SC consisten de células libres y agregados celulares distribuidos en un medio líquido en movimiento (Szabados et al., 1993). Se ha descrito que una elevada actividad de división celular en callo friable es el mejor inóculo para la iniciación de SC (King, 1984).

Para lograr un buen establecimiento de SC, existen diversos factores que se deben considerar y que influyen en el crecimiento de las células. Entre los más importantes están la composición del medio de cultivo, el tipo de explante, su origen, la cantidad de inóculo, la combinación de RCV, las condiciones de incubación del cultivo, entre otros factores (Galaz-Ávalos et al., 2012).

El uso de SC para la producción de embriones somáticos poseen ventajas sobre otros sistemas; proveen de un elevado potencial para la producción de embriones somáticos a gran escala y una selección más rigurosa en los protocolos de transformación genética (Burns y Wetzstein, 1997). También tienen el potencial de poderse sincronizar y producir embriones somáticos de forman más uniforme (Fujimura y Komamine, 1979). Las SC son

un sistema que brinda grandes ventajas para estudios bioquímicos y celulares. Su uso permitió evaluar la única mutante que se ha obtenido hasta ahora, una mutante temperatura sensible de zanahoria (De Jong et al., 1995; Lo Schiavo et al., 1990; Lo Schiavo et al., 1988).

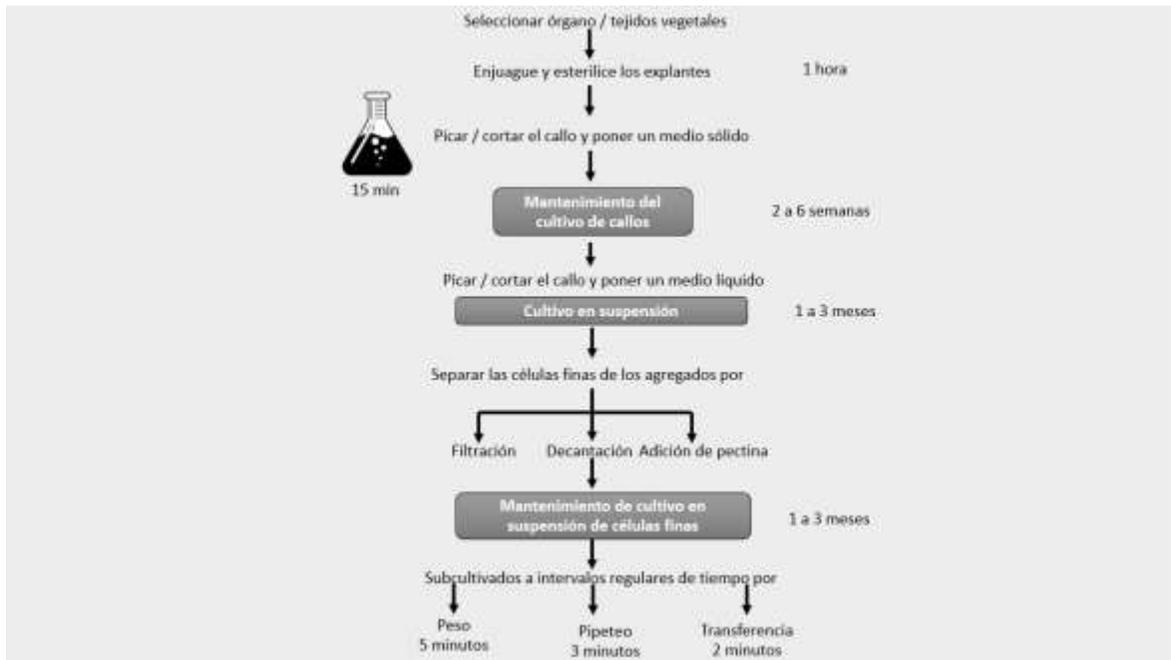


Figura 2.1. Esquema del procedimiento de iniciación y mantenimiento de cultivos en suspensión celular. Redibujado de Mustafa et al.(2011).

La tasa de crecimiento de los callos y SC es paralela en muchos aspectos a una curva sigmoidea observada en poblaciones de organismos unicelulares (Davis et al., 1978). Hay varias etapas de crecimiento (Phillips et al., 1995; Davis et al., 1978) independientemente de si el cultivo es callo, suspensión de células o cultivo de raíces pilosas. Hay una fase de retraso inicial (I) seguida de un período de crecimiento rápido que puede aproximarse a exponencial (II), luego lineal (III), después de la fase lineal comienza un período de crecimiento decreciente (IV) seguido de una fase estacionaria (V) y, finalmente, una disminución de la biomasa a medida que las células del cultivo comienzan a envejecer (Galaz-Ávalos et al., 2012; Mustafa et al., 2011).

El crecimiento celular puede ser medido de varias formas con base en el uso de parámetros como el peso fresco (PF), el peso seco (PS), el número de células, el volumen del paquete celular (VPC), la concentración de nutrientes, la conductividad eléctrica (CE), y la osmolalidad del medio de cultivo, el contenido de proteína, y el contenido de ADN de

las células, así como el análisis de imágenes, la absorbancia de luz, la osmolaridad, la reflectancia de haz enfocado, el procesamiento de imágenes, la actividad enzimática y turbidimétrica. (Figura 2.2) (Vitecek et al., 2004; James y Lee, 2000; Mills y Lee, 1996; Madhusudhan et al., 1995; Nicoloso et al., 1994; Olofsdotter, 1993; Coles et al., 1991; Shetty et al., 1990; Sung, 1976; Hahlbrock y Kuhlen, 1972). También es importante medir el pH del medio de cultivo (Galaz-Ávalos et al., 2012).

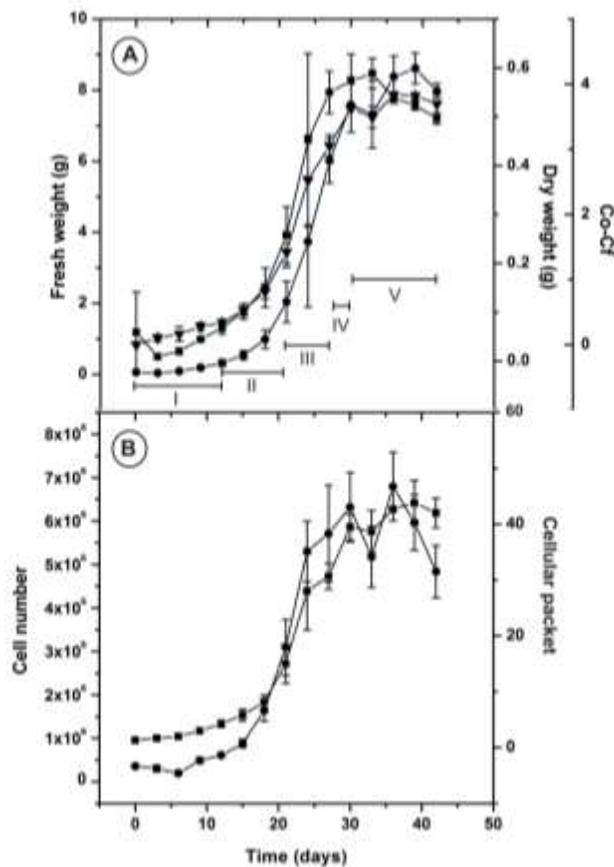


Figura 2.2. Crecimiento de cultivo en suspensión de *Coffea arabica* línea L2.

Figura 2.2: (a) Peso fresco (●); peso seco (■); conductividad (▼). (b) Número de células (●); paquete celular (■). Para las determinaciones se transfieren cien miligramos de células a 25 mL de medio MS suplementado con 2,4-D 13.6 μ M y BA 4.4 μ M contenido en frascos de comida para bebés. Los matraces se incuban bajo fotoperiodo (16 horas de luz a 8 horas de oscuridad a 25 ± 2 °C). Se toman muestras por triplicado cada 3 días, comenzando con el día 0, hasta el día 42. Figura tomada de Galaz-Ávalos et al. (2012).

El comportamiento de las células es diferente durante cada etapa del crecimiento. Hay varios factores que influyen en el crecimiento de las células, como el medio de cultivo, el origen del explante, la cantidad de RCV, las condiciones ambientales de cultivo, etc. Los cultivos deben transferirse a medio fresco antes de que alcancen la fase estacionaria. La desaceleración del crecimiento se debe a varios factores; entre ellos se encuentran el agotamiento de nutrientes, la densidad celular y la producción de subproductos tóxicos. Las dos primeras fases de crecimiento de la cultura son la exponencial y la lineal. El cultivo debe transferirse a medio fresco al final del lineal (fase número III).

El comportamiento del cultivo es diferente durante cada etapa del crecimiento. El medio y las condiciones de incubación pueden afectar el tiempo que permanece el callo en una etapa particular (Smith, 1992). Para muchos procedimientos experimentales, es necesario utilizar cultivos en un punto de desarrollo específico. Esta es la razón por la cual es muy importante caracterizar el ciclo de crecimiento antes de comenzar con cualquier experimento.

Durante todo el ciclo de cultivo, se debe comprobar la viabilidad para asegurarse de que el cultivo está creciendo correctamente (Galaz-Ávalos et al., 2012). La viabilidad se puede seguir utilizando diferentes métodos, entre ellos, exclusión de colorantes (Baker y Mock, 1994; Huang et al., 1986), muerte vital (Widholm, 1982) y actividad de transporte de electrones (Suzuki et al., 1987) son los más usados. La viabilidad también se puede determinar mediante métodos no invasivos (Sowa y Towill, 1991) o midiendo la actividad de la esterasa intracelular (Steward et al., 1999). En algunos casos, la reducción de sales de tetrazolio puede ser un mejor indicador de células metabólicamente activas, como en el estudio de respuestas mediadas por especies reactivas de oxígeno durante las primeras horas críticas de la inducción fúngica (Escobedo-GraciaMedrano y Miranda-Ham, 2003).

2.1. Material vegetal

Cocos nucifera

2.2. Métodos

2.2.1. Establecimiento del cultivo de callos

Los callos se obtuvieron a través de explantes de plúmula cultivadas *in vitro*. Los explantes de las plúmulas fueron incubados en el medio basal semisólido Y3 (Eeuwens, 1976), más la adición de compuestos orgánicos y carbón activado (Cuadro 2.1). El RCV empleado fue el 2,4-D (Sigma, D6679). El pH del medio fue ajustado a 5.75, antes de complementarlo con 3 g de Gellam Gum Power (Lenexa, Kansas, USA) (Sáenz et al., 2018). Los callos así obtenidos fueron proporcionados por el laboratorio de los Drs. Carlos Oropeza y Luis Sáenz.

Cuadro 2.1. Medio de cultivo Y3 semi-sólido para *Cocos nucifera* L. (Eeuwens, 1976).

Solución madre	Reactivo	Cantidad (g L ⁻¹)	Volumen usado (ml L ⁻¹)
1	NH ₄ Cl	26.8	20
	KNO ₃	101.2	
2	KCl	149.6	10
	H ₂ NaPO ₄	27.56	
	H ₃ B0 ₃	0.3092	
3	MgSO ₄ ·7H ₂ O	24.8	10
	MnSO ₄	0.848	
	KI	0.832	
	CuSO ₄	0.0248	
	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.72	
4	NiCl ₂ ·6H ₂ O	0.0024	10
	CaCl ₂ ·2H ₂ O	29.4	

	CoCl ₂	0.024	
	NaMoO ₄ ·2H ₂ O	0.024	
5	C ₁₀ H ₁₄ N ₂ Na ₂ O ₈ ·2H ₂ O	3.724	10
	Fe ₂ SO ₄ ·7H ₂ O	1.5	
6	Tiamina	0.1012	10
	Piridoxina	0.1028	
	Ácido nicotínico	0.1	
	Myo-Inositol	10	
	L-Asparagina	8.8	
	L-Asparaginina	10	
	L-Glutamina	10	
Gelrite		0.3%	
Carbón activado		0.25%	
Ácido 2,4-diclorofenoxiacético		0.6 µM	
Sacarosa		5%	

2.2.2. Establecimiento de las suspensiones celulares

Los callos obtenidos fueron puestos en observación de 7 a 15 días para separar cualquier material que pudiera estar contaminado. Los callos fueron mantenidos y subcultivados cada 21 días en medio Y3 (medio I).

Para la primera fase de obtención de una suspensión celular se requirió de macerar con delicadeza en un vaso de precipitados de cristal de 50 mL un gramo de callo semicompacto, color blanco de superficie lisa. Este macerado se llevó a cabo mediante un pistilo de vidrio. En el vaso se colocan 15 mL de medio MMSE (Pateña et al., 2002) y el pH ajustado a 5.7. Una vez que se ha disgregado el callo, se añadieron otros 15 mL de medio MMSE, se realizó una ligera agitación y el contenido del vaso se filtró a través de una malla de 280 micras (Sigma). Los 30 mL del filtrado se colocan en un matraz

Erlenmeyer de 250 mL. El material en el matraz se incubó a $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ en un orbitador a 95 rpm en condiciones de oscuridad. Después de 30 días las células se cambiaron de medio cada 15 días. El callo macerado mayor a 280 micras se manejó de la misma manera que su contraparte menor a 280 micras.

Para la medida del crecimiento de las suspensiones celulares se emplearon 30 gramos de callo provenientes de 30 frascos. Se tomó un gramo de callo de cada frasco y se procedió con su macerado y filtrado, para cada callo, como se mencionó en el párrafo anterior. De esta manera se contó con 30 matraces con 30 mL de medio de cultivo MMSE cada uno y un gramo de material macerado y filtrado a través de una malla de 280 micras.

2.2.3. Medida del crecimiento de las SC

2.2.3.1. Pesos fresco y seco

Para llevar a cabo la evaluación del crecimiento de la SC, se tomaron muestras los días cero, 15, 30 y 56 después de la resiembra del cultivo. Para determinar el peso fresco, el contenido de un matraz se vertió dentro de un equipo de filtrado Millipore, al cual previamente se le había colocado un papel filtro Whatman No. 1. El equipo de filtración está acoplado a un matraz kitazato conectado a una bomba para hacer vacío (Felisa FE-1500). Se hizo vacío durante un minuto. Las células así colectadas se pesaron en una balanza analítica. Las muestras se almacenaron a -22°C . Una vez terminado el ciclo de cultivo todas las muestras colectadas se liofilizaron (Labconco). Después de que estuvieron completamente liofilizadas se pesaron en una balanza analítica para obtener el peso seco.

2.2.3.2 Conductividad eléctrica y pH

La conductividad eléctrica se determinó introduciendo el electrodo de un conductímetro en el medio de cultivo recuperado después del filtrado de las SC cuando se va a determinar el peso fresco. Para la medición de pH se utilizó un potenciómetro (Ohaus starter 3100) cuyo electrodo fue sumergido en el medio libre de células.

Con los datos de crecimiento se calcularon el índice de crecimiento, la velocidad de crecimiento y el tiempo de duplicación de acuerdo con Galáz-Avalos et al. (2012).

2.3. Preparación de los medios de cultivo empleados

2.3.1. Medio I. Inducción de callo

Este medio se prepara utilizando la formulación de medio Y3 (Cuadro 2.1), suplementado con 3 g L⁻¹ de gelrite, 2.5 g L⁻¹ de carbón activado, 5% sacarosa y 0.55 µM (2,4-D). El pH se ajusta a 5.75. Se colocan 30 mL de medio semisólido en matraces Erlenmeyer de 250 mL o 10 mL en frascos de 45 mL. En el caso de los medios líquidos se omite la adición del gelificante.

