



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas.

**Inmunodetección de la metil esterificación-
desesterificación de la pectina durante el desarrollo del
fruto de dos variedades de cocotero.**

Tesis que presenta

MÓNICA YANAHI APARICIO ORTIZ.

En opción al título de

MAESTRA EN CIENCIAS.

(Ciencias Biológicas: Bioquímica y Biología Molecular).

Mérida, Yucatán, México.

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 **Mónica Yanahi Aparicio Ortiz** titulado “**Inmunodetección de la metil esterificación-desesterificación de la pectina durante el desarrollo del fruto de dos variedades de cocotero**”, fue realizado en la **Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas**, en el laboratorio 06 del **Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.** bajo la dirección del **Dr. Ignacio Islas Flores**, dentro de la opción de Bioquímica y Biología Molecular, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente



Dra. Cecilia Hernández Zepeda
Directora de Docencia

Mérida, Yucatán, México, a 14 de noviembre de 2022

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos, los Resultados y Discusión de este documento proviene de las actividades de investigación 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 en el mismo tenor, reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, estos 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.



Mónica Yanahi Aparicio Ortiz

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 “Análisis de semillas de cocotero (*Cocos nucifera* L.) con diferente grado de madurez para determinar el efecto del proteoma y el metaboloma en la calidad del endospermo líquido y sólido” CB 2017-2018-A1-S-10298 bajo la dirección del Dr. Ignacio Rodrigo Islas Flores.

AGRADECIMIENTOS

Al CONACYT por la beca otorgada N° 776663 y por el proyecto titulado "Análisis de semillas de cocotero (*Cocos nucifera* L.) con diferente grado de madurez para determinar el efecto del proteoma y el metaboloma en la calidad del endospermo líquido y sólido" CB 2017-2018-A1-S-10298.

Al CICY por otorgarme la oportunidad de cursar la maestría en sus instalaciones y por la disposición de estas.

A mi asesor al Dr. Ignacio Islas Flores, por sus orientación, conocimientos y paciencia a lo largo de mi estancia en su laboratorio.

Al maestro en ciencias Miguel Tzec Simá por su apoyo técnico y orientación en mi trabajo experimental.

A la dra. Angela Ku por su apoyo técnico en la utilización de los microscopios óptico y confocal.

Al técnico Felipe Barredo por su apoyo en la microscopia óptica para la realización de mi trabajo.

A mi comité tutorial al Dr. Jairo Cristóbal Alejo y al Dr. Luis Alfonso Sáenz Carbonell por sus cometarios en cada examen tutorial que me ayudaron a mejorar mi trabajo.

A los productores de cocotero por permitirme el ingreso a las plantaciones para obtener el material que se utilizó en este trabajo.

A mis compañero y amigos del laboratorio 06, Saraí, Damian, Blanca, Dilery por su apoyo y momentos vividos, en especialmente con los que inicie el recorrido a Rufino, Jean Wildort y María Inés quien se volvió una gran compañera y amiga.

A mis amigos que siempre estuvieron ahí, gracias por confiar en mí Alejandro Jácome.

A mi familia que me apoyo en todo, a mis madres y a mi padre, gracias por todo.

Especialmente agradezco a Dios por permitirme llegar a este momento, sin él no sería posible.

DEDICATORIAS

Esta tesis va dedicada a Dios, mis padres, y a esa persona que aún no conozco, pero fue muy importante para llegar hasta aquí.

“Ambos miramos el mismo cielo”

INDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	IV
ÍNDICE DE TABLAS	VI
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I	3
ANTECEDENTES	3
1.1. Pared celular en plantas	3
1.1.1. Componentes estructurales de la pared celular	3
1.1.2. Biosíntesis y estructura de la pared celular	6
1.1.3. Propiedades químicas y físicas de la pared celular	8
1.1.4. Funciones de la pared celular	9
1.2. Pectina	11
1.2.1. Estructura de la pectina	11
1.2.2. Biosíntesis	12
1.2.3. Degradación	13
1.2.4. Esterificación/desesterificación de la pectina	13
1.2.5. Detección de los cambios de esterificación de la pectina	15
1.3. Cocotero (<i>Cocos nucifera</i> L.)	16
1.3.1. Origen y distribución	17
1.3.2. Variedad	18
1.3.2.1. Variedades altas	18
1.3.2.2. Variedades enanas	19
1.3.3. Morfología	20

1.3.3.1. Inflorescencia.....	21
1.3.3.1.1. Flor	22
1.3.3.2. Fruto	23
1.3.3.2.1. Endospermo.....	24
1.3.3.2.2. Embrión.....	25
1.3.4. Sustancias de reserva	27
JUSTIFICACIÓN	30
HIPÓTESIS.....	32
OBJETIVO.....	32
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	32
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	33
CAPÍTULO II	34
MATERIALES Y MÉTODOS	34
2.1. Selección del material	34
2.2. Extracción del embrión y sus tejidos adyacentes.....	35
2.3. Fijación y preparación del tejido	35
2.4. Cortes del tejido en el criostato.....	35
2.5. Histoquímica.....	36
2.6. Inmunocitocalización de la pectina metil esterificada/desesterificada	36
CAPÍTULO III.....	37
RESULTADOS	37
3.1. Morfología del fruto de cocotero	37
3.1.1. Embriones de la variedad Enano verde de Yucatán	38
3.1.2. Embriones de la variedad Alto del Pacífico mexicano	41
3.2. Histoquímica.....	43