2.3.2. Medio II. Inducción de la embriogénesis somática

El medio II se prepara usando la formulación del medio Y3 (Cuadro 2.1), adicionado con 3 g L⁻¹ de gelrite, 2.5 g L⁻¹ de carbón activado, 5% sacarosa y 0.325 mM de 2,4-D. El pH se ajusta a 5.75 y se colocan 25 mL de medio en matraces de 150 mL para cultivo de tejidos. Los frascos se tapan y se esterilizan (Sáenz et al., 2018).

2.3.3. Medio líquido MMSE para suspensión celular de *Cocos nucifera*

En el Cuadro 2.2 se muestra la composición del medio utilizado para el establecimiento de las SC de cocotero. Decidimos probar este medio para la producción de las SC de cocotero, aunque fue publicado para mando, ya que en la experiencia acumulada en nuestro laboratorio ha servido para el establecimiento de SC de cultivos que hasta entonces habían sido recalcitrantes.

Cuadro 2.1. Medio de cultivo líquido MMSE para SC de *Cocos nucifera* (Pateña et al., 2002).

Reactivo	Cantidad (mg L ⁻¹)
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	138
KNO ₃	2527.50
CaCl ₂ ·2H ₂ O	147
(NH ₄) ₂ SO ₄	132.2
MgSO ₄ ·4H ₂ O	246.50
KI	0.83

ZnSO ₄ ·4H ₂ O	8.6
MnSO ₄ ·4H ₂ O	22.3
H ₃ BO ₃	6.2
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.25
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.025
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.025
Na ₂ EDTA	37.3
Myo-inositol	100
HCl-Tiamina	1
Ácido nicotínico	0.5
HCl Piridoxina	0.5
Glicina	2
Glutamina	400
Ácido 2,4-diclorofenoxi acético	0.5
Sacarosa	60,000
Agua de coco	100 (mL L ⁻¹)

CAPÍTULO III

Resultados

3.1. Introducción

El mejor método para producir una gran cantidad de embriones es el uso de suspensiones celulares. En el caso del cocotero ha habido dos intentos para producir suspensiones celulares con el fin de obtener embriones somáticos. El primer intento por Basu et al. (1988) utilizaron explantes de hoja. Entre los factores que detectaron que modificaba el crecimiento del cultivo fueron el pH, el glutatión y la espermidina produjeron un pequeño aumento en el número de células. Más recientemente se publicó otro intento para producir suspensiones celulares para la obtención de embriones cigóticos (Bhavyashree et al., 2016). Estos autores pudieron producir una suspensión que crece alrededor de tres veces, medida como incremento en el paquete de volumen celular. Sin embargo, los callos de los que partieron eran poco friables por lo que la calidad de la suspensión celular obtenida fue de muy mala calidad

Los agregados o grupos de células vegetales, se forman comúnmente en suspensiones celulares (Dixon, 1985), cierto grado de agregación celular es a menudo requerido para el crecimiento celular y también en casos de interés en la producción de metabolitos secundarios (Hulst et al., 1989). Estos agregados pueden propiciar un problema al momento de exponer los cultivos vegetales a diversos tratamientos, ya que la absorción de estos no estaría en un sistema homogéneo el cual es requerido para proporcionar una mayor reproducibilidad en los experimentos. Así mismo se tiene que trabajar una mezcla fina en cuanto al material vegetal expuesto y no con un cultivo de diferentes tamaños de agregados celulares. Por lo que se han reportado técnicas para proporcionar una suspensión células finas, mediante filtración, pipeteo/decantación, o mediante la adición de una concentración baja de pectinasa (Dixon, 1985).

3.2. Resultados

El material inicial fue proporcionado por el laboratorio de los Drs. Carlos Oropeza y Luis Sáenz. Los callos que nos fueron proporcionados se sembraron en medio semisólido Y3 (Figura 3.1). Este fue el material con el cual se realizaron los experimentos y se obtuvieron los resultados que se describen en este capítulo.

Lo primero que se hizo fue colocar a los callos en medio LB para detectar la presencia de microorganismos. Esto nos aseguró que solo trabajáramos con callos que no estuvieran contaminados.

Uno de los principales problemas reportados para el CTV de cocotero es su oxidación. Por lo el primer enfoque de este trabajo fue desarrollar un sistema para la obtención de una SC que no se oxidara. Para ello se implementó un sistema en los matraces que consistía de una base semisólida del medio Y3 (Sáenz et al., 2018) con carbón activado. Encima de esta base semisólida se agregaron 30 mL del mismo medio, pero ahora líquido (Figura 3.2).



Figura 3.1. Callos proporcionados por el laboratorio de los Drs. Carlos Oropeza y Luis Sáenz.

Figura 3.1: El cultivo tiene un mes de edad, está en medio semisólido Y3 y contiene carbón activado.



Figura 3.2. Diagrama que muestra el sistema empleado para la obtención de las SC.

Figura 3.2: La parte negra indica la presencia del carbón activado en el medio semisólido y la parte cristalina es el medio líquido.

El primer experimento consistió en colocar los callos mostrados en la Figura 3.1. sobre una combinación de 30 mL de medio Y3 semisólido (el cual contiene al carbón activado) y 15 mL de medio Y3 líquido. Los callos se colocan en el medio líquido y se colocan en un orbitador a 120 rpm. En poco tiempo el medio líquido se filtra al medio semisólido, sin embargo, una parte se queda sobre el medio semisólido y sirve para que el callo suelte parte de sus células en él (Figura 3.3).



Figura 3.3. Fotografía que muestra al medio semisólido Y3 como base y el medio líquido en la parte superior.

Durante la realización de los experimentos mostrados en la Figura 3.3 observamos que un poco del carbón activado pasaba al medio líquido, por lo que decidimos realizar un experimento al que denominamos “integridad del medio”. Para ello se prepararon matraces conteniendo 30 mL de medio Y3 semisólido y con carbón activado y 30 mL del medio Y3 líquido. Estos matraces se colocaron en un orbitador a 65 y 120 rpm (Figura 3.4)

Se puede observar que a los siete días los medios sometidos a 120 rpm se habían mezclado de una manera más heterogénea que los medios sometidos a 65 rpm (Figura 3.4).

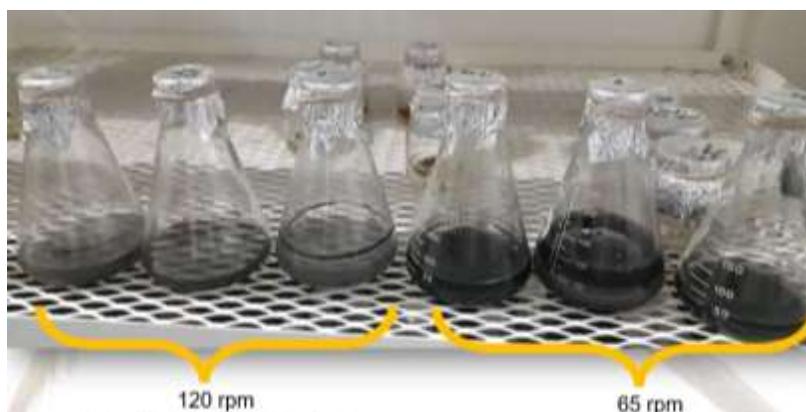


Figura 3.4. Fotografía representativa de la integridad de los medios siete días después de haberse colocado en el orbitador.

3.2.1. Obtención de las suspensiones celulares

Primero se probaron tres metodologías para fragmentar los callos. La primera consistió en licuar los callos. Desafortunadamente, esta estrategia que a servido en otros cultivos, en nuestro caso no dio ningún resultado. Para la segunda metodología se “picaron” los callos en pequeños fragmentos. Para el tercer caso se usó un macerado en un tubo y un pistilo de vidrio. Los fragmentos de callo se colocaron en frascos que contenían 10 mL de medio Y3 semisólido con carbón activado. Los mejores resultados se obtuvieron con la tercera metodología, por lo que esta metodología fue la empleada para el resto del trabajo.



Figura 3.5. Establecimiento de las suspensiones celulares de *C. nucifera*.

Figura 3.5: El callo friable se disgregó en 30 mL de medio líquido MMSE en matraces Erlenmeyer de 250 mL y se incubaron en la oscuridad a 95 rpm. A) Inóculo inicial; callo friable. B) Filtración del callo macerado a través de una malla de 280 micras día cero. C) Suspensiones celulares en reposo al día 30. D) Suspensión celular de material filtrado día cero. E) Callo en suspensión celular sin filtrar.

En la figura 3.5 se muestra como ejemplo para el medio MMSE la forma en que disgregaban los callos y su aspecto treinta días después. El callo friable se disgregó en 30 mL de medio líquido en matraces Erlenmeyer de 250 mL incubados en la oscuridad a 95 rpm y se incubó por 30 días.

Para tratar de establecer una SC de *C. nucifera* se probaron cuatro diferentes medios de cultivo (Figura 3.6). De cada frasco se tomó un gramo de callo, el cual fue dividido en dos matraces mediante una disgregación del callo mediante un pistilo de vidrio. La fase del callo más fino disgregado se colocó en 30 mL de cada uno de los cuatro medios empleados. Los medios empleados fueron el medio Y3 (Medio I), el medio Y3 adicionado de adenina (medio II), el medio MS (Murashige y Skoog, 1962) adicionado de BA 5 μ M (medio III) y el medio MMSE (Pateña et al., 2002) (medio IV). A este proceso se le denominó fase A.

Respuesta de callos de *Cocos nucifera* L. en diferentes medios de cultivo vegetal

	MEDIO I Y3	MEDIO II Y3 - Adenina	MEDIO III MS- Benciladenina	MEDIO IV MMSE
Oxidación del callo	NO	NO	SI	NO
Friabilidad	Textura rugosa y suave.	Callo más globular, liso y suave.	Poco crecimiento, liso y más compacto.	Textura suave, con pocas aglomeraciones celulares.
Observaciones	Aglomeraciones celulares rugosas, textura suave. Y poca oxidación visible.	El callo es de mayor tamaño, pero presenta oxidación desde los primeros 7 días.	Desde los primeros 7 días de tratamiento se oxido el callo, poco crecimiento.	El crecimiento es más lento respecto a los 3 pasados medios. Casi no presenta oxidación.
Fotografía al día 30 del callo sometido al medio				

Figura 3.6. Respuesta de los callos de *Cocos nucifera* en diferentes medios de cultivo vegetal

Por otro lado, el callo que presentaba un mayor tamaño, también fue colocado en 30 mL de medio líquido sin carbón activado MMSE, denominando al proceso, fase B. Como puede apreciarse en la figura 3.7 los dos grupos de materiales son sustancialmente diferentes. Mientras el material de la Fase A es muy fino y se encuentra homogéneamente disperso, el material de la Fase B es mucho más grande, heterogéneo y no se distribuye homogéneamente.

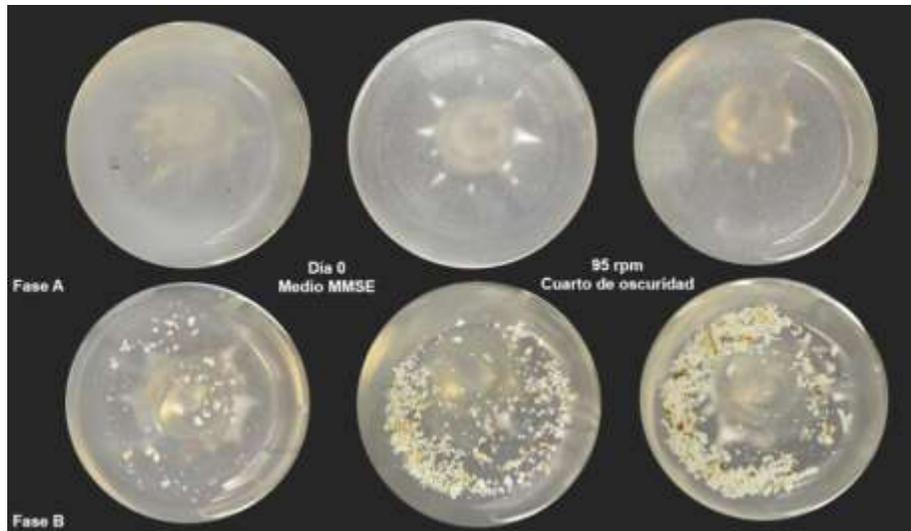


Figura 3.7. Fotografías con inoculo para suspensión celular de *Cocos nucifera*.

Figura 3.7: Parte superior, Fase A. Células y tejido fino obtenido por disgregación. Parte inferior, Fase B. Tejido del callo con mayor tamaño, presencia de daño físico por disgregación.

Después de la disgregación de un gramo de callo (500 mg en fase A y 500 mg en fase B, ver figura 3.7), los siete matraces que se encontraban en fase A, pasaron a ser subcultivados después de 30 días de cultivo, siendo este su primer subcultivo. Para la multiplicación del material pasaron cuatro subcultivos, de un mes cada uno, para poder obtener el mayor número de material posible para su caracterización.

De lo cuatro medios probados, el medio que dio mejores resultados fue el medio MMSE. Por lo tanto este medio fue el que se siguió utilizando. Para el establecimiento de las suspensiones celulares el inóculo inicial fue de 3.0 mg de peso seco de callo friable, cultivado por 30 días antes de la filtración y mantenidos en un medio MMSE por 15 días más hasta obtener la muestra. El inóculo fue incubado en matraces Erlenmeyer de 250 mL, a 25 ± 2 °C en la oscuridad a 100 rpm. El callo macerado liberó algunas células al momento de colocarlo en el medio de cultivo, lo que permitió observar células libres desde el día cero; así mismo, el material se pudo filtrar con una malla de 100 micras para poder realizar el estudio histológico. Esto permitió observar una suspensión celular con algunos agregados celulares el día 30 (Figura 3.8).

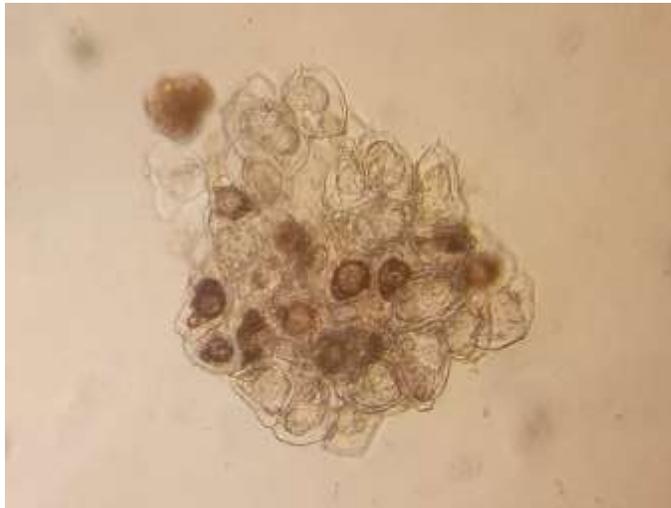


Figura 3.8. Células de una suspensión celular de 30 días de *Cocos nucifera* en medio MMSE, a 95 rpm.

También observamos que los cultivos en el medio MMSE, sin carbón activado, no se oxidan después de cuatro transferencias cada 30 días.

Así mismo, algunos fragmentos de callo fueron cultivados en medio MMSE, sin carbón activado durante 324 días seguidos, después de ser sometidos a dos cambios de medio (30 mL por cambio de medio por decantación en intervalos de 15 días). Observando así en el medio líquido una suspensión de células finas de cocotero, las cuales no presentan oxidación a comparación de un medio sólido Y3 en él que los callos son transferidos cada mes. También se puede observar la aparición de algunos agregados celulares, así como células libre en el medio con un núcleo grande (Figura 3.12), posiblemente por entrar en la etapa de división.

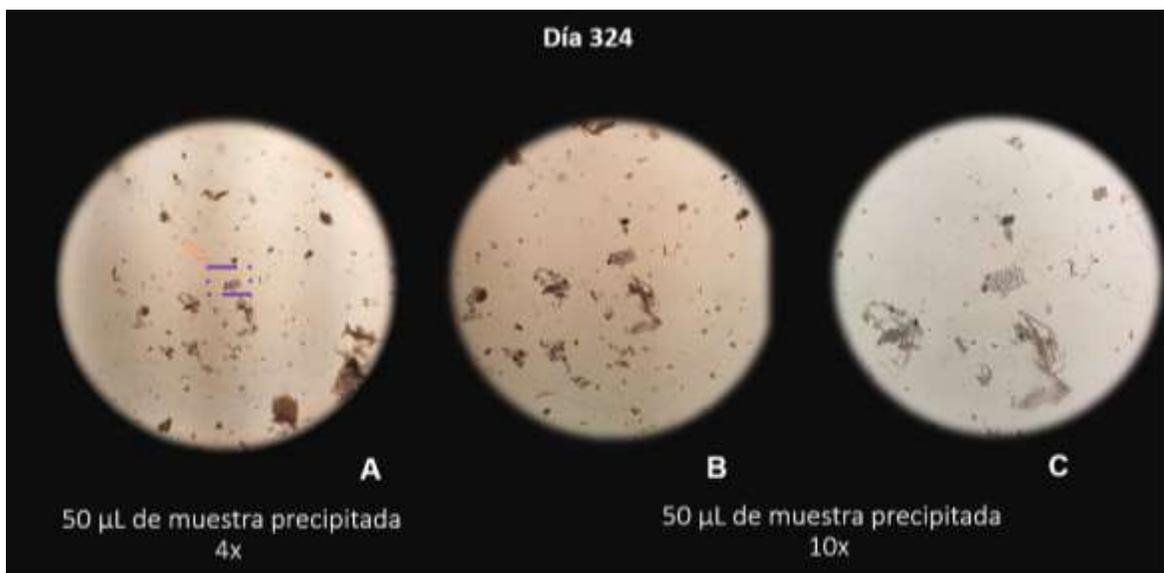


Figura 3.9. Observación microscópica de suspensión celular de *Cocos nucifera* a los 324 días.

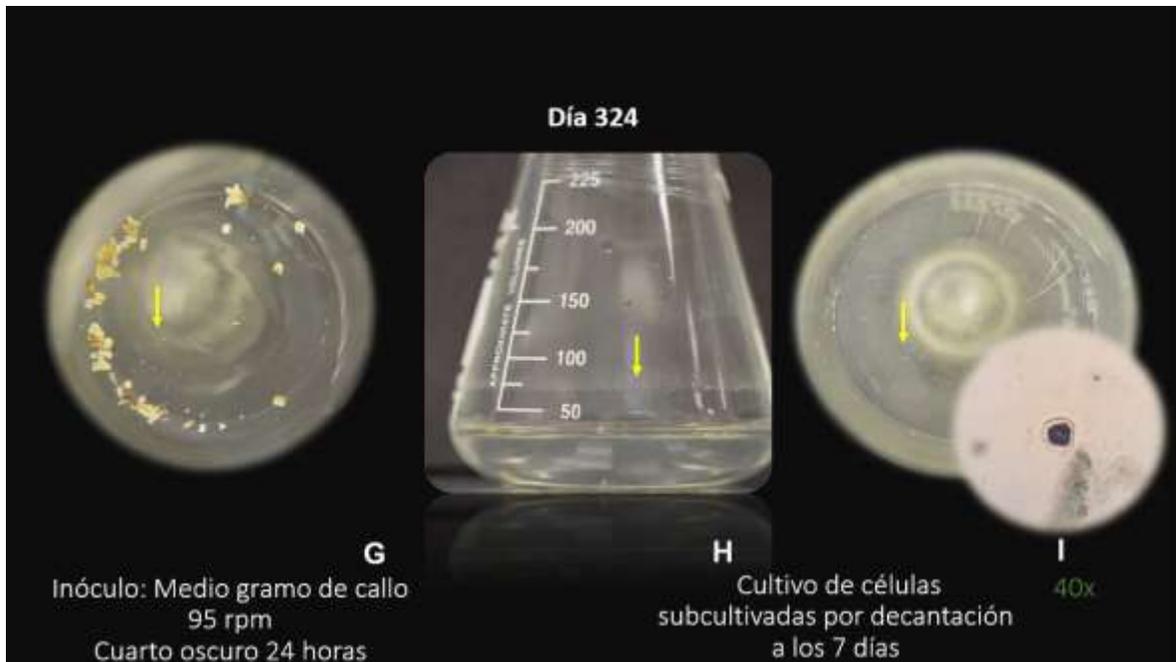


Figura 3.10. Observación microscópica de agregados celulares en suspensión celular de *Cocos nucifera* a los 324 días.

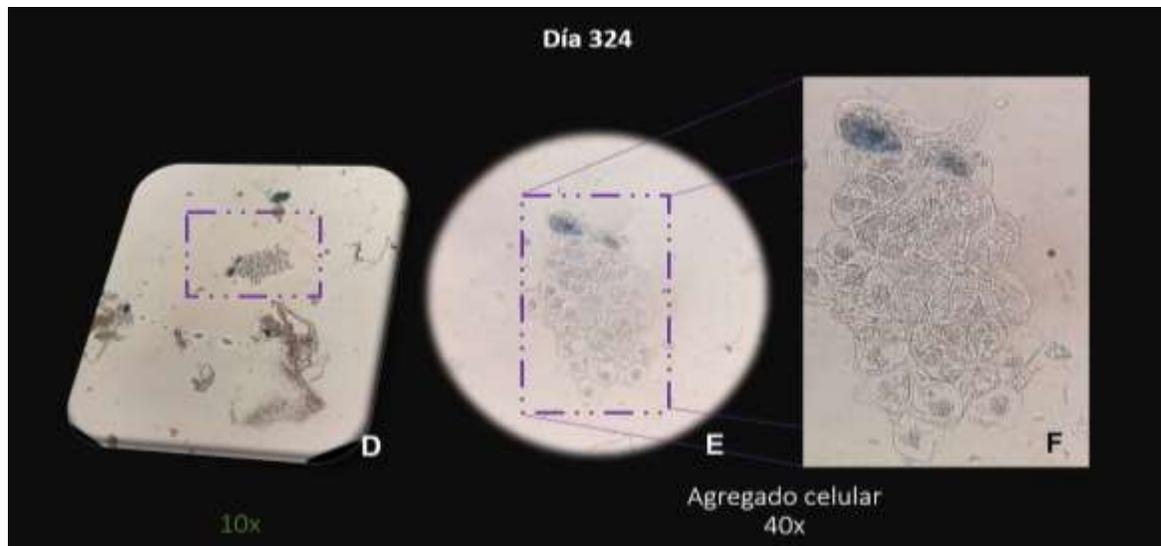


Figura 3.11. Observación del comportamiento del cultivo a los 7 días de ser cambiado el medio, de un cultivo que se mantuvo por 324 días.



Figura 3.12. Una célula de *Cocos nucifera* a los 7 días, después de un cultivo en mantenimiento por 324 días en medio MMSE.

Para la observación de núcleos se utilizó azul de toluidina, como se observa en una sola célula a 40x (Figura 3.12) o en la Figura 3.10E y 3.10F.

En la figura 3.10 se puede observar 50 μ L de muestra de una suspensión celular que se ha mantenido durante 324 días en un mismo medio líquido MMSE, suplementado con 20% de leche de coco Calahua®. Del panel A al C de la figura ya mencionada, se puede observar algunos agregados celulares como los señalados con la flecha del panel A (4x) rodeado de algunos tejidos dañados procedentes de la disgregación del callo mediante un pistilo de vidrio. En la Figura 3.11 se puede realizar más un acercamiento al agregado celular representado el panel E, siendo el mismo agregado del panel A de la Figura 3.10. Por otro lado, estos cultivos fueron cambiados de medio (Figura 3.11G) y observados a los 7 días de ser sometidos al mismo medio (Figura 3.12I), en él que se pudo observar algunas células libre (Figura 3.12) y otros agregados celulares, también hubo presencia de un anillo de células (Figura 3.12H) en el matraz a 95 rpm de agitación en la oscuridad a los 7 días.

3.2.2. Determinación del peso seco

El ciclo de cultivo se realizó evaluando el peso seco, y la conductividad eléctrica y el pH del medio de cultivo por un periodo de 56 días. El muestreo se realizó cada 15 días. La prueba constó de tres replicas biológicas por muestreo. El inóculo utilizado provino de SC

de 30 días previamente establecidas con un inóculo de un gramo de callo friable y filtradas para eliminar los grumos. El contenido de 15 matraces se colocó en un vaso de precipitados de 1,000 mL y las células se dejaron sedimentar durante 45 minutos. Posteriormente se tomaron tres alícuotas de un mL que se colocaron en un equipo de filtrado a vacío por un minuto. Se pesaron en una balanza analítica y los resultados se promediaron para poder determinar cuántos mg de material en peso seco había en un mL de medio con la SC. Se inocularon 3.0 mg usando una micropipeta de 5 mL en matraces de 250 mL con 30 mL de medio de cultivo MMSE. Los matraces se colocaron en la oscuridad en un orbitador a 95 rpm.

Las muestras se tomaron en los días indicados. Las muestras fueron liofilizadas y a continuación se pesaron. Los resultados se muestran en la Figura 3.9. Se partió de un inóculo de 3.0 mg de peso seco. Con este tamaño de inóculo y después de 56 días, aún no ha llegado a la fase estacionaria y alcanza un peso de 7.8 mg. Aún con un inóculo tan pequeño durante los primeros 15 días duplicó su peso. Este primer experimento es muy alentador. Podemos decir que el medio MMSE si funciona para el crecimiento de células de cocotero. Sugerimos que para establecer el cultivo, y dado los alentadores resultados presentados en esta tesis debemos trabajar con algunos parámetros del inóculo inicial. Por ejemplo, el estado fisiológico del callo, probablemente si lo tomamos en la fase exponencial de crecimiento sea mejor que si lo tomamos en la fase estacionaria. También deberemos considerar el tamaño del inóculo y determinar la viabilidad de las células después de disgregar el callo.

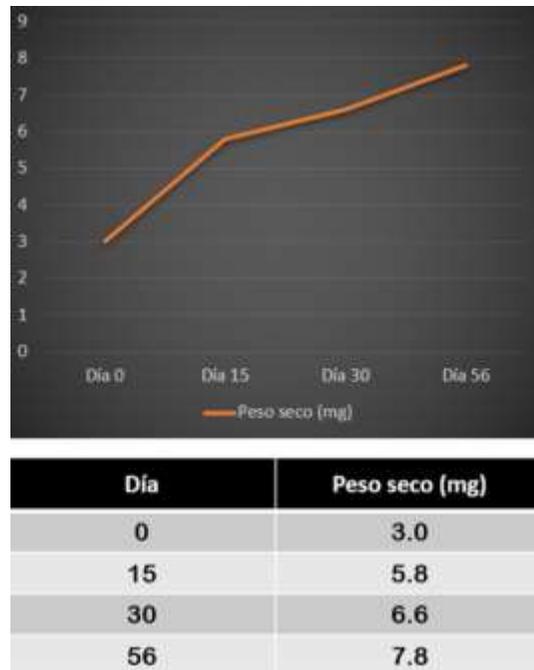


Figura 3.13. Ciclo de cultivo de suspensiones celulares de *C. nucifera*.

Se utilizó un inóculo inicial de 3.0 mg de peso seco en medio MMSE.

3.2.3. Determinación de la conductividad eléctrica y del pH del medio de cultivo

Para complementar los datos de peso seco, también medimos la conductividad del medio de cultivo y el pH. La conductividad del medio de cultivo también es un indicador del crecimiento de las células, se basa en el hecho de que al ser absorbidos los nutrientes del medio de cultivo, principalmente el nitrato, disminuye la conductividad del medio de cultivo. En la Figura 3.10 se puede apreciar que la conductividad del medio de cultivo disminuyó hasta el día 30 de cultivo, pasó de 7.2 mS cm^{-1} a 6.2 mS cm^{-1} . Después aumentó, posiblemente debido a que algunas de las células se rompen, vertiendo de esta manera su contenido en el medio de cultivo y por lo tanto aumentando la conductividad.

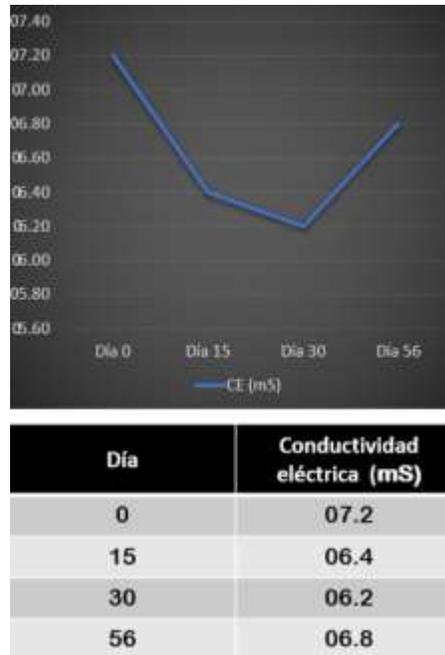
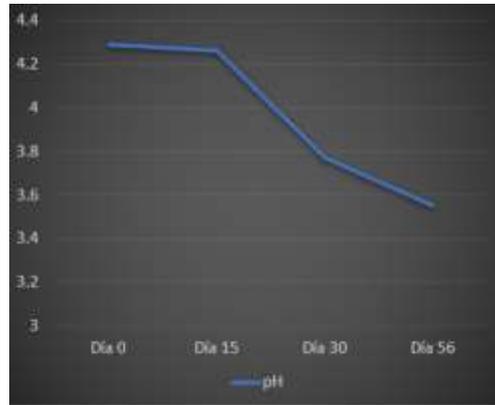


Figura 3.14. Conductividad del medio de cultivo de células de cocotero en suspensión.

El pH del medio de cultivo es otro parámetro que ayuda a comprender el comportamiento de las células en el medio de cultivo. En nuestro caso con sólo colocar las células provenientes del macerado del callo el pH disminuyó 1.5 unidades y se midió un pH de 4.29. Esto posiblemente se debe a que un número importante de células estaban rotas y su contenido disminuyó el pH del medio, ya que el medio tiene muy poca capacidad de tampón. El pH siguió disminuyendo hasta el día 56 (Figura 3.10). Esta disminución se debe en general a la toma de amonio del medio de cultivo por las células, ya que al entrar a las células por un antipuerto se intercambian por H^+ que se expulsan al medio de cultivo, por lo que el pH de éste disminuye.