3.2.1. Lípidos	43
3.2.2. Carbohidratos.....	45
3.2.3. Almidón.....	46
3.2.4. Proteínas.....	48
3.3. Inmunodetección.....	50
3.3.1. Enano verde de Yucatán.....	50
3.3.2. Alto del Pacífico mexicano	54
CAPÍTULO IV	58
DISCUSIÓN	58
4.1. Morfología del embrión	58
4.2. Histoquímica.....	61
4.3. Inmunodetección.....	65
CAPÍTULO V	69
CONCLUSIONES	69
BIBLIOGRAFÍA	70

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ilustración de los sitios de formación de la pared celular.....	7
Figura 2. Conformación de la pared celular y la interacción de sus componentes estructurales..	8
Figura 3. Esquematación de la estructura de los polisacáridos que conforman a la pectina ...	12
Figura 4. Enzimas involucradas en la degradación de la pectina en tomate.....	13
Figura 5. Modificación de los homogalacturonanos por la acción enzimática de las pectin metil esterasas (PME) y poligalacturonasas (PG).....	14
Figura 6. Efectos de la desesterificación de pectina en la pared celular de las plantas.....	15
Figura 7. Distribución del coco (<i>Cocos nucifera</i> L.)	18
Figura 8. Cocotero de las variedades altas	19
Figura 9. Cocotero de las variedades enanas	20
Figura 10. Inflorescencia de la palma de coco (<i>Cocos nucifera</i> L.).....	22
Figura 11. Flores del cocotero.....	23
Figura 12. Morfología del fruto de la palma de cocotero.....	24
Figura 13. Etapas tempranas del desarrollo del embrión cigótico de cocotero	25
Figura 14. Micrografía e ilustración del embrión cigótico de cocotero en estadio globular.....	26
Figura 15. Corte histológico del embrión de cocotero.....	26
Figura 16. Frutos de cocotero en diferentes estadios de madurez acompañado del desarrollo del embrión.....	37
Figura 17. Morfología del embrión inmaduro de la variedad Enano verde de Yucatán y sus tejidos adyacentes	38
Figura 18. Morfología del embrión intermedio de la variedad Enano verde de Yucatán y sus tejidos adyacentes	39
Figura 19. Morfología del embrión maduro de la variedad Enano verde de Yucatán y sus tejidos adyacentes	40
Figura 20. Morfología del embrión inmaduro de la variedad Alto del Pacífico mexicano y sus tejidos adyacentes..	41
Figura 21. Morfología del embrión intermedio de la variedad Alto del Pacífico mexicano y sus tejidos adyacentes	42
Figura 22. Morfología del embrión maduro de la variedad Alto del Pacífico mexicano y sus tejidos adyacentes	43
Figura 23. Presencia de lípidos en embriones y sus tejidos adyacentes de las variedades Enano verde de Yucatán y Alto del Pacífico mexicano en tres estadios de madurez	44

Figura 24. Presencia de carbohidratos en embriones y sus tejidos adyacentes de las variedades Enano verde de Yucatán y Alto del Pacífico mexicano en tres estadios de madurez46

Figura 25. Presencia de almidón en embriones y sus tejidos adyacentes de las variedades Enano verde de Yucatán y Alto del Pacífico mexicano en tres estadios de madurez48

Figura 26. Presencia de proteínas en embriones y sus tejidos adyacentes de las variedades Enano verde de Yucatán y Alto del Pacífico mexicano en tres estadios de madurez49

Figura 27. Inmunodetección con los anticuerpos JIM5 y JIM7 de la pectina metil desesterificada-esterificada en embriones de diferentes etapas de desarrollo de la variedad Enano verde de Yucatán.....51

Figura 28. Inmunodetección con los anticuerpos JIM5 y JIM7 de la pectina metil desesterificada-esterificada en el tejido adyacente de la variedad Enano verde de Yucatán.. ..53

Figura 29. Inmunodetección con los anticuerpos JIM5 y JIM7 de la pectina metil desesterificada-esterificada en embriones de la variedad Alto del Pacífico mexicano.....55

Figura 30. Inmunodetección con los anticuerpos JIM5 y JIM7 de la pectina metil desesterificada-esterificada en el tejido adyacente de la variedad Alto del Pacífico mexicano. .57

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Componentes de la pared celular vegetal 5
Tabla 2. Taxonomía del cocotero.....16

RESUMEN

El fruto del cocotero (*Cocos nucifera* L.) consiste en un exocarpio ceroso que cambia de color conforme el fruto madura, un mesocarpio fibroso que se lignifica y deshidrata por el proceso de maduración, un endocarpio duro que cubre al embrión y a los endospermos sólido y líquido. Se ha descrito que, en la maduración de los frutos climatéricos, en semillas ortodoxas y en la embriogénesis cigótica y somática la pectina sufre cambios en el grado de metil esterificación y que las semillas tienden a almacenar macromoléculas que sirven como reservas y son utilizadas durante la germinación. Los cambios en la metil esterificación-desesterificación de la pectina se han observado mediante el uso de los anticuerpos monoclonales, JIM5 el cual reconoce a la pectina metil desesterificada y el JIM7 que reconoce a los epítomos de la pectina con un alto grado de metil esterificación.

En este trabajo, estudiamos la dinámica de la metil esterificación/desesterificación de la pectina y la presencia de macromoléculas de reserva durante el desarrollo del fruto de cocotero, enfocándonos en el embrión cigótico y sus tejidos adyacentes de dos variedades (Enano verde de Yucatán y Alto del Pacífico mexicano) en tres estadios de desarrollo (inmaduro, intermedio y maduro).