Día	pH
0	4.29
15	4.26
30	3.77
56	3.55

Figura 3.15. pH del medio de cultivo de células de cocotero en suspensión.

CAPÍTULO IV

Discusión

La obtención de suspensiones celulares de cocotero ha sido muy difícil hasta ahora como analizamos en la justificación. Uno de los principales obstáculos es su propensión a oxidarse. También sabemos que el hecho de que sea una planta monocotiledónea también es parte de la dificultad. Hasta ahora se han publicado dos intentos de obtención de SC con la finalidad de producir embriones somáticos a partir de ella. El primer intento lo llevaron a cabo Basu et al. (1988) del Plant Research Laboratory, de la Jawaharlal Nehru University, en la India, quienes utilizaron explantes de hoja. Entre los factores que detectaron que modificaba el crecimiento del cultivo fueron el pH, la presencia de glutatión y de espermidina, los que produjeron un pequeño aumento en el número de células. Más recientemente, un grupo de investigación también de la India, el ICAR-Central Plantation Crop Research Institute publicó otro intento para producir suspensiones celulares para la obtención de embriones cigóticos (Bhavyashree et al., 2016). Estos autores pudieron producir una suspensión que crece alrededor de tres veces, medida como incremento en el paquete de volumen celular. Sin embargo, los callos de los que partieron eran poco friables por lo que la calidad de la suspensión celular obtenida fue de muy mala calidad y el cultivo no prosperó.

Un primer resultado nos llevó a seleccionar al medio MMSE como el más adecuado. Si bien las células crecen más lento en este medio, se obtienen otras características que son deseables como, por ejemplo, el material es más friable y con menos aglomeraciones celulares y no se oxida. El hecho de que no se oxiden los cultivos es esencial para evitar el uso del carbón activado. Si bien el carbón activado ha permitido el establecimiento de diversos cultivos, su uso hace muy difícil establecer condiciones que se puedan repetir, ya que además de los compuestos fenólicos, también absorbe a los reguladores del crecimiento necesarios para establecer el cultivo (Sáenz et al., 2010; van Winkle y Pullman, 2005; van Winkle y Pullman, 2003). Como alternativa se ha propuesto el uso de ácido ascórbico (Singh, 2018). Resultados obtenidos en nuestro laboratorio recientemente

para el cultivo *in vitro* de aguacate sugieren que sustituye exitosamente al carbón activado, sin ninguno de los efectos colaterales producidos por el carbón activado.

Los datos obtenidos en este experimento sirvieron para establecer el experimento en el que se midió el crecimiento de las células y los demás parámetros que nos permitieron caracterizar al cultivo.

En los resultados obtenidos durante la realización de esta tesis son muy similares a los de la publicación más reciente en términos de crecimiento (Bhavyashree et al., 2016). Este crecimiento todavía es muy poco para lo que se espera que crezca un cultivo en SC. Sin embargo, también se le puede ver como un resultado alentador ya que los cultivos no se oxidan, el cual es principal problema a resolver en el caso del cultivo de células de cocotero *in vitro* (Figura 4.1). También debe notarse que el cultivo sigue creciendo aún después de 56 días. Esto seguramente se debe al hecho de que el inóculo fue muy pequeño y no se ha agotado el medio, ya que este agotamiento es la causa principal de que las células entren en la fase de estado estacionario.



Figura 4.1. Muestras de suspensiones celulares de *Cocos nucifera* en las que se aprecia que no hay oxidación.

Figura 4.1: Las muestras fueron tomadas a los días cero, 15 y 30 días de iniciado el cultivo de suspensión celular.

Un dato que nos sorprendió, al medir el pH del medio de cultivo del día cero, fue el hecho de que disminuyó 1.5 unidades. Esto posiblemente se debe a que un gran número de células se rompieron durante el macerado y al verterse su contenido en el medio de cultivo disminuyó el pH, ya que el medio tiene muy poca capacidad de tampón. La disminución del pH conforme pasa el tiempo (Figura 3.10) se debe, en general, a la toma de amonio del medio de cultivo por las células, ya que al entrar a las células por un antipuerto se intercambian por H^+ que se expulsan al medio de cultivo, por lo que el pH de éste disminuye (Butenko et al., 1984; Rose y Martin, 1975).

En un principio, las suspensiones celulares constan de grandes agregados y de células libres, alargadas y grandes que no se dividen. Después de varios subcultivos es factible obtener una SC finamente dispersa y que crece. Estas suspensiones poseen pequeños agregados de células pequeñas, isodiamétricas con paredes finas y citoplasma denso (Figura 3.8). Se ha reportado que la adición de aditivos orgánicos o “complejos” al medio básico frecuentemente resulta benéfica para el crecimiento exitoso de algunos órganos y tejidos. Estos complejos han incluido extracto de tomate verde, agua o leche de coco jugo de naranja, hidrolizado de caseína, extracto de levadura y malta (George et al., 2008; Conger, 1981). Los aditivos al medio no solo pueden tener una profunda influencia no sólo en el crecimiento del cultivo sino en el proceso de diferenciación celular (Gutierrez et al., 2010; Fuentes-Cerda et al., 2001).

En el caso del tejido del endospermo de *C. nucifera* experimenta uno de los tres principales modos de desarrollo, el cual es un desarrollo nuclear (Lopes y Larkins, 1993). En un principio el endospermo es un líquido que contiene núcleos libres generados por un proceso en el que el núcleo del endospermo primario para por varios ciclos de división sin citocinesis, el cual es el proceso en el que el citoplasma de una sola célula eucariota se divide para formar dos células hijas. Posteriormente ocurre el proceso de citocinesis, progresando desde la periferia hacia el centro, formando así la capa de endospermo celular. A su inicio el endospermo celular es translúcido y gelatinoso, pero luego se endurece en su madurez para convertirse en el tejido blanco o "carne de coco". A diferencia de algunas plantas como el trigo o el maíz, el proceso de celularización en el fruto de coco no llena toda la cavidad del saco embrionario, dejando así una cavidad en su interior llena de solución líquida. Esta solución se conoce comúnmente como agua de coco y es de origen citoplasmático (Janick y Paull, 2008). Por otro lado, un detalle importante es que el agua de coco se obtiene del apoplasma de la semilla (pared celular circundante) y se transportan simplásticamente (a través de plasmodesmo, que son la conexión entre los citoplasmas de las células adyacentes) al plasmodesmo (Patrick y Offler, 2001). Así mismo el agua de coco no debe confundirse con la leche de coco, aunque algunos estudios han utilizado los términos indistintamente, por lo que se debe dejar en claro que la parte líquida del endospermo de coco se denomina agua de coco, mientras que la leche de coco se refiere a los productos líquidos obtenidos por rallado del endospermo sólido, con o sin adición de agua (Yong et al., 2009).

En *Datura stramonium*, se ha reportado que cuando se omiten la mezcla de factores de crecimiento, pero se mantiene la leche de coco (endospermo líquido), los embriones crecen, aunque no al mismo ritmo que el medio completo. Pero cuando solo la leche de coco es omitida por completo no se produce crecimiento en los embriones de tamaño pequeño (Van Overbeek et al., 1942). Por otro lado, como lo es en el caso de *Tropaeolum majus*, se ha logrado mantener un crecimiento vigoroso en embriones maduros e inmaduros, cuando fueron suplementados en el medio 9% en volumen, dejando el tejido en medio líquido en el fondo del matraz, ningún tejido presentó clorofila, pero se ha observado que se puede mantener por más de un año. Las células del ápice del brote se habían agrandado, más vacuoladas y habían dejado de parecerse a las células meristemáticas normales (Ball, 1946). A partir de estos hallazgos, los investigadores se han dado cuenta del efecto que tienen los aditivos como sustancias orgánicas de origen natural en el desarrollo, mantenimiento y crecimiento de los cultivos de tejidos vegetales. El endospermo de coco en concentraciones 10%-20% (v/v) suelen ser las más utilizadas para establecer un medio de cultivo de células u órganos. Frecuentemente se utiliza como última alternativa después que los ingredientes definidos en un medio, así como la utilización de diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento que han sido explorados en el modelo que es sometido en el establecimiento del cultivo vegetal y han fallado en éste. Por lo que el efecto positivo en algunos explantes donde se ha promovido la estimulación del crecimiento es mediante la división celular al usar como aditivo el agua de coco en tabaco por ejemplo (Lee y Skoog, 1965). Como se puede observar en el mantenimiento de las células de cocotero mediante el sistema de suspensión celular en medio líquido MMSE, el cual contiene 20% de agua de coco, se reporta que puede mantener las células vivas, algunas con núcleo grande y la presencia de agregados celulares a los 30 días como se presentan los datos de resultados de su caracterización como a los 324 días de estar en el medio, solo con dos cambios de medio previos con intervalos de 15 días cada uno a 95 rpm en un cuarto de oscuridad 24 horas. Demostrando así el crecimiento y mantenimiento de células en suspensión de *C. nucifera* en medio líquido MMSE suplementado con 20% de leche de coco Calahua® Acapulcoco. El mantenimiento de células de cocotero, aunque con un bajo crecimiento pueden justificarse por la composición misma del aditivo de la leche de coco, ya que contiene carbohidratos, vitaminas, minerales, aminoácidos y reguladores del crecimiento que pueden ser aprovechado por los callos y las células con contacto directo con el medio líquido después de haber pasado por el proceso de disgregación mediante el pistilo de

vidrio (maceración) al momento de ser sometidos al sistema de suspensión celular. También se ha observado que el medio utilizado con leche de coco, desacelera el proceso de oxidación natural de los callos de *C. nucifera* en comparación con los callos que tienen que ser mantenidos en medio sólido Y3, los cuales para evitar su oxidación es suplementado con 2.5 g L⁻¹ de carbón activado.

CAPÍTULO V

Conclusiones

- ✓ Fue posible establecer un sistema de SC sin contaminación a partir de callos embriogénicos establecidos a partir de plúmula.
- ✓ El uso de medio MMSE permitió dar un primer paso en el establecimiento de SC de *C. nucifera*. La modificación de este sistema, puede ser la clave para el desarrollo de embriones en suspensión celular.
- ✓ Se estableció que es posible descartar el uso del carbón activado.

Perspectivas

Dado que probamos diferentes medios de cultivo y establecimos que el medio MMSE es el mejor ahora es tiempo para realizar experimentos que impliquen a los siguientes parámetros.

- ✓ Determinar el tamaño del inóculo adecuado para el óptimo crecimiento de las SC.
- ✓ Uso de diferentes reguladores del crecimiento para potenciar el crecimiento de las suspensiones celulares.
- ✓ Probar la adición de ácido ascórbico, ya que además de evitar la oxidación, también actúa sobre las nocivas especies reactivas de oxígeno.

- ✓ Determinar si la velocidad de orbitación es un parámetro que influya en el crecimiento de las SC de cocotero.

Una vez establecidas las SC será posible empezar a estudiar parámetros bioquímicos y moleculares que permitan de forma efectiva la inducción de la ES. Entre los más inmediatos se encuentran:

- ✓ Analizar el secretoma de las SC de cocotero.
- ✓ Medir el contenido de amonio y nitrato en el medio de cultivo conforme van creciendo las células.

- ✓ Determinar la función de los reguladores del crecimiento en el desarrollo de las SC.

- ✓ Convertir las SC en cultivos con potencial embriogénico. Este es el más importante y la meta final del establecimiento de una SC con capacidad embriogénica de cocotero.

ANEXOS

Cuadro A.1. Cuadro A.1 Composición de los medios de cultivo utilizados para el establecimiento y proceso de inducción de la ES en SC en *Cocos nucifera*.

Componentes	Masa Molar (g mol ⁻¹)	Medio de cultivo			
Macroelementos		Y3	Y3 + Adenina	MS + BA	MMSE
		mg L ⁻¹ (mM)			
NH ₄ Cl		535	535	-	-
(NH ₄) ₂ SO ₄ (Fermont, 63052)	132.14	-	-	-	132.2 (1)
NH ₄ NO ₃ (Sigma, A9642)	80.04	-	-	-	-
KNO ₃ (Fermont, 91842)	101.10	2 020	2 020	-	2527.5 (25)
CaCl ₂ ·2H ₂ O (Sigma, C8106)	147.02	294	294	-	147 (1)
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O (J.T. Baker, 3818-01)	137.99	312	312	-	138 (1)
FeSO ₄ ·7H ₂ O (Sigma, F-7002)	278	-	-	-	27.80 (100)
Na ₂ EDTA (J.T. Baker, 8993-01)	372.24	37.3	37.3	-	37.9 (74.95)
MgSO ₄ ·7H ₂ O (J.T. Baker, 2500-01)	246.48	247	247	-	246.5 (1)
KCl		1 492	1 492	-	-
KH ₂ PO ₄		-	882.3 (μM)	-	-
Sales MS		-	-	4.33 g	-

Microelementos		mg L⁻¹ (μM)	mg L⁻¹ (μM)	mg L⁻¹ (μM)	mg L⁻¹ (μM)
Na ₂ MoO ₄ ·H ₂ O (Sigma, S-6646)	241.9	0.24	0.24	-	0.25 (1.0)
H ₃ BO ₃ (Sigma, B6768)	61.83	3.1	3.1	-	6.20 (100)
MnSO ₄ ·4H ₂ O (Sigma)	223.06	11.2	11.2	-	15.10 (100)
CuSO ₄ ·6H ₂ O (J.T. Baker, 1843)	249.68	0.16	0.16	-	0.025 (0.1)
ZnSO ₄ ·7H ₂ O (Sigma, Z-0501)	287.56	7.2	7.2	-	8.60 (30.0)
KI (J.T. Baker, 3162-50)	166.00	8.3	8.3	-	0.83 (5.0)
CoCl ₂ ·6H ₂ O (Merck, 275839)	237.93	0.24	0.24	-	0.025 (0.1)
NiCl ₂ ·6H ₂ O (Sigma, 10101-97-0)		0.024	0.024	-	-
Componentes orgánicos		mg L⁻¹ (μM)	mg L⁻¹ (μM)	mg L⁻¹	mg L⁻¹ (μM)
Piridoxina HCl (Sigma, P-9755)	205.6	0.05	0.05	2.0	0.5 (2.5)
Ácido nicotínico (Sigma, N-4126)	123.1	1	1	2.0	0.5 (4.0)
Tiamina HCl (Sigma, T3902)	337.27	0.5	0.5	4.0	1 (2.96)
Mio-inositol (Sigma, I5125)	180.16	100	100	-	100 (555)
Glicina (Sigma, 68898)	75.07	2	2	-	2.0 (26.64)
L-Glutamina (Sigma, G8540)	146.14	100	100	-	400 (2.74)
L- Cisteína (Sigma)		-	-	25	-

Sacarosa (Sigma, S539)	342.3	45 g/L	45 g/L	-	60,000 (175.28)
Agua de coco (Calahua ®Acapulcoco)	-	-	-	-	20 mL/L
Reguladores de crecimiento		(μM)	(μM)	(μM)	(μM)
Picloram	241.46	-	-		-
2,4-D (Sigma, D6679)	261.03	2.5	2.5 (+4.5)	(+0.1)	0.5 (1.9)
Adenina		-	222	-	-
6- Bencilaminopurina		-	-	0.5	-
pH		5.7	5.7	5.7	5.7
Referencias		(Eeuwens, 1976)	(Bhavyashree et al., 2016)	(Schiavone y Wisniewski, 1990)	(Pateña et al., 2002)

Bibliografía

- Adkins, S., M. Foale, R. Bourdeix, Q. Nguyen y J. Briddle (2020). Coconut Biotechnology: Towards the Sustainability of the 'Tree of Life', Springer, Cham, Switzerland. 282 p.
- Adkins, S. W., Q. T. Nguyen y M. Foale (2016). Improving the availability of valuable coconut germplasm using tissue culture techniques. *Cord*, 32, 27-35.
- Apavatjirut, P. y J. Blake (1977). Tissue culture of stem explants of coconut (*Cocos nucifera* L.). *Oleagineux*, 32, 267-271.
- Arellano, J. y C. Oropeza, (1995). Lethal yellowing, en: *Lethal Yellowing: Research and Practical Aspects*, Oropeza, C., F. W. Howard y G. R. Ashburner, (eds). Springer Netherlands. Dordrecht. pp. 1-15.
- Arunachalam, V., B. A. Jerard, V. Damodaran, M. J. Ratnambal y P. M. Kumaran (2005). Phenotypic Diversity of Foliar Traits in Coconut Germplasm. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 52, 1031-1037.
- Ashburner, G. R. y E. A. James (1994). An annotated bibliography of *in-vitro* coconut propagation. Australian Center for International Agricultural Research, 40, 1-51.
- Ayil-Gutiérrez, B. A., R. M. Galaz-Ávalos, E. Peña-Cabrera y V. M. Loyola-Vargas (2013). Dynamics of the concentration of IAA and some of its conjugates during the induction of somatic embryogenesis in *Coffea canephora*. *Plant Signaling & Behavior*, 8, e26998.
- Azpeitia, A., J. L. Chan, L. Sáenz y C. Oropeza (2003). Effect of 22(S),23(S)-homobrassinolide on somatic embryogenesis in plumule explants of *Cocos nucifera* (L.) cultured *in vitro*. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 78, 591-596.
- Azpeitia-Morales, A., L. Sáenz-Carbonell, J. L. Chan y C. Oropeza-Salín (2003). Inducción de embriones somáticos en explantes de plúmula de cocotero por ácido abscísico y polietilenglicol. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 26, 309-318.
- Azpeitia-Morales, A., J. L. Chan, L. Sáenz-Carbonell y C. Oropeza-Salín (2009). Influencia de la subdivisión del callo embriogénico en la formación de embriones somáticos de cocotero. *Agricultura Técnica de México*, 35, 36-45.
- Baker, C. J. y N. M. Mock (1994). An improved method for monitoring cell death in cell suspension and leaf disc assays using Evans blue. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 39, 7-12.
- Baker, W. J., V. Savolainen, C. B. smussen-Lange, M. W. Chase, J. Dransfield, F. Forest, M. M. Harley, N. W. Uhl y M. Wilkinson (2009). Complete generic-level phylogenetic analyses of palms (Arecaceae) with comparisons of supertree and supermatrix approaches. *Systematic Biology*, 58, 240-256.

- Baker, W. J. y T. L. P. Couvreur (2013a). Global biogeography and diversification of palms sheds light on the evolution of tropical lineages. I. Historical biogeography. *Journal of Biogeography*, 40, 274-285.
- Baker, W. J. y T. L. P. Couvreur (2013b). Global biogeography and diversification of palms sheds light on the evolution of tropical lineages. II. Diversification history and origin of regional assemblages. *Journal of Biogeography*, 40, 286-298.
- Balaga, H. Y. y E. V. de Guzman (1971). The growth and development of coconut "Makapuno" embryos *in vitro*. II. Increased root incidence and growth in response to media composition and to sequential cultural from liquid to solid medium. *Philippine Agriculturist*, 53, 551-564.
- Balakrishnan, N. P. y R. B. Nair (1979). Wild populations of Areca and Cocos in Andaman and Nicobar islands. *Indian Journal of Forestry*, 2, 350-353.
- Ball, E. (1946). Development in sterile culture of stem tips and subjacent regions of *Tropaeolum majus* L. and of *Lupinus albus* L. *American Journal of Botany*, 301-318.
- Basu, A., U. Sethi y S. Guha-Mukherjee (1988). Induction of cell division in leaf cells of coconut palm by alteration of pH and its correlation with glyoxalase-I activity. *Journal of Experimental Botany*, 39, 1735-1742.
- Baudouin, L., B. F. Gunn y K. M. Olsen (2014). The presence of coconut in southern Panama in pre-Columbian times: clearing up the confusion. *Annals of Botany*, 113, 1-5.
- Beccari, O., (1916). *Cocos nucifera* Linn forma palmyrensis Becc, en: Palmyra Island with a Description of its Flora, Rock, J. F., (ed). College of Hawaii Bull. Honolulu. pp. 1-58.
- Beccari, O. (1917). The origin and dispersal of *Cocos nucifera*. *The Philippine Journal of Science. Series C. Botany*, 12, 27-43.
- Benková, E., M. Michniewicz, M. Sauer, T. Teichmann, D. Seifertová, G. Jürgens y J. Friml (2003). Local, efflux-dependent auxin gradients as a common module for plant organ formation. *Cell*, 115, 591-602.
- Bes, M., L. Herbert, T. Mounier, A. C. Meunier, F. Durandet, E. Guiderdoni y C. Périn, (2021). Efficient genome editing in rice protoplasts using CRISPR/CAS9 construct, en: *Rice Genome Engineering and Gene Editing: Methods and Protocols*, Bandyopadhyay, A. y R. Thilmony, (eds). Springer. New York, NY. pp. 173-191.
- Bhalla-Sarin, N., S. Bagga, S. K. Sopory y S. Guha-Mukherjee (1986). Induction and differentiation of callus embryos of *Cocos nucifera* L. by IAA-conjugates. *Plant Cell Reports*, 5, 322-324.
- Bhavyashree, U., K. L. Jayaraj, K. S. Muralikrishna, K. K. Sajini, M. K. Rajesh y A. Karun (2016). Initiation of coconut cell suspension culture from shoot meristem derived embryogenic calli: A preliminary study. *Journal of Phytology*, 13-16.

- Blake, J. y C. J. Eeuwens, (1982). Culture of coconut palm tissues with a view to vegetative propagation, en: Proc. COSTED Symp. on Tissue Culture of Economically Important Plants, Rao, A. N., (ed). Singapore. pp. 145-148.
- Blake, J., (1983a). Tissue culture propagation of coconut, date and oil palm, en: Tissue Culture of Trees, Dodds, J. H., (ed). Croom Helm. London, Sydney. pp. 29-50.
- Blake, J., (1990). Coconut (*Cocos nucifera* L.): micropropagation, en: Biotechnology in Agriculture and Forestry Vol. 10. Legumes and Oilseed Crops I, Bajaj, Y. P. S., (ed). Springer. Berlin. pp. 538-554.
- Blake, J., (1983b). Tissue culture propagation of coconut, date and oil Palm, en: Tissue Culture of Trees, Dodds, J. H., (ed). Springer. Boston, MA. pp. 29-50.
- Bourdeix, R., S. Adkins, V. Johnson, L. Perera y Sisunandar, (2020a). *In situ* and *ex situ* conservation of coconut genetic resources, en: Coconut Biotechnology: Towards the Sustainability of the "Tree of Life", Adkins, S., M. Foale, R. Bourdeix, Q. Nguyen y J. Biddle, (eds). Springer. Cham. pp. 51-75.
- Bourdeix, R., G. Coppens d'Eeckenbrugge, J. L. Konan, H. Novariant, C. Perera y V. L. F. Wolf, (2020b). Collecting coconut germplasm for disease resistance and other traits, en: Coconut Biotechnology: Towards the Sustainability of the "Tree of Life", Adkins, S., M. Foale, R. Bourdeix, Q. Nguyen y J. Biddle, (eds). Springer. Cham. pp. 77-99.
- Brackpool, A. L., R. L. Branton y J. Blake, (1984). Regeneration in palms, en: Cell culture and somatic cell genetics of plants. Vol. 3. Plant regeneration and genetic variability, Vasil, I. K., (ed). Academic Press, Inc. Orlando. pp. 207-222.
- Branton, R. L. y J. Blake (1983). Development of organized structures in callus derived from explants of *Cocos nucifera* L. *Annals of Botany*, 52, 673-678.
- Brzycki, C. M., E. M. Young y S. C. Roberts, (2021). Secondary metabolite production in plant cell culture: A new epigenetic frontier, en: Exploring Plant Cells for the Production of Compounds of Interest, Malik, S., (ed). Springer. Cham. pp. 1-37.
- Burns, J. A. y H. Y. Wetzstein (1997). Development and characterization of embryogenic suspension cultures of pecan. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 48, 93-102.
- Butenko, R. G., A. K. Lipsky, N. D. Chernyak y H. C. Arya (1984). Changes in culture medium pH by cell suspension cultures of *Dioscorea deltoidea*. *Plant Science Letters*, 35, 207-212.
- Cannon, S. B., H. Zhu, A. M. Baumgarten, R. Spangler, G. May, D. R. Cook y N. D. Young (2002). Diversity, distribution, and ancient taxonomic relationships within the TIR and Non-TIR NBS-LRR resistance gene subfamilies. *Journal of Molecular Evolution*, 54, 548-562.
- Carrillo Ramírez, H. y J. P. Razo, (1990). Situación actual del amarillamiento letal en el sureste de México, en: La Problemática del Amarillamiento Letal del Cocotero en México, Robert, M. y D. Zizumbo, (eds). CICY. Mérida. pp. 69-93.

- Chan, J. L., L. Sáenz-Carbonell, C. R. Talavera-May, R. Hornung, M. Robert y C. Oropeza (1998). Regeneration of coconut (*Cocos nucifera* L.) from plumule explants through somatic embryogenesis. *Plant Cell Reports*, 17, 515-521.
- Chandler, J. W. y W. Werr (2015). Cytokinin-auxin crosstalk in cell type specification. *Trends in Plant Science*, 20, 291-300.
- Chidambaram, A. y I. L. Henry (1976). Inheritance studies on the phyllotaxy of coconut palm. *Ceylon Coconut Quarterly*, 27, 22-24.
- Child, R. (1974). *Coconuts*, Longman, London. 216 p.
- Coles, G. D., D. J. Abernethy, M. C. Christey, A. J. Conner y B. K. Sinclair (1991). Monitoring hairy-root growth by image analysis. *Plant Molecular Biology Reporter*, 9, 13-20.
- Collin, H. A. y S. Edwards (1998). *Plant cell culture*, Springer, New York. 158 p.
- Conger, B. V., (1981). Cloning agricultural plants via *in vitro* techniques, en: *Cloning Agricultural Plants via in vitro Techniques*, Conger, B. V., (ed). CRC Press. Boca Ratón, Florida. pp. 1-4.
- Coppens d'Eeckenbrugge, G., N. T. K. Duong y A. Ullivari, (2018). Where we are today?, en: *A global strategy for the conservation and use of coconut genetic resources 2018-2028*, Bourdeix, R. y A. Prades, (eds). Biodiversity International; CIRAD; COGENT. Montpellier. pp. 71-74.
- Cordova, I., C. Oropeza, H. Almeyda y N. A. Harrison (2000). First report of a phytoplasma-associated leaf yellowing syndrome of palma jipi plants in southern Mexico. *Plant Disease*, 84, 807.
- Crowther, A., L. Lucas, R. Helm, M. Horton, C. Shipton, H. T. Wright, S. Walshaw, M. Pawlowicz, C. Radimilahy, K. Douka, L. Picornell-Gelabert, D. Q. Fuller y N. L. Boivin (2016). Ancient crops provide first archaeological signature of the westward Austronesian expansion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113, 6635-6640.
- Cui, X. (2017). Targeted gene editing using CRISPR/Cas9 in a wheat protoplast system, University of Ottawa, Ottawa. 152 p.
- Cutter Jr., V. M. y K. S. Wilson (1954). Effect of coconut endosperm and other growth stimulants upon the development *in vitro* of embryos of *Cocos nucifera*. *Botanical Gazette*, 115, 234-240.
- Davis, B. D., R. Dulbecco, H. N. Eisen, H. S. Ginsberg, W. B. Wood y M. McCarty (1978). *Tratado de Microbiología. Con Inclusión de Inmunología y Genética Molecular*, Salvat Editores, S.A., Barcelona. 1559 p.
- Davis, T. A., A. P. Anandan y K. P. V. Menon (1954). Hermaphroditism in *Cocos nucifera* L. *Indian Coconut Journal*, 7, 133-142.
- Davis, T. A. (1962). Asymmetry and yield in *Cocos nucifera* L. *Experientia*, 18, 321-322.

- Davis, T. A. (1969). Prospects of clonal propagation of the coconut. *Ceylon Coconut Planters Review*, 6, 1-5.
- De Jong, A. J., T. Hendriks, E. A. Meijer, M. Penning, F. LoSchiavo, M. Terzi, A. Van Kammen y S. C. De Vries (1995). Transient reduction in secreted 32 kD chitinase prevents somatic embryogenesis in the carrot (*Daucus carota* L.) variant *ts11*. *Developmental Genetics*, 16, 332-343.
- Dhonukshe, P., H. Tanaka, T. Goh, K. Ebine, A. P. Mahonen, K. Prasad, I. Blilou, N. Geldner, J. Xu, T. Uemura, J. Chory, T. Ueda, A. Nakano, B. Scheres y J. Friml (2008). Generation of cell polarity in plants links endocytosis, auxin distribution and cell fate decisions. *Nature*, 456, 962-966.
- Dixon, R. A., (1985). Isolation and maintenance of callus and cell suspension cultures, en: *Plant Cell Culture. A Practical Approach*, Dixon, R. A., (ed). IRL Press. Oxford. pp. 1-20.
- Dransfield, J., N. W. Uhl, C. B. Asmussen, W. J. Baker, M. M. Harley y C. E. Lewis (2008). *Genera Palmarum-The evolution and classification of the palms*, Royal Botanic Gardens, Kew, London. 732 p.
- Duarte-Aké, F., G. Nic-Can y C. De-la-Peña, (2019). Somatic embryogenesis: Polycomb complexes control cell-to-embryo transition, en: *Epigenetics in Plants of Agronomic Importance: Fundamentals and Applications: Transcriptional Regulation and Chromatin Remodelling in Plants*, Alvarez-Venegas, R., C. De la Peña y J. A. Casas-Mollano, (eds). Springer. Cham. pp. 339-354.
- Dwyer, R. E. P. (1938). Coconut improvement by seed selection and plant breeding. *New Guinea Agricultural Gazette*, 4, 24-102.
- Eeuwens, C. J. (1976). Mineral requirements for growth and callus initiation of tissue explants excised from mature coconut palms (*Cocos nucifera*) and cultured *in vitro*. *Physiologia Plantarum*, 36, 23-28.
- Endt, D. y B. Hayward (1997). Modern relatives of New Zealand's fossil coconuts from high altitude South America. *New Zealand Geological Society Newsletter*, 113, 67-70.
- Engelmann, F. y J. Dereuddre (1988). Effects du milieu de culture sur la production d'embryoides destinés à la cryoconservation chez le palmier à huile (*Elaeis guineensis* Jacq.). *Comptes Rendus de l'Academie des Sciences - Series III - Sciences de la Vie*, 306, 515-520.
- Escamilla, J. A., N. A. Harrison, H. Nuñez, L. Alpizar, I. Cordova, I. Islas-Flores y C. Oropeza, (1995). Practical use of DNA probes for the detection of lethal yellowing of *Cocos nucifera* L. in México, en: *Lethal Yellowing: Research and Practical Aspects*, Oropeza, C., F. W. Howard y G. R. Ashburner, (eds). Springer. Dordrecht. pp. 93-99.
- Escobedo-GraciaMedrano, R. M. y M. d. L. Miranda-Ham (2003). Analysis of elicitor induced cell viability changes in *Lycopersicon esculentum* Mill suspension culture