Se realizaron cortes histológicos de embriones cigóticos de cocotero y se analizó su estructura celular, así como la disposición de macromoléculas de reserva como almidón utilizando reactivo de Lugol. Para la detección de proteínas se usó con rojo de Ponceau. El análisis de carbohidratos fue hecho con el reactivo de Schiff's y de lípidos con Sudán III. Por último, la pectina metil esterificada y desesterificada se inmunodetectó con los anticuerpos JIM5 y JIM7.

Los resultados obtenidos sugieren que: a) la metil esterificación y desesterificación de la pectina presenta una dinámica que es visible durante el desarrollo del embrión cigótico de cocotero y sus tejidos adyacentes en ambas variedades, y b) hay presencia de sustancias de reserva que disminuyen conforme el fruto de cocotero madura como son las proteínas y carbohidratos, mientras otras aumentan como son los lípidos y el almidón.

ABSTRACT

The fruit of the coconut (*Cocos nucifera* L.) consists of a waxy exocarp that changes its color as fruit maturity increase, a fibrous mesocarp that lignifies and dehydrates through the maturation process, a hard endocarp that covers the embryo, and the solid and liquid endosperm. It has been described that, in the maturation of climacteric fruits, in orthodox seeds and in zygotic and somatic embryogenesis, pectin undergoes changes in the degree of methyl esterification and that seeds tend to store macromolecules that function as reserves that support germination. Changes in the methyl esterification-de-esterification of pectin have been observed using monoclonal antibodies, JIM5, which recognizes methyl de-esterified pectin, and JIM7, which recognizes pectin epitopes with a high degree of methyl esterification.

In this work, we study the dynamics of pectin methyl esterification/de-esterification and the presence of reserve macromolecules during coconut fruit development, focusing on the zygotic embryo and its adjacent tissues of two varieties (Yucatán Dwarf Green and the Mexican Pacific Tall) in three stages of development (immature, intermediate and mature).

Histological sections of coconut zygotic embryos were obtained; their cellular structure, as well as the location of reserve macromolecules such as starch were analyzed using Lugol's reagent. For the detection of proteins, Ponceau red was used. Analysis of carbohydrates was with Schiff's reagent and of lipids with Sudan III. Finally, methyl esterified and de-esterified pectin was immunodetected with JIM5 and JIM7 antibodies.

The results obtained suggest that at: a) the methyl esterification and de-esterification of pectin presents a dynamic that is visible during the development of the coconut zygotic embryo and its adjacent tissues in both varieties; and b) there exist reserve substances that decrease as the coconut mature, such as proteins and carbohydrates, while others increase, such as lipids and starch.

INTRODUCCIÓN

Durante la formación del fruto vegetal, las células tienen cambios en su estructura y su composición química, mismos que ayudan en el crecimiento y desarrollo de los frutos. Durante este proceso las paredes celulares que dan forma a las células juegan un papel fundamental (Keegstra, 2010). La pared celular vegetal está compuesta por diversos polisacáridos que al cambiar sus propiedades mecánicas intervienen en la división y expansión celular y esto se ha asociado a la embriogénesis cigótica y somática (Van Hengel et al., 2002). Uno de los mayores componentes de las paredes celulares de las plantas es la pectina, tanto en dicotiledóneas como en monocotiledóneas.

Los polisacáridos que conforman a la pectina se clasifican en homogalacturonanos y ramnogalacturonanos de tipo I y II. La cadena principal la conforman los homogalacturonanos, constituidos por residuos de ácido galacturónico unido mediante enlaces covalentes.

En principio, la pectina se sintetiza metil esterificada en la cadena principal de homogalacturonanos en el carbono 6 (C6), el grado de metil esterificación puede modificarse mediante la acción de las enzimas pectin metil esterasas (PME), que eliminan el grupo metilo del carbono 6 (C6), este proceso se conoce como metil desesterificación (Willats et al., 2001; Mohnen, 2008; Wolf et al., 2009).

La metil esterificación y desesterificación de la pectina se ha asociado a la expansión y elongación celular. La desesterificación conduce a la relajación y disminución de la rigidez de la pared celular en las zonas meristemáticas, lo que da paso a la organogénesis. También, se ha asociado al alargamiento de la radícula y al debilitamiento del endospermo, que ocurren antes y durante el proceso de germinación de las semillas, y que ocurre tanto en las angiospermas como en las gimnospermas (Müller et al., 2006; Bárány et al., 2010; Levesque-Tremblay et al., 2015a; Solís et al., 2016).

Se ha reportado que la pared celular de embriones está metil desesterificada en las zonas externas, dado que tiene mayor tiempo de haberse formado, la pectina metil desesterificada se ha reportado en la lámina media existiendo variaciones en cuanto a la distribución espacial según las partes del embrión y del desarrollo embrionario (Chapman et al., 2000; Pérez-Pérez et al., 2019). Todos los frutos y semillas poseen células, estas células poseen pared celular y

todas las paredes celulares tienen pectina, pero su grado de metil esterificación/desesterificación varía dependiendo del tipo de fruto o semilla.

El cocotero es una especie monocotiledónea, agrupado en al menos dos grandes grupos, las variedades altas y las enanas. El fruto de cocotero es una drupa no climatérica, con una semilla no ortodoxa o recalcitrante, se conoce muy poco acerca de los procesos de desarrollo y maduración que ocurren en el interior del fruto-semilla, uno de estos procesos es la dinámica de la metil esterificación/desesterificación de la pectina.