- by different methods. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 39, 236-239.
- Fernando, S. C. y C. K. A. Gamage (2000). Abscisic acid induced somatic embryogenesis in immature embryo explants of coconut (*Cocos nucifera* L.). *Plant Science*, 151, 193-198.
- Fisher, J. B. y J. H. Tsai (1978). *In vitro* growth of embryos and callus of coconut palm. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 14, 307-311.
- Foale, M., J. Biddle, A. Bazrafshan y S. Adkins, (2020). Biology, ecology, and evolution of coconut, en: *Coconut Biotechnology: Towards the Sustainability of the "Tree of Life"*, Adkins, S., M. Foale, R. Bourdeix, Q. Nguyen y J. Biddle, (eds). Springer. Cham. pp. 17-27.
- Friedman, W. E. y J. H. Williams (2004). Developmental evolution of the sexual process in ancient flowering plant lineages. *The Plant Cell*, 16, S119-S132.
- Friml, J., E. Benková, U. Mayer, K. Palme y G. Muster (2003a). Automated whole mount localisation techniques for plant seedlings. *The Plant Journal*, 34, 115-124.
- Friml, J., E. Benková, I. Blilou, J. Wisniewska, T. Hamann, K. Ljung, S. Woody, G. Sandberg, B. Scheres, G. Jürgens y K. Palme (2002). AtPIN4 mediates sink-driven auxin gradients and root patterning in *Arabidopsis*. *Cell*, 108, 661-673.
- Friml, J., A. Vieten, M. Sauer, D. Weijers, H. Schwarz, T. Hamann, R. Offringa y G. Jurgens (2003b). Efflux-dependent auxin gradients establish the apical-basal axis of *Arabidopsis*. *Nature*, 426, 147-153.
- Fuentes-Cerda, C. F. J., M. Monforte-González, M. Méndez-Zeel, R. Rojas-Herrera y V. M. Loyola-Vargas (2001). Modification of the embryogenic response of *Coffea arabica* by nitrogen source. *Biotechnology Letters*, 23, 1341-1343.
- Fujimura, T. y A. Komamine (1979). Synchronization of somatic embryogenesis in a carrot cell suspension culture. *Plant Physiology*, 64, 162-164.
- Galaz-Ávalos, R. M., S. Aguilar-Díaz, P. A. Xool-González, S. M. M. Huchín-May y V. M. Loyola-Vargas, (2012). Callus, suspension culture, and hairy roots. Induction, maintenance and characterization, en: *Plant Cell Culture Protocols, Methods in Molecular Biology*. Vol. 877, Loyola-Vargas, V. M. y N. Ochoa-Alejo, (eds). Humana Press. Heidelberg. pp. 29-40.
- Gallei, M., C. Luschnig y J. Friml (2020). Auxin signalling in growth: Schrödinger's cat out of the bag. *Current Opinion in Plant Biology*, 53, 43-49.
- Gamborg, O. L., R. A. Miller y K. Ojima (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.*, 50, 151-158.
- Gangolly, S. R., K. Satyabalan y K. M. Pandalai (1957). Varieties of the coconut. *Coconut Journal*, 10, 3-28.

- Garcês, H. M. P. y N. Sinha (2009). The 'mother of thousands' (*Kalanchoë daigremontiana*): A plant model for asexual reproduction and CAM studies. *Cold Spring Harbor Protocols*, 4, 1-9.
- George, E. F., M. A. Hall y G. J. D. Klerk, (2008). Stock plant physiological factors affecting growth and morphogenesis, en: *Plant Propagation by Tissue Culture: Volume 1. The Background*, George, E. F., M. A. Hall y G. J. D. Klerk, (eds). Springer. Dordrecht. pp. 403-422.
- Ghose, M. (1979). Ontogenetic study of stomata and trichomes in some palms [India]. *Phytomorphology*, 29, 26-33.
- Gomez-Navarro, C., C. Jaramillo, F. Herrera, S. L. Wing y R. Callejas (2009). Palms (Arecaceae) from a Paleocene rainforest of northern Colombia. *American Journal of Botany*, 96, 1300-1312.
- Großkinsky, D. K. y J. Petrášek (2019). Auxins and cytokinins - the dynamic duo of growth-regulating phytohormones heading for new shores. *New Phytologist*, 221, 1187-1190.
- Gunn, B. F. (2004). The phylogeny of the Cocoeae (Arecaceae) with emphasis on *Cocos nucifera*. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 91, 505-522.
- Gunn, B. F., L. Baudouin, T. Beulé, P. Ilbert, C. Duperray, M. Crisp, A. Issali, J. L. Konan y A. Rival (2015). Ploidy and domestication are associated with genome size variation in palms. *American Journal of Botany*, 102, 1625-1633.
- Gutierrez, E., P. Gallego, A. Alonso, A. Blazquez, L. Martin, J. Fernandez, L. Dominguez, C. Rioja, H. Guerra y N. Villalobos (2010). Nitrogen compounds in embryogenic and non-embryogenic calluses of *Medicago arborea* L. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 46, 257-264.
- Haberlandt, G. (1902). Kulturversuche mit isolierten pflanzenzellen. *Sber. Akad. Wiss. Wein.*, 111, 69-92.
- Hahlbrock, K. y E. Kuhlen (1972). Relationship between growth of parsley and soybean cells in suspension cultures and changes in the conductivity of the culture medium. *Planta*, 108, 271-278.
- Hall, R. D., (1991a). The initiation and maintenance of callus cultures of carrot and tobacco, en: *Plant tissue culture manual. Supplement 3*, Lindsey, K., (ed). Kluwer Academic Publishers. The Netherlands. pp. 1-19.
- Hall, R. D., (1991b). The initiation and maintenance of plant cell suspension cultures, en: *Plant tissue culture manual. Supplement 3*, Lindsey, K., (ed). Kluwer Academic Publishers. The Netherlands. pp. 1-21.
- Harries, H. C. (1978). The evolution, dissemination and classification of *Cocos nucifera* L. *The Botanical Review*, 44, 265-319.
- Harries, H. C. (1979). Making and using a collection of coconut varieties [in Jamaica]. *Philippine Journal of Coconut Studies (Philippines)*, 4, 19-23.

- Harries, H. C. (1981). Practical identification of coconut varieties. *Oleagineux*, 36, 63-72.
- Harries, H. C., A. Thirakul y V. Rattanaprak (1982). The coconut genetic resources of thailand. *Thai Journal of Agricultural Science*, 141, 156.
- Harries, H. C., (1990). Malesian origin for a domestic *Cocos nucifera*, en: *The Plant Diversity of Malesia*, Baas, P., K. Kalkman y R. Geesink, (eds). Springer. Dordrecht. pp. 351-357.
- Harries, H. C. (1992). Biogeography of the coconut *Cocos nucifera* L. *Principes*, 36, 155-162.
- Harries, H. C., (1995). Coconut, palmae, en: *Evolution of crop plants*, Smartt, J. y N. W. Simmonds, (eds). Wiley. pp. 389-394.
- Harrison, N., M. Narvaez, H. Almeyda, I. Cordova, M. Carpio y C. Oropeza (2002). First report of group 16SrIV phytoplasmas infecting coconut palms with leaf yellowing symptoms on the Pacific coast of Mexico. *Plant Pathology*, 51, 808.
- Hayward, B., P. Moore y G. Gibson (1990). How warm was the late Oligocene in New Zealand? *Geological Society of New Zealand Newsletter*, 90, 39-41.
- Huang, C.-N., M. J. Cornejo, D. S. Bush y R. L. Jones (1986). Estimating viability of plant protoplasts using double and single staining. *Protoplasma*, 135, 80-87.
- Hulst, A. C., M. M. T. Meyer, H. Breteler y J. Tramper (1989). Effect of aggregate size in cell cultures of *Tagetes patula* on thiophene production and cell growth. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 30, 18-25.
- Islas-Flores, I., J. L. Chan, C. Oropeza y S. M. T. Hernández-Sotomayor (2000). Occurrence of phosphorylated proteins and kinase activity in coconut tissues cultured *in vitro* in a medium that induces somatic embryogenesis. *Plant Physiology and Biochemistry*, 38, 825-836.
- Iyer, R., M. Gunasekharan y V. Hegde, (2018). Coconut: Maladies and Remedies, en: *The Coconut Palm (Cocos nucifera L.) - Research and Development Perspectives*, Krishnakumar, V., P. K. Thampan y M. A. Nair, (eds). Springer. Singapore. pp. 489-518.
- James, E. y J. M. Lee (2000). An improved optical technique for monitoring plant cell concentration. *Plant Cell Reports*, 19, 283-285.
- Janick, J. y R. E. Paull, (2008). *The Encyclopedia of Fruit & Nuts*, en: *The Encyclopedia of Fruit & Nuts*, Janick, J. y R. E. Paull, (eds). CABI. Wallingford, UK. pp. 107-118.
- Jayasekhar, S. y K. P. Chandran, (2021). World economic importance, en: *The Coconut Genome*, Rajesh, M. K., S. V. Ramesh, L. Perera y C. Kole, (eds). Springer. Cham. pp. 1-12.
- Jerard, B. A., M. K. Rajesh, R. J. Thomas, V. Niral y K. Samsudeen (2017). Island ecosystems host rich diversity in coconut (*Cocos nucifera*): Evidences from Minicoy Island, India. *Agricultural Research*, 6, 214-226.

- Jerard, B. A., V. Niral y M. K. Rajesh, (2021). Breeding strategies, en: The Coconut Genome, Rajesh, M. K., S. V. Ramesh, L. Perera y C. Kole, (eds). Springer. Cham. pp. 47-76.
- Kalaipandian, S., Z. Mu, E. Y. Y. Kong, J. Biddle, R. Cave, A. Bazrafshan, K. Wijayabandara, F. C. Beveridge, Q. Nguyen y S. W. Adkins (2021). Cloning coconut via somatic embryogenesis: A review of the current status and future prospects. *Plants*, 10, 2050.
- Karun, A., S. V. Ramesh, M. K. Rajesh, V. Niral, R. Sudha y K. S. Muralikrishna, (2022a). Conservation and Utilization of Genetic Diversity in Coconut (*Cocos nucifera* L.), en: Cash Crops: Genetic Diversity, Erosion, Conservation and Utilization, Priyadarshan, P. M. y S. M. Jain, (eds). Springer. Cham. pp. 197-250.
- Karun, A. y V. Niral, (2019). Coconut genetic resources, en: Conservation and Utilization of Horticultural Genetic Resources, Rajasekharan, P. E. y V. R. Rao, (eds). Springer Singapore. Singapore. pp. 251-282.
- Karun, A., S. V. Ramesh, M. K. Rajesh, V. Niral, R. Sudha y K. S. Muralikrishna, (2022b). Conservation and utilization of genetic diversity in coconut (*Cocos nucifera* L.), en: Cash Crops: Genetic Diversity, Erosion, Conservation and Utilization, Priyadarshan, P. M. y S. M. Jain, (eds). Springer. Cham. pp. 197-250.
- Karunaratne, S. y K. Periyapperuma (1989). Culture of immature embryos of coconut, *Cocos nucifera* L.: Callus proliferation and somatic embryogenesis. *Plant Science*, 62, 247-253.
- Kaul, K. N. (1951). A palm fruit from Kapurdi (Jodhpur, Rajasthan Desert) *Cocos sahnii* sp. nov. *Current Science*, 20, 138.
- King, P. J., (1984). Induction and maintenance of cell suspension cultures, en: Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants, Vasil, I. K., (ed). Academic Press. Orlando. pp. 130-138.
- Krikorian, A. D. y L. K. Simola (1999). Totipotency, somatic embryogenesis, and Harry Waris (1893-1973). *Physiologia Plantarum*, 105, 348-355.
- Krishnajumar, V., P. K. Thampan y M. Achuthan Nair (2019). El cocotero (*Cocos nucifera* L.)-Perspectivas de investigación y desarrollo, Springer, Singapur.,
- Krishnakumar, V., P. K. Thampan y M. A. Nair (2018). The Coconut Palm (*Cocos nucifera* L.)- Research and Development Perspectives, Springer, Singapore. 834 p.
- Lakshmi Jayaraj, K., U. Bhavyashree, T. P. Fayas, K. K. R. Sajini y A. Karun (2016). Histological studies of cellular differentiation during somatic embryogenesis of coconut plumule-derived calli. *Journal of Plantation Crops*, 43, 196-203.
- Lee, T. T. y F. Skoog (1965). Effect of substituted phenols on bud formation and growth of tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*, 18, 386-402.
- Lepofsky, D., H. C. Harries y M. Kellum (1992). Early coconuts on Mo'orea Island, French Polynesia. *The Journal of the Polynesian Society*, 101, 299-308.

- Leyser, O. (2018). Auxin signaling. *Plant Physiology*, 176, 465-479.
- Liyanage, D. V. (1958). Varieties and forms of the coconut palm grown in Ceylon. *Ceylon Coconut Quarterly*, 9, 1-10.
- Lo Schiavo, F., G. Giuliano y Z. R. Sung (1988). Characterization of a temperature-sensitive carrot cell mutant impaired in somatic embryogenesis. *Plant Science*, 54, 157-164.
- Lo Schiavo, F., G. Giuliano, S. C. De Vries, A. Genga, R. Bollini, L. Pitto, F. Cozzani, V. Nuti-Ronchi y M. Terzi (1990). A carrot cell variant temperature sensitive for somatic embryogenesis reveals a defect in the glycosylation of extracellular proteins. *Molecular and General Genetics*, 223, 385-393.
- Londenberg, A., F. M. Bartels, J. K. Quaye, J. Boch, T. Ripken y D. Heinemann, (2020). Targeted genome editing in potato protoplast via optical delivery of CRISPR/Cas9 ribonucleoproteins, en: *Nanophotonics VIII*, Andrews, D. L., A. J. Bain, M. Kauranen y J.-M. Nunzi, (eds). International Society for Optics and Photonics. pp. 1134527.
- Lopes, M. A. y B. A. Larkins (1993). Endosperm origin, development, and function. *The Plant Cell*, 5, 1383-1399.
- Louis, H. y K. Balasubramaniam, (1983). Effect of cultural practices, irrigation and manuring on the development of root systems in the coconut palm, en: *Coconut Research and Development*, Nayar, N. M., (ed). Wiley Eastern Ltd. New Delh. pp. 293-295.
- Loyola-Vargas, V. M., C. De-la-Peña, R. M. Galaz-Ávalos y F. R. Quiroz-Figueroa, (2008). Plant tissue culture, en: *Molecular Biomethods Handbook*, Walker, J. M. y R. Rapley, (eds). Humana Press. Totowa. pp. 875-904.
- Loyola-Vargas, V. M., (2016). The history of somatic embryogenesis, en: *Somatic Embryogenesis. Fundamental Aspects and Applications*, Loyola-Vargas, V. M. y N. Ochoa-Alejo, (eds). Springer. Switzerland. pp. 11-22.
- Loyola-Vargas, V. M. y N. Ochoa-Alejo, (2016). Somatic embryogenesis. An overview, en: *Somatic Embryogenesis. Fundamental Aspects and Applications*, Loyola-Vargas, V. M. y N. Ochoa-Alejo, (eds). Springer. Switzerland. pp. 1-10.
- Loyola-Vargas, V. M. y N. Ochoa-Alejo, (2018). An introduction to plant tissue culture: Advances and perspectives, en: *Plant Cell Culture Protocols*, Loyola-Vargas, V. M. y N. Ochoa-Alejo, (eds). Springer New York. New York, NY. pp. 3-13.
- Loyola-Vargas, V. M., A. L. Rodríguez-Piña, R. E. Márquez-López, R. N. Avilez-Montalvo y G. I. Nic-Can, (2019). La embriogénesis somática. Una herramienta del presente y para el futuro de la biotecnología vegetal. Un acercamiento teórico, en: *Avances y Perspectivas de la Biotecnología en la Península de Yucatán*, Zamora-Bustillos, R. y J. J. Sandoval-Gio, (eds). Sociedad Mexicana de Biotecnología. Mérida, Yuc. pp. 547-597.

- Madhusudhan, R., S. R. Rao y G. A. Ravishankar (1995). Osmolarity as a measure of growth of plant cells in suspension cultures. *Enzyme and Microbial Technology*, 17, 989-991.
- MagnaVal, C., M. Noirod, J. L. Verdeil, A. Blattes, C. Huet, F. Grosdemange y J. Buffard-Morel (1995). Free amino acid composition of coconut (*Cocos nucifera* L.) calli under somatic embryogenesis induction conditions. *Journal of Plant Physiology*, 146, 155-161.
- Meerow, A. W., L. Noblick, J. W. Borrone, T. L. Couvreur, M. Mauro-Herrera, W. J. Hahn y R. J. Schnell (2009). Phylogenetic analysis of seven WRKY genes across the palm subtribe Attaleinae (Arecaceae) identifies *Syagrus* as sister group of the coconut. *PLoS ONE*, 4, e7353.
- Meerow, A. W., L. Noblick, D. E. Salas-Leiva, V. Sanchez, J. Francisco-Ortega, B. Jestrow y K. Nakamura (2015). Phylogeny and historical biogeography of the cocosoid palms (Arecaceae, Arecoideae, Cocoseae) inferred from sequences of six WRKY gene family loci. *Cladistics*, 31, 509-534.
- Mills, D. R. y J. M. Lee (1996). A simple, accurate method for determining wet and dry weight concentrations of plant cell suspension cultures using microcentrifuge tubes. *Plant Cell Reports*, 15, 634-636.
- Mohanlall, V. (2020). Plant cell culture systems for the production of secondary metabolites - A review. *Journal of Biotechnology and Biochemistry*, 6, 35-47.
- Montero-Cortés, M., L. Sáenz-Carbonell, I. Córdova, A. Quiroz, J.-L. Verdeil y C. Oropeza (2010a). GA₃ stimulates the formation and germination of somatic embryos and the expression of a KNOTTED-like homeobox gene of *Cocos nucifera* (L.). *Plant Cell Reports*, 29, 1049-1059.
- Montero-Cortés, M., F. Rodríguez-Paredes, C. Burgeff, T. Pérez-Nuñez, I. Córdova, C. Oropeza, J. L. Verdeil y L. Sáenz (2010b). Characterisation of a cyclin-dependent kinase (CDKA) gene expressed during somatic embryogenesis of coconut palm. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 102, 251-258.
- Mora-Aguilera, G., J. Flores-Sánchez, G. Acevedo-Sánchez, S. Domínguez-Monge, C. Oropeza-Salín, A. Flores-Olivas, R. González-Gómez y P. Robles-García (2014). Vigilancia epidemiológica y estatus actual del amarillamiento letal del cocotero, punta morada de la papa y huanglongbing de los cítricos (HLB) en México. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 32, 120-131.
- Morris, P. y M. W. Fowler (1981). A new method for the production of fine plant cell suspension cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1, 15-24.
- Moscatiello, R., B. Baldan y L. Navazio, (2013). Plant cell suspension cultures, en: *Plant Mineral Nutrients*, Maathuis, F. J. M., (ed). Humana Press. New York Heidelberg Dordrecht London. pp. 77-93.
- Mravec, J., M. Kubes, A. Bielach, V. Gaykova, J. Petrášek, P. Skupa, S. Chand, E. Benková, E. Zazimalová y J. Friml (2008). Interaction of PIN and PGP transport

- mechanisms in auxin distribution-dependent development. *Development*, 135, 3345-3354.
- Murashige, T. y F. Skoog (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15, 473-497.
- Mustafa, N. R., W. De Winter, F. Van Iren y R. Verpoorte (2011). Initiation, growth and cryopreservation of plant cell suspension cultures. *Nature Protocols*, 6, 715-742.
- Naing, A. H., O. S. Adedeji y C. K. Kim (2021). Protoplast technology in ornamental plants: Current progress and potential applications on genetic improvement. *Scientia Horticulturae*, 283, 110043.
- Nair, R. V., P. M. Jacob y R. Ajithkumar (2004). Screening of coconut varieties against root (wilt) disease. *Journal of Plantation Crops*, 32, 50-51.
- Nampoothiri, K. U. K. y V. A. Parthasarathy, (2018). Varietal Improvement, en: *The Coconut Palm (Cocos nucifera L.) - Research and Development Perspectives*, Krishnakumar, V., P. K. Thampan y M. A. Nair, (eds). Springer. Singapore. pp. 113-156.
- Narayana, G. V. y C. M. John (1949). Varieties and forms of coconut. *The Madras Agricultural Journal*, 36, 349-366.
- Nayar, N. M. (2017). *The coconut. Phylogeny, Origins, and Spread*, Elsevier, San Diego, CA. 223 p.
- Nguyen, Q. T., H. D. D. Bandupriya, A. López-Villalobos, S. Sisunandar, M. Foale y S. W. Adkins (2015). Tissue culture and associated biotechnological interventions for the improvement of coconut (*Cocos nucifera L.*): a review. *Planta*, 242, 1059-1076.
- Nic-Can, G. I., J. R. Avilez-Montalvo, R. N. Avilez-Montalvo, R. E. Márquez-López, E. Mellado-Mojica, R. M. Galaz-Ávalos y V. M. Loyola-Vargas, (2016). The relationship between stress and somatic embryogenesis, en: *Somatic Embryogenesis. Fundamental Aspects and Applications*, Loyola-Vargas, V. M. y N. Ochoa-Alejo, (eds). Springer. Switzerland. pp. 151-170.
- Nicoloso, F. T., J. Val, M. Van der Keur, F. Van Iren y J. W. Kijne (1994). Flow-cytometric cell counting and DNA estimation for the study of plant cell population dynamics. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 39, 251-259.
- Niral, V., B. A. Jerard, K. V. Kavitha, K. Samsudeen y R. V. Nair (2008). Variability and association among floral traits and pollen recovery in coconut (*Cocos nucifera L.*). *Journal of Plant Crops*, 36, 186-191.
- Niral, V. y B. A. Jerard, (2018). Botany, Origin and Genetic Resources of Coconut, en: *The Coconut Palm (Cocos nucifera L.) - Research and Development Perspectives*, Krishnakumar, V., P. K. Thampan y M. A. Nair, (eds). Springer. Singapore. pp. 57-111.

- Niral, V., B. A. Jerard y M. K. Rajesh, (2021). Germplasm resources: Diversity and conservation, en: *The Coconut Genome*, Rajesh, M. K., S. V. Ramesh, L. Perera y C. Kole, (eds). Springer. Cham. pp. 27-46.
- Nutman, F. J. y F. M. Roberts (1955). Lethal yellowing: the "unknown disease" of coconut palms in Jamaica. *Empire Journal of Experimental Agriculture*, 23, 257-267.
- Olofsdotter, M. (1993). Image processing: A non-destructive method for measuring growth in cell and tissue culture. *Plant Cell Reports*, 12, 216-219.
- Oropeza, C. M., J. A. Escamilla, G. Mora, D. Zizumbo y N. Harrison, (2005). Coconut lethal yellowing, en: *Status of Coconut Genetic Resources*, Batugal, P., R. Rao y J. Oliver, (eds). IPGRI-APO. Serdang, Malaysia. pp. 349-363.
- Oropeza-Salín, C., L. Sáenz, M. Narvaez, G. Nic-Matos, I. Córdova, W. Myrie, C. F. Ortíz y E. Ramos, (2020). Dealing with lethal yellowing and related diseases in coconut, en: *Coconut Biotechnology: Towards the Sustainability of the "Tree of Life"*, Adkins, S., M. Foale, R. Bourdeix, Q. Nguyen y J. Biddle, (eds). Springer. Cham. pp. 169-197.
- Osorio-Montalvo, P., C. De-la-Peña, C. Oropeza, G. Nic-Can, I. Córdova-Lara, E. Castillo-Castro y L. Sáenz-Carbonell (2020). A peak in global DNA methylation is a key step to initiate the somatic embryogenesis of coconut palm (*Cocos nucifera* L). *Plant Cell Reports*, 39, 1345-1357.
- Padmanabhan, D. (1963). Leaf development in palms. *Current Science*, 32, 537-539.
- Padmanabhan, D. (1984). Ontogeny of plications in palm leaf - a new theory. *Journal of the Swamy Botanical Club*, 1, 59-67.
- Pateña, L. F., L. R. Carlos-Refuerzo y R. C. Barba (2002). Somatic embryogenesis and plantlet regeneration in mango (*Mangifera indica* L.). *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 38, 173-177.
- Patrick, J. W. y C. E. Offler (2001). Compartmentation of transport and transfer events in developing seeds. *Journal of Experimental Botany*, 52, 551-564.
- Perera, C., H. D. D. Bandupriya, R. J. Thomas y R. Bourdeix, (2020a). Diversity studies using molecular markers, en: *Coconut Biotechnology: Towards the Sustainability of the "Tree of Life"*, Adkins, S., M. Foale, R. Bourdeix, Q. Nguyen y J. Biddle, (eds). Springer. Cham. pp. 101-122.
- Perera, L. y R. Manimekalai, (2021). Characterization of genetic diversity using molecular markers, en: *The Coconut Genome*, Rajesh, M. K., S. V. Ramesh, L. Perera y C. Kole, (eds). Springer. Cham. pp. 77-90.
- Perera, P. I. P., V. R. M. Vidhanaarachchi, T. R. Gunathilake, D. M. D. Yakandawala, V. Hoher, J. L. Verdeil y L. K. Weerakoon (2009). Effect of plant growth regulators on ovary culture of coconut (*Cocos nucifera* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 99, 73-81.

- Perera, P. I. P., K. F. Motha y V. R. M. Vidhanaarchchi (2020b). Morphological and histological analysis of anther-derived embryos of coconut (*Cocos nucifera* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 140, 685-689.
- Perera, P. I. P. y V. R. M. Vidhanaararchchi, (2021). Anther culture in coconut (*Cocos nucifera* L.), en: *Doubled Haploid Technology: Volume 3: Emerging Tools, Cucurbits, Trees, Other Species*, Seguí-Simarro, J. M., (ed). Springer. New York, NY. pp. 167-178.
- Perera, P. I. P., R. Pathirana y V. R. M. Vidhanaarchchi (2021). Somatic embryogenesis in anther-derived fast-growing callus as a long-term source for doubled-haploid production of coconut (*Cocos nucifera* L.). *Journal of the National Science Foundation of Sri Lanka*, 49, 505-515.
- Perera, P. I. P., V. Hocher, J. L. Verdeil, S. Doulebeau, D. M. D. Yakandawala y L. K. Weerakoon (2007). Unfertilized ovary: a novel explant for coconut (*Cocos nucifera* L.) somatic embryogenesis. *Plant Cell Reports*, 26, 21-28.
- Pérez-Núñez, M. T., J. L. Chan, L. Sáenz, T. González, J. L. Verdeil y C. Oropeza (2006). Improved somatic embryogenesis from *Cocos nucifera* (L.) plumule explants. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 42, 37-43.
- Pérez-Núñez, M. T., R. Souza, L. Sáenz, J. L. Chan, J. J. Zúñiga-Aguilar y C. Oropeza (2009). Detection of a SERK-like gene in coconut and analysis of its expression during the formation of embryogenic callus and somatic embryos. *Plant Cell Reports*, 28, 11-19.
- Periasamy, K. (1965). Morphological and ontogenetic studies in Palms. II. Growth pattern of the leaves of *Cocos nucifera* and *Borassus flabellifer* after the initiation of applications. *Australian Journal of Botany*, 13, 225-234.
- Petrášek, J. y J. Friml (2009). Auxin transport routes in plant development. *Development*, 136, 2675-2688.
- Phillips, G. C., J. F. Hubstenberger y E. E. Hansen, (1995). Plant regeneration by organogenesis from callus and cell suspension cultures, en: *Plant cell, tissue and organ culture. Fundamental methods*, Gamborg, O. L. y G. C. Phillips, (eds). Springer-Verlag. Germany. pp. 67-79.
- Popova, E. V., A. V. Nosov, M. V. Titova, D. V. Kochkin, A. A. Fomenkov, I. E. Kulichenko y A. M. Nosov (2021). Advanced biotechnologies: Collections of plant cell cultures as a basis for development and production of medicinal preparations. *Russian Journal of Plant Physiology*, 68, 385-400.
- Powers, S. K. y L. C. Strader (2019). Regulation of auxin transcriptional responses. *Developmental Dynamics*, 249, 483-495.
- Prasad, M., E. G. Khare y S. K. Singh (2013). Plant fossils from the Deccan Intertrappean sediments of Chhindwara district, Madhya Pradesh, India: their palaeoclimatic significance. *Journal of Palaeontological Society India*, 58, 229-240.