Hasta la fecha solo se ha reportado un trabajo en cocotero, por Verdeil y colaboradores (2001). Estudiaron las etapas tempranas del desarrollo del embrión somático, y encontraron que en la lámina media y en las células meristemáticas la pectina se encuentra más metil desesterificada que esterificada, estas características las asociaron a la relajación de la pared celular para la elongación y el desarrollo embrionario. Sin embargo, en embriones cigóticos de cocotero no se ha reportado como es la dinámica de la pared celular con relación al grado de metil esterificación/desesterificación de la pectina durante el desarrollo y maduración de la semilla y del fruto.

En el cocotero, se observa que conforme el fruto madura el endospermo sólido se endurece y se desconoce si dicho proceso tiene implicaciones en el desarrollo del embrión cigótico. Por ello, el estudio de los cambios morfológicos, histológicos e inmunohistoquímicos que ocurren en el fruto y en el embrión y sus tejidos adyacentes nos permitirá establecer si en este fruto no climatérico y semilla recalcitrante hay una dinámica en la metil esterificación y desesterificación que acompaña el proceso de desarrollo y maduración. Además, permitirá determinar si tal comportamiento es igual en ejemplares de las variedades Alto del Pacífico mexicano y Enano verde de Yucatán.

CAPÍTULO I

ANTECEDENTES

1.1. Pared celular en plantas

La pared celular es una red compleja de moléculas en donde su biosíntesis y diferenciación se encuentra regulada de manera temporal, espacial y coordinada. Está conformada por polisacáridos, lignina, ceras, proteínas estructurales, enzimas, oligoelementos (calcio, boro, entre otros) y agua (Gifford, 1989; Cassab, 1998).

La superestructura de la pared celular se asocia con el núcleo y el citoplasma mediante los plasmodesmata, la membrana plasmática y el citoesqueleto (Lucas, 1995), es por ello que las paredes celulares juegan un papel importante en el crecimiento, desarrollo, comunicación intercelular, defensa y destino final de la célula en las plantas (Somerville et al., 2004; Keegstra, 2010; Pérez-Pérez et al., 2019). En plantas, las paredes celulares se clasifican en dos tipos, la pared celular primaria y la pared celular secundaria. En las células especializadas como son las células fibrosas o los conductos vasculares, las paredes celulares son más evidentes (Keegstra et al., 1989; Keegstra, 2010).

1.1.1. Componentes estructurales de la pared celular

La pared celular es una dinámica y compleja estructura, compuesta principalmente por polisacáridos, el polisacárido más abundante es la celulosa embebida en una matriz unida por hemicelulosa, la matriz está dividida en dos categorías de acuerdo con las agrupaciones de polisacáridos que la componen: el primer grupo está integrado por polisacáridos pécticos que incluyen a los homogalacturonanos y ramnogalacturonanos de tipo I y II; el segundo grupo contiene a los polisacáridos de hemicelulosa (xiloglucanos, glucomananos y xilanos) (Tabla 1) (Hv & Ulvskov, 2010; Keegstra, 2010; Haas et al., 2020).

La celulosa está formada por glucosas que se asocian entre sí por enlaces β -1-4. Las fibras de celulosa están unidas por puentes de hidrógeno, formando una red cristalina. En la pared celular primaria los xiloglucanos son el componente principal de la hemicelulosa, se encuentran en la cadena principal como residuos de D-xilopiranosos unidos fuertemente a la superficie de la

pared celular por enlaces β (1-4), retenidos por transglicosilaciones (Aspinall, 1959). En angiospermas las unidades de ácido 4-O-metil-D-glucurónico son las más abundantes en la cadena principal de xilosa y se distribuyen de manera aleatoria unidas por enlaces α (1-2); además, en las fracciones de hemicelulosa unidas mediante enlaces β (1-4), el ácido 4-O-metil-D-glucurónico se encuentra en pequeñas cantidades (3-5%) (Northcote, 1972).

Las pectinas son otro grupo de polisacáridos presentes en las paredes celulares, el galacturonoramnano es el principal constituyente de la pectina y se encuentra en forma acidificada, junto con los arabinogalactanos que son polisacáridos neutros (Northcote, 1972). En general, durante los estados tempranos de desarrollo de la pared celular las sustancias pécticas constituyen alrededor de un 35% de las paredes celulares primarias de dicotiledóneas y monocotiledóneas. Cuando las microfibrillas se expanden generan cambios en la orientación y conformación de la estructura de la pared, además, durante este periodo las pectinas son depositadas en la pared de las células (Northcote, 1972; Salazar & Gamboa, 2013).

La cadena principal de la pectina está conformada por ácido galacturónico unido por enlaces β (1-4), en el grupo carboxilo se esterifica como éster de metilo. En la cadena principal del ácido galacturónico se encuentran L-fucosa, D-xilosa, D-galactosa, D-ácido glucurónico y mediante enlaces β (1-6), galactosa y algunas unidades de xilosa que están unidas a la cadena principal de residuos de ácido galacturónico por enlaces β (1-3) (Northcote, 1972, 1986). Las propiedades de la pectina pueden ser modificadas por metilación de los grupos carboxilos de los residuos de ácido galacturónico y por acetilación de los grupos hidroxilos, las moléculas de ácido galacturónico son iónicas y pueden formar sales cambiando su estado físico al interactuar con cationes mono y divalentes (Northcote, 1972).

La pared celular de las plantas también está compuesta por proteínas estructurales, las extensinas y la familia de las glicoproteínas ricas en hidroxiprolina (HRGPs), son las más abundantes. Estas proteínas poseen ciertas características en común, son básicas, debido a que poseen un alto contenido de lisinas, tienen estructuras repetidas y poseen varios sitios de modificación postraducciona debido a sus residuos de serina, treonina, hidroxiprolina, lisina, tirosina e histidina. También se encuentran las arabinogalactano-proteínas (AGPs) que contienen hidroxiprolina y están ampliamente distribuidas en las paredes celulares. Las AGPs se localizan principalmente en la matriz extracelular, junto con proteínas ricas en glicina llamadas GRPs, proteínas ricas en prolina denominadas PRPs y proteínas denominadas quiméricas que contienen dominios de extensina (Keegstra et al., 1989; Carpita et al., 1996; Cassab, 1998).

En la pared celular también se encuentran diversas enzimas que participan en su remodelación, entre ellas se encuentran las peroxidases, fosfatasas, invertasas, α -manosidasas, β -manosidasas, β -1,3-glucanasas, β -1,4-glucanasas, poligalacturonasas, pectina metilesterasas, malato deshidrogenasa, arabinosidasas, α -galactosidasas, β -galactosidasas, β -glucuronosidasas, β -xilosidasas, proteasas y ácido ascórbico oxidasa, entre otras (Keegstra et al., 1989).

En las paredes celulares secundarias se encuentran depositados compuestos fenólicos que son derivados de fenilalanina o tirosina que endurecen la pared, por ejemplo, la lignina, es un compuesto insoluble, aromático, de alto peso molecular, que penetra desde la pared celular primaria hacia la secundaria endureciéndola. Este proceso ocurre porque la lignina atrae y captura las moléculas de agua rompiendo los puentes de hidrógeno entre otras moléculas, y se incrusta en la matriz celular donde forma enlaces covalentes con los carbohidratos (Esau et al., 1966; Pickett-Heaps & Northcote, 1966; Freudenberg & Neish, 1968).

El agua es un constituyente estructural de las paredes celulares y la cantidad presente varía en cada planta, desempeña una función directa en la forma y el soporte de la pared. También participa en la formación de los puentes de hidrógeno entre los polisacáridos, tiene un efecto en la permeabilidad de la pared e interactúa con iones metálicos como el Ca^{+2} con el que forma sales que acidifican la pared (Northcote, 1972).

Tabla 1. Componentes de la pared celular vegetal. Tomado y modificado de Brett & Waldron, 1996.

Fase	Componentes	Tipo
Microfibrilar	Celulosa	β 1,4-glucano
Matriz	Pectinas	Ramnogalacturonano I Arabinano Galactano Arabinogalactano I Homogalacturonano Ramnogalacturonano II

	Hemicelulosas	Xylano Glucomanano Manano Galactomanano Glucuronomanano Xyloglucano Calosa (β 1,3-glucano) β 1,3-, β 1,4-glucano Arabinogalactano II
	Proteínas	Extensinas Glicoproteínas ricas en hidroxiprolina (HRGPs) Arabinogalactano-proteínas (AGPs) Proteínas ricas en glicina (GRPs) Proteínas ricas en prolina (PRPs) Proteínas denominadas quiméricas Diversas enzimas
	Compuestos fenólicos	Lignina Ácido ferúlico Ácido cumárico Ácido truxílico, entre otros

1.1.2. Biosíntesis y estructura de la pared celular

Los componentes de las paredes celulares se acomodan en capas seriadas, las primeras capas se forman durante la división celular; se estima que el 15% de los genes en las plantas codifican a productos que están involucrados en la síntesis, ensamblaje y modelaje de la pared celular (Carpita et al., 2001).

Se han descrito dos mecanismos por los cuales se depositan los compuestos en la pared: el primero involucra la disposición de hemicelulosa y pectinas a través de vesículas; y el segundo involucra la acción de complejos enzimáticos los cuales están ubicados en la superficie del plasmalema (Šamaj et al., 2005). En el primero, la hemicelulosa y las pectinas se sintetizan como monosacáridos en la membrana del aparato de Golgi y son transportadas a través de

vesículas, las vesículas atraviesan el citoplasma a través del plasmalema por pinocitosis reversa y se integran a la pared. En el segundo, los complejos enzimáticos que se encuentran en la superficie externa de la membrana plasmática sintetizan a las microfibrillas de celulosa y demás polisacáridos y los depositan en el interior de la pared celular (Figura 1) (Northcote, 1969a, 1969b; Roberts & Northcote, 1970; Harris & Northcote, 1971; Handford, 2006).

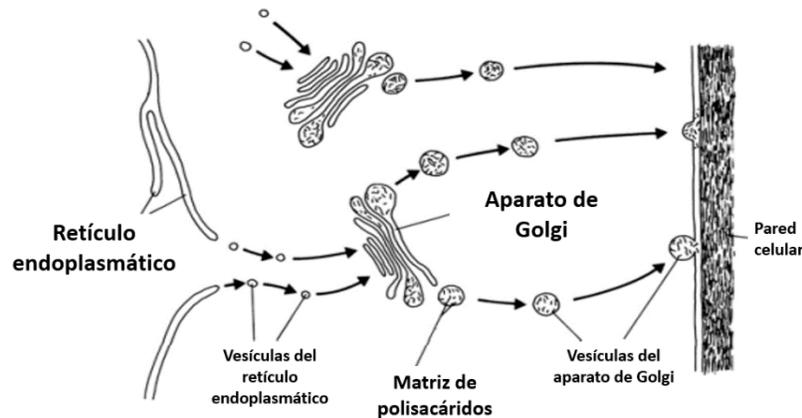


Figura 1. Ilustración de los sitios de formación de la pared celular. Modificado de Brett y Waldron, 1996.