- Prebble, M. y J. L. Dowe (2008). The late quaternary decline and extinction of palms on oceanic Pacific islands. *Quaternary Science Reviews*, 27, 2546-2567.
- Puch-Hau, C., C. Oropeza-Salín, S. Peraza-Echeverría, M. Gongora-Paredes, I. Córdova-Lara, M. Narvaez-Cab, D. Zizumbo-Villarreal y L. Sáenz-Carbonell (2015). Molecular cloning and characterization of disease-resistance gene candidates of the nucleotide binding site (NBS) type from *Cocos nucifera* L. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 89, 87-96.
- Puch-Hau, C., C. Oropeza, M. Góngora-Paredes, I. Córdova, J. Tun-Suárez y L. Sáenz (2016). New insights into the evolutionary history of resistance gene candidates in coconut palms and their expression profiles in palms affected by lethal yellowing disease. *Genes & Genomics*, 38, 793-807.
- Puch-Hau, C., C. Oropeza-Salín, S. Peraza-Echeverría, I. Córdova-Lara y L. Sáenz-Carbonell, (2021). Resistance gene candidates (RGCs) in coconut palm: A molecular platform for the genetic improvement of resistance to pathogens, en: *The Coconut Genome*, Rajesh, M. K., S. V. Ramesh, L. Perera y C. Kole, (eds). Springer. Cham. pp. 165-173.
- Purseglove, J. W. (1972). *Tropical Crops. Monocotyledons. Vol. 1, 2*, Longmans, Green and Co. Ltd., London. 607 p.
- Quiroz-Figueroa, F. R., M. Méndez-Zeel, A. Larqué-Saavedra y V. M. Loyola-Vargas (2001). Picomolar concentrations of salicylates induce cellular growth and enhance somatic embryogenesis in *Coffea arabica* tissue culture. *Plant Cell Reports*, 20, 679-684.
- Quiroz-Figueroa, F. R., M. Monforte-González, R. M. Galaz-Ávalos y V. M. Loyola-Vargas, (2006). Direct somatic embryogenesis in *Coffea canephora*, en: *Plant Cell Culture Protocols*, Loyola-Vargas, V. M. y F. A. Vázquez-Flota, (eds). Humana Press. Totowa, New Jersey. pp. 111-117.
- Radoeva, T. y D. Weijers (2014). A roadmap to embryo identity in plants. *Trends in Plant Science*, 19, 709-716.
- Rajesh, M. K., T. P. Fayas, S. Naganeeswaran, K. E. Rachana, U. Bhavyashree, K. K. Sajini y A. Karun (2015). *De novo* assembly and characterization of global transcriptome of coconut palm (*Cocos nucifera* L.) embryogenic calli using Illumina paired-end sequencing. *Protoplasma*, 253, 913-928.
- Rajesh, M. K., A. Karun y V. A. Parthasarathy, (2018a). Coconut Biotechnology, en: *The Coconut Palm (Cocos nucifera L.) - Research and Development Perspectives*, Krishnakumar, V., P. K. Thampan y M. A. Nair, (eds). Springer. Singapore. pp. 191-226.
- Rajesh, M. K., K. E. Rachana, K. Kulkarni, B. B. Sahu, R. J. Thomas y A. Karun (2018b). Comparative transcriptome profiling of healthy and diseased Chowghat Green Dwarf coconut palms from root (wilt) disease hot spots. *European Journal of Plant Pathology*, 151, 173-193.

- Rajesh, M. K., S. V. Ramesh y C. Kole, (2021a). Coconut: The tree of life-endless possibilities, en: *The Coconut Genome*, Rajesh, M. K., S. V. Ramesh, L. Perera y C. Kole, (eds). Springer. Cham. pp. 205-207.
- Rajesh, M. K., S. V. Ramesh, A. Karun y P. Chowdappa, (2021b). Genome sequencing, Transcriptomics, proteomics and metabolomics, en: *The Coconut Genome*, Rajesh, M. K., S. V. Ramesh, L. Perera y C. Kole, (eds). Springer. Cham. pp. 119-132.
- Regla-Márquez, C. F., S. A. Avilés-Viñas, A. Canto-Flick, L. S. Muñoz-Ramírez, L. P. Peña-Yam, R. E. Valle-Gough, P. M. Osorio-Montalvo, J. Pérez-Pastrana y N. Santana-Buzzy (2019). Genes involved in the deformations of the shoot apical meristem in somatic embryos of *Capsicum chinense* Jacq. *Journal of Genetics*, 98, 70.
- Reinert, J. (1959). Über die kontrolle der morphogenese und die induktion von adventivembryonen an gewebeulturen aus karotten. *Planta*, 53, 318-333.
- Rigby, J. F., (1995). A fossil *Cocos nucifera* L. fruit from the latest Pliocene of Queensland, Australia, en: Birbal Sahni centennial volume, Pant, D. D., (ed). Allahabad University, Allahabad, India/South Asian Publishers. Allahabad, India. pp. 379-381.
- Rivera-Solís, G., L. Sáenz-Carbonell, M. Narváez, G. Rodríguez y C. Oropeza (2018). Addition of ionophore A23187 increases the efficiency of *Cocos nucifera* somatic embryogenesis. *3 Biotech*, 8, 366.
- Robert, M. L., V. M. Loyola-Vargas y D. Zizumbo-Villarreal (1991). Lethal yellowing in Mexico. *Buro Trop*, 1, 13-14.
- Rose, D. y S. M. Martin (1975). Effect of ammonium on growth of plant cells (*Ipomoea sp.*) in suspension cultures. *Canadian Journal of Botany*, 53, 1942-1949.
- Sáenz, L., G. Herrera-Herrera, F. Uicab-Ballote, J. Chan y C. Oropeza (2010). Influence of form of activated charcoal on embryogenic callus formation in coconut (*Cocos nucifera*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 100, 301-308.
- Sáenz, L., R. Souza, J. L. Chan, A. Azpeitia y C. Oropeza (2005). ¹⁴C-2, 4-dichlorophenoxyacetic acid uptake and formation of embryogenic calli in coconut plumular explants cultured on activated charcoal-free media. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 28, 151-159.
- Sáenz, L., J. L. Chan, M. Narvaez y C. Oropeza, (2018). Protocol for the micropropagation of coconut from plumule explants, en: *Plant Cell Culture Protocols*, Loyola-Vargas, V. M. y N. Ochoa-Alejo, (eds). Springer. New York, NY. pp. 161-170.
- Sáenz-Carbonell, L., M. Montero-Cortés, T. Pérez-Nuñez, A. Azpeitia-Morales, A. Andrade-Torres, I. Córdova-Lara, J. L. Chan-Rodríguez, G. Sandoval-Cancino, G. Rivera-Solis y C. Oropeza-Salín, (2016). Somatic embryogenesis in *Cocos*

- nucifera* L., en: Somatic Embryogenesis: Fundamental Aspects and Applications, Loyola-Vargas, V. M. y N. Ochoa-Alejo, (eds). Springer. Cham. pp. 297-318.
- Sáenz-Carbonell, L., Q. Nguyen, A. López-Villalobos y C. Oropeza-Salín, (2020). Coconut micropropagation for worldwide replanting needs, en: Coconut Biotechnology: Towards the Sustainability of the 'Tree of Life', Adkins, S., M. Foale, R. Bourdeix, Q. Nguyen y J. Biddle, (eds). Springer. Cham. pp. 227-240.
- Salum, U., M. Foale, J. Biddle, A. Bazrafshan y S. Adkins, (2020). Towards the sustainability of the "Tree of Life": An introduction, en: Coconut Biotechnology: Towards the Sustainability of the "Tree of Life", Adkins, S., M. Foale, R. Bourdeix, Q. Nguyen y J. Biddle, (eds). Springer. Cham. pp. 1-15.
- Samsudeen, K., P. M. Jacob, V. Niral, P. M. Kumaran, R. Salooja y H. Moosa (2006). Exploration and Collection of Coconut Germplasm in Kadmat and Amini Islands of Lakshadweep, India. Genetic Resources and Crop Evolution, 53, 1721-1728.
- Schaller, G. E., A. Bishopp y J. J. Kieber (2015). The Yin-Yang of hormones: Cytokinin and auxin interactions in plant development. The Plant Cell, 27, 44-63.
- Schiavone, F. M. y M. E. Wisniewski (1990). Callus and cell suspension cultures from dormant stems of peach. HortScience, 25, 483.
- Shepard, J. (1982). The regeneration of potato plants from leaf-cell protoplasts. Scientific American, 264, 154-166.
- Shepard, J. F., D. Bidney y E. Shahin (1980). Potato protoplasts in crop improvement. Science, 208, 17-24.
- Shetty, K., D. Bothra, D. L. Crawford y R. A. Korus (1990). Extracellular peroxidases as indicators of growth in plant cell suspension cultures. Applied Biochemistry and Biotechnology, 24/25, 213-221.
- Singh, C. R. (2018). Review on problems and its remedy in plant tissue culture. Asian Journal of Biological Sciences, 11, 165-172.
- Sinha, A., S. Principe, J. Alfaro, A. Ignatchenko, V. Ignatchenko y T. Kislinger, (2018). Proteomic profiling of secreted proteins, exosomes, and microvesicles in cell culture conditioned media, en: The Surfaceome, Boheler, K. R. y R. L. Gundry, (eds). Springer. New York. pp. 91-102.
- Skalicky, V., M. Kubes, R. Napier y O. Novák (2018). Auxins and cytokinins-the role of subcellular organization on homeostasis. International Journal of Molecular Sciences, 19, 3115.
- Smith, R. H. (1992). Plant Tissue Culture. Techniques and Experiments, Academic Press, Inc., San Diego. 171 p.
- Solís-Ramos, L. Y., A. Andrade-Torres, L. A. Sáenz-Carbonell, C. Oropeza-Salín y E. Castaño de la Serna, (2012). Somatic embryogenesis in recalcitrant plants, en: Embryogenesis, Sato, K., (ed). InTech. Rijeka, Croatia. pp. 597-618.

- Solomon, J. J., V. Hegde, M. Babu y L. Geetha, (2018). Phytoplasmal diseases, en: The Coconut Palm (*Cocos nucifera* L.) - Research and Development Perspectives, Krishnakumar, V., P. K. Thampan y M. A. Nair, (eds). Springer. Singapore. pp. 519-556.
- Sowa, S. y L. E. Towill (1991). Infrared spectroscopy of plant cell cultures. Noninvasive measurement of viability. *Plant Physiology*, 95, 610-615.
- Srivastava, R. y G. Srivastava (2014). Fossil fruit of *Cocos* L. (Arecaceae) from Maastrichtian-Danian sediments of central India and its phylogeographical significance. *Acta Paleobotanica*, 54, 67-75.
- Steward, F. C., M. O. Mapes y K. Mears (1958). Growth and organized development of cultured cells. II. Organization in cultures grown from freely suspended cells. *American Journal of Botany*, 45, 705-708.
- Steward, N., R. Martin, J. M. Engasser y J. L. Goergen (1999). A new methodology for plant cell viability assessment using intracellular esterase activity. *Plant Cell Reports*, 19, 171-176.
- Street, H. E., (1977). Cell suspension cultures. Techniques, en: *Plant Tissue and Cell Culture*, Street, H. E., (ed). University of California Press. Oxford. pp. 61-102.
- Sudha, R., V. Niral y K. Samsudeen, (2021). Botanical study and cytology, en: *The Coconut Genome*, Rajesh, M. K., S. V. Ramesh, L. Perera y C. Kole, (eds). Springer. Cham. pp. 13-25.
- Sung, Z. R. (1976). Turbidimetric measurement of plant cell culture growth. *Plant Physiology*, 57, 460-462.
- Suzuki, T., T. Yoshioka, Y. Kato y Y. Fujita (1987). A new stimulation method for plant cell viability by determining electron transport activity. *Plant Cell Reports*, 6, 279-282.
- Swaminathan, M. S. y M. C. NAMBIAR (1961). Cytology and origin of the Dwarf coconut palm. *Nature*, 192, 85-86.
- Szabados, M., L. A. Mroginski y W. Roca, (1993). Suspensiones celulares: descripción, manipulación y aplicaciones, en: *Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Fundamentos y aplicaciones*, Roca, W. M. y L. A. Mroginski, (eds). CIAT. Cali. pp. 173-195.
- Thomas, R. J., M. Shareefa y R. V. Nair, (2018). Varietal Resistance in Coconut, en: *The Coconut Palm (Cocos nucifera* L.) - Research and Development Perspectives, Krishnakumar, V., P. K. Thampan y M. A. Nair, (eds). Springer. Singapore. pp. 157-190.
- Thorpe, T. A. (1980). Organogenesis *in vitro*: Structural, physiological and biochemical aspects. *International Review of Cytology Supplement*, 11A, 71-111.
- Tymon, A. M., P. Jones y N. A. Harrison (1998). Phylogenetic relationships of coconut phytoplasmas and the development of specific oligonucleotide PCR primers. *Annals of Applied Biology*, 132, 437-452.

- Uc-Chuc, M. Á., C. A. Pérez-Hernández, R. M. Galaz-Ávalos, L. Brito-Argáez, V. Aguilar-Hernández y V. M. Loyola-Vargas (2020). YUCCA-mediated biosynthesis of the auxin IAA is required during the somatic embryogenic induction process in *Coffea canephora*. *International Journal of Molecular Sciences*, 21, 4751.
- Van Overbeek, J., M. E. Conklin y A. F. Blakeslee (1942). Cultivation *in vitro* of small **Datura** embryos. *American Journal of Botany*, 472-477.
- van Winkle, S. C. y G. S. Pullman (2003). The combined impact of pH and activated carbon on the elemental composition of a liquid conifer embryogenic tissue initiation medium. *Plant Cell Reports*, 22, 303-311.
- van Winkle, S. C. y G. S. Pullman (2005). Achieving desired plant growth regulator levels in liquid plant tissue culture media that include activated carbon. *Plant Cell Reports*, 24, 201-208.
- Vendeil, J. L. y J. Buffard-Morel, (1995). Somatic embryogenesis in coconut (*Cocos nucifera* L.), en: *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. Vol. 30. Somatic Embryogenesis and Synthetic Seed I, Bajaj, Y. P. S., (ed). Springer. Berlin. pp. 299-317.
- Venkatanarayana, G. (1957). On certain aspects of the development of the leaf of *Cocos nucifera* L. *Phytomorphology*, 7, 297-305.
- Vitecek, J., V. Adam, J. Petek, J. Vacek, R. Kizek y L. Havel (2004). Esterases as a marker for growth of BY-2 tobacco cells and early somatic embryos of the Norway spruce. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 79, 195-201.
- Wagley, L. M., H. J. Gladfelter y G. C. Phillips (1987). *De novo* shoot organogenesis of *Pinus eldarica* Medw. *in vitro*. II. Macro- and micro-photographic evidence of *de novo* regeneration. *Plant Cell Reports*, 6, 167-171.
- Wang, J., J. Jiang y Y. Wang (2013). Protoplast fusion for crop improvement and breeding in China. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 112, 131-142.
- Whitehead, R. A. (1965). The flowering of *Cocos nucifera* Linn. in Jamaica. *Tropical Agriculture (Trinidad)*, 42, 19-29.
- Widholm, J. M. (1982). The use of fluorescein diacetate and phenosafranine for determining viability of cultured plant cells. *Stain Technology*, 47, 189-194.
- Yong, J. W., L. Ge, Y. F. Ng y S. N. Tan (2009). The chemical composition and biological properties of coconut (*Cocos nucifera* L.) water. *Molecules*, 14, 5144-5164.
- Zizumbo, D., M. Fernandez, N. Torres y R. Cardaña, (1999). Lethal yellowing resistance in coconut germplasm from Mexico, en: *Current Advances in Coconut Biotechnology*, Oropeza, C., J. L. Verdeil, G. R. Ashburner, R. Cardaña y J. M. Santamaría, (eds). Springer. Dordrecht. pp. 131-144.
- Zizumbo, V. D., R. F. Hernández y H. C. Harries (1993). Coconut varieties in México. *Economic Botany*, 47, 65-78.

Zizumbo-Villarreal, D., P. M. Colunga-García, M. Fernández-Barrera, N. Torres-Hernández y C. Oropeza (2008). Mortality of Mexican coconut germplasm due to lethal yellowing. *Plant Genetic Resources Newsletter*, 23-33.