Las primeras capas de la pared celular primaria se encuentran adyacentes al centro de la doble capa que se forma de la interacción entre las células, a este espacio extracelular se le denomina lámina media, por lo general, la lámina media es densa y mide alrededor de 30 nm (Brett & Waldron, 1996).

Durante todo el desarrollo de las células se siguen depositando capas nuevas de pared celular, sobre las más viejas, por ello las células siguen creciendo y engrosando sus paredes celulares secundarias hasta alcanzar un grosor de alrededor de 1 μm . La pared celular secundaria posee diferencias estructurales con respecto a la pared primaria, es más gruesa en diferentes partes de la célula, factor que produce variaciones en la forma y que puede resultar en paredes celulares con arreglos en espiral, anular, reticular o escaliforme (Northcote, 1972; Brett & Waldron, 1996; Handford, 2006).

Las capas que conforman a la pared celular se agrupan en dos fases la microfibrilar y la de la matriz, la primera es altamente cristalina y relativamente homogénea, en ella se encuentran estructuras denominadas microfibrillas que están compuestas de moléculas de celulosa de tipo I, II, III y IV, las microfibrillas están alineadas paralelamente y contienen a otros polisacáridos,

usualmente manosa y xilosa. La fase no cristalina también denominada matriz es más compleja debido a que contiene polisacáridos, proteínas y compuestos fenólicos y su composición puede variar en diferentes zonas de la pared celular, en los distintos tipos de células y en las diferentes etapas del ciclo celular (Brett & Waldron, 1996).

La interacción entre la celulosa y la hemicelulosa se da de manera espontánea, la hemicelulosa se une a la superficie de la celulosa, y otros polisacáridos como los xiloglucanos se unen y se anclan a las microfibrillas. Por otra parte, los xiloglucanos pueden unirse covalentemente a la pectina, principalmente a los residuos de homogalacturonano, también se adhieren arabinoxilanos a la celulosa mediante la unión a ésteres de ácido ferúlico, debido a estas interacciones, las microfibrillas se pueden adherir a otra matriz de polisacáridos (Figura 2) (Keegstra et al., 1973; Hayashi, 1989; Hayashi et al., 1994; Brett & Waldron, 1996; Thompson & Fry, 2000; Cosgrove, 2005; Cumming et al., 2005).

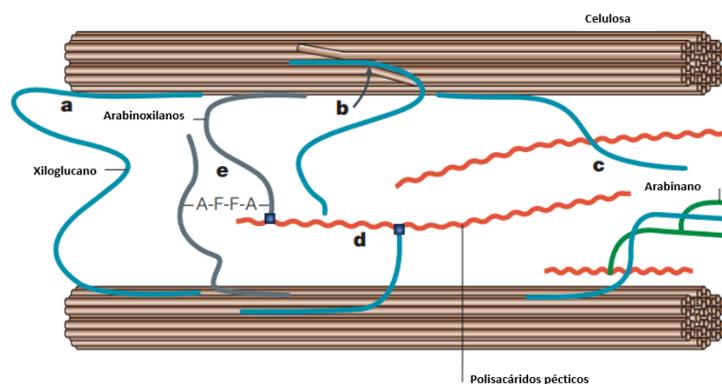


Figura 2. Conformación de la pared celular y la interacción de sus componentes estructurales. a) hemicelulosa uniéndose a las microfibrillas de celulosa. b) xiloglucanos uniéndose a la superficie de la celulosa. c, d) interacción del xiloglucano con los polisacáridos pécticos. e) arabinoxilanos unidos a ésteres de ácido ferúlico. Tomado y modificado de Cosgrove, 2005.

1.1.3. Propiedades químicas y físicas de la pared celular

La resistencia mecánica de la pared celular se debe principalmente a la lignina que se encuentra en las paredes secundarias de las células; en las paredes celulares primarias las características mecánicas son determinadas por las microfibrillas de celulosa, que se encuentran orientadas de manera paralela y perpendicular, en algunos casos interaccionando con la matriz celular aportando resistencia a la célula. Este arreglo estructural es importante cuando la célula es sometida a algún tipo de estrés, aunque la pared celular es una red

entretejida por diversas moléculas, también se encuentran canales que permiten el paso de pequeñas moléculas como proteínas, polisacáridos y agua dando a la pared cierta porosidad, además de proveer de características tanto hidrofílicas como hidrofóbicas. La pared celular normalmente posee carga negativa en gran medida por los residuos de ácido galacturónico de las sustancias pécticas; sin embargo, las cargas se pueden balancear de negativo a positivo por las glicoproteínas y los iones principalmente calcio; por lo general el pH de la pared celular oscila entre 4 y 6 (Brett & Waldron, 1996; Cosgrove, 2005).

1.1.4. Funciones de la pared celular

En las plantas el transporte de célula a célula involucra a la pared celular; hay dos mecanismos por los cuales ocurre dicho proceso: el primero es el transporte apoplástico, en donde las moléculas se mueven a través de la matriz celular, hasta la célula vecina, permitiendo el paso de microorganismos, iones, otros polisacáridos y proteínas, en este proceso también se involucra la membrana plasmática, siendo los protoplastos el destino final; el segundo mecanismo es mediante el transporte simplástico, en donde las sustancias se mueven a través de los plasmodesmata, estos últimos sitios de comunicación entre las membranas plasmáticas y las paredes celulares de células vecinas (Brett & Waldron, 1996).

La pared celular provee rutas por la cuales atraviesan diversas moléculas. Dicho proceso es regulado por mecanismos propios de las plantas; por ejemplo, las paredes externas de las células epidérmicas de las hojas están impregnadas de ceras que impiden la pérdida de agua y funcionan como una barrera contra bacterias, hongos e insectos. Por otra parte, en las paredes celulares de las semillas, tallos, raíces y hojas se encuentran proteínas de bajo peso molecular ricas en cisteína, que son asociadas con los mecanismos de defensa contra bacterias y hongos (Keegstra et al., 1989; Florack & Stiekema, 1994; Brett & Waldron, 1996).

Una de las principales funciones de la pared celular es dar soporte, firmeza y rigidez a la célula, esta característica a su vez controla otros eventos en las plantas como son la extensión y la diferenciación celular. Para ello, la presión de turgencia tiene una influencia muy importante, pues al incrementar la turgencia las paredes celulares tienden a relajarse, pero debido a la presión ejercida hacia el interior, el tamaño de la célula no aumenta drásticamente (Cosgrove, 1993; Brett & Waldron, 1996; Handford, 2006).

La pared celular vegetal es una efectiva barrera contra patógenos, pues sus poros y canales impiden el paso de ciertos microorganismos; por otra parte, para que la pared celular se pueda

penetrar, es necesaria la participación de enzimas con capacidad para degradar a sus componentes. Por ejemplo, algunos hongos patógenos degradan la lámina media; sin embargo, como un mecanismo de defensa, la célula puede lignificar la lámina media, y secretar ceras, suberinas y cutina para evitar la infección (Kolattukudy, 2001).

Además de la lignificación, la célula puede activar otros mecanismos de defensa, uno de ellos es la secreción de calosa, la cual se deposita en la superficie de la pared celular para formar una barrera impermeable que se asocia con iones de calcio, dificultando o impidiendo la entrada de patógenos. Cuando los microorganismos patógenos se encuentran atacando a la célula, ésta libera compuestos que actúan como inductores de la defensa activa, como las fitoalexinas. La pared celular vegetal no solo protege a las plantas de los microorganismos sino también de animales, esto es debido a su alto contenido de lignina y a la acumulación de pequeñas cantidades de sílice, ambos compuestos no digeribles para la mayoría de los animales (Brett & Waldron, 1996).

Para que el proceso de reproducción en las plantas se lleve a cabo se necesitan un gran número de células especializadas. Estas células, tienen diferencias en el tipo de composición de la pared celular primaria; por ejemplo, la pared celular del polen, aunque en composición es similar a la de las células somáticas, tiene una mayor cantidad de calosa, lo que favorece su aislamiento en las células polínicas y permite que el polen se desarrolle de manera independiente y por lo tanto sean genéticamente distintas entre sí. El polen también posee dos paredes, una externa compuesta por exina y una interna compuesta por ectina, ambos compuestos ayudan al desarrollo y maduración del polen (Brett & Waldron, 1996).

Después de la fertilización, la semilla comienza su desarrollo, la mayoría de las semillas almacenan compuestos que ayudarán al proceso de germinación y desarrollo de una nueva planta; por lo general, estas reservas son intracelulares. No obstante, la pared celular es una fuente importante de sustancias de reserva; por ejemplo, mananos y sus derivados, xiloglucanos, galactanos, entre otros (Brett & Waldron, 1996).

En el proceso de maduración de los frutos la pared es blanco de las enzimas especializadas que degradan la lámina media de las células, disminuyendo la adhesión de célula a célula y con ello permitiendo el ablandamiento de la fruta (Brett & Waldron, 1996).

1.2. Pectina

La pectina se encuentra principalmente en las paredes celulares primarias de las dicotiledóneas y monocotiledóneas, excepto en las gramíneas, y en menor cantidad en las paredes secundarias. Las pectinas tienen numerosas funciones en las plantas, por ejemplo, la adhesión celular, el soporte estructural en tejidos blandos, influye en la formación de las paredes secundarias en fibras y tejidos leñosos, funciona como almacén de moléculas de señalización como los oligosacáridos, elementos importantes para el crecimiento, desarrollo y la respuesta de defensa (Atmodjo et al., 2013).

1.2.1. Estructura de la pectina

La pectina está constituida por diversos polisacáridos, ricos en ácido galacturónico unidos covalentemente (Albersheim et al., 1996), y pueden ser agrupados en tres tipos principales. El homogalacturonano (HG), siendo el polisacárido más abundante, el ramnogalacturonano I (RG-I) y II (RG-II), y también pueden contener apiogalacturonano (AGA) y xilogalacturonano (XGA) (Figura 3) (Mohnen, 2008; Atmodjo et al., 2013; Peaucelle et al., 2015).

Aproximadamente el 65% de la pectina está compuesta de homogalacturonano unido en una configuración α 1-4. El homogalacturonano es sintetizado de forma metilesterificado en la posición O-6 y en menor grado es acetilado en O-2 y O-3 (Caffall & Mohnen, 2009; Wolf et al., 2009; Höfte et al., 2012); el RG-I constituye del 20 al 35% de la pectina, tiene una cadena principal repetida de disacáridos $[4-\alpha\text{-D-GalA-(1,2)-}\alpha\text{-L-Rha-1}]_n$, donde los residuos de GalA están altamente acetilados en O-2 o O-3 (Freshour et al., 1996; Willats et al., 2001; Guillemín et al., 2005); el RG-II constituye aproximadamente el 10% de la pectina y es el más complejo, tiene un esqueleto HG sustituido con cadenas laterales de otros polisacáridos, el complejo RG-II tiene una función crítica en el crecimiento y desarrollo de la planta (O'Neill et al., 2001; Bar-Peled et al., 2012).

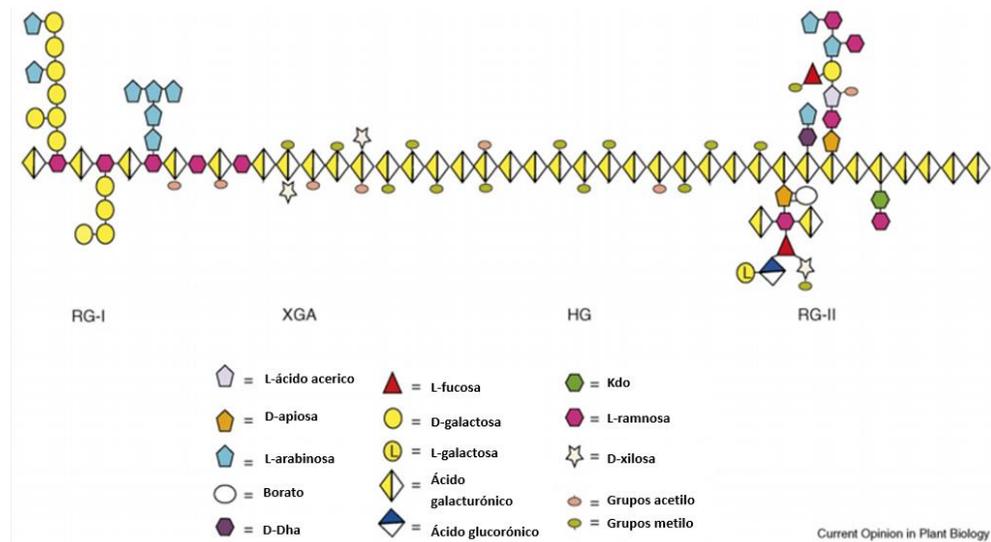


Figura 3. Esquematación de la estructura de los polisacáridos que conforman a la pectina. Tomado y modificada de Mohnen (2008).

1.2.2. Biosíntesis

Diversos estudios han demostrado que las pectinas son sintetizadas en el aparato de Golgi por glicosiltransferasas (GT) unidas o asociadas a la membrana y que una vez sintetizada son transportadas a la pared a través de vesículas (Mohnen, 2008).

El HG se inserta en la pared altamente esterificado y es metil desesterificado solo después de la inserción (Pelloux et al., 2007; Peaucelle et al., 2015), la desmetilación de HG y las cargas negativas provenientes del ácido carboxílico expanden la pared celular y por ende, a la célula, correlacionando los cambios de elasticidad de la pared con el aumento en el volumen celular (Bosch et al., 2005; Derbyshire et al., 2007; Peaucelle et al., 2015).

Entre las enzimas requeridas para la síntesis de la pectina se incluye a las glicosiltransferasas (GTs), las cuales tienen mayor participación en la biosíntesis. Las glicosiltransferasas están especializadas en la transferencia de los residuos glicosil desde un nucleótido donador hacia el extremo no reductor de un aceptor oligo o polisacárido (Ridley et al., 2001). Dichos polisacáridos están presentes en todas las paredes celulares, aunque la cantidad puede variar (Carpita & Gibeaut, 1993; Willats et al., 2006).

1.2.3. Degradación

La degradación de los polímeros de la pectina es resultado de la acción de varias enzimas embebidas en la pared, como las poligalacturonasas, las β -galactosidasas, las expansinas, las pectina acetilesterasas, la pectina metilesterasa (PME), entre otras (Wang et al., 2018). La pectina es esterificada y desesterificada por la actividad de las enzimas metil estererasas y desesterasas (Figura 4). Los cambios en el estado de esterificación han sido relacionadas con la remodelación de la pared celular, que ocurre durante los diversos procesos de desarrollo en las plantas (Pelloux et al., 2007).

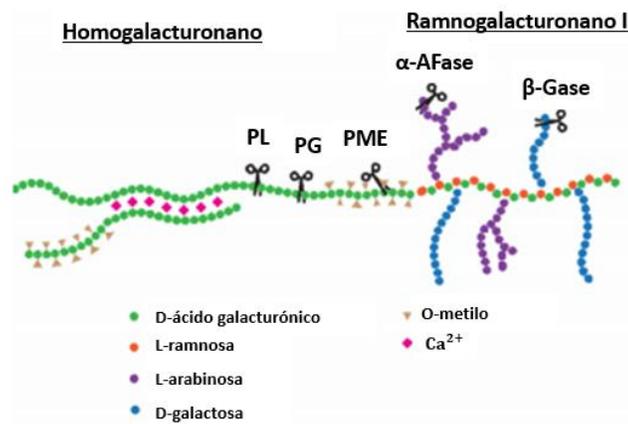


Figura 4. Enzimas involucradas en la degradación de la pectina en tomate. PL, pectato liasa; PG, poligalacturonasa; PME, pectin metil esterasa; α -Afase, α -arabinofuranosidasa; β -Gase, β -galactanasa. Tomado y modificado de Wang y colaboradores (2018).

1.2.4. Esterificación/desesterificación de la pectina

Las pectina metilesterasas (PMEs) cortan el grupo metilo del ácido galacturónico y las poligalacturonasas (PGs) degradan a las pectinas desesterificadas por hidrólisis (Figura 5) (Wolf et al., 2012). La pectina al ser desesterificada, modifica ciertos procesos en la célula como la relajación o el aumento de la rigidez de la pared, la alteración en la adhesión celular y la generación de fragmentos de oligogalacturónidos (OGAs) (Salazar & Gamboa, 2013).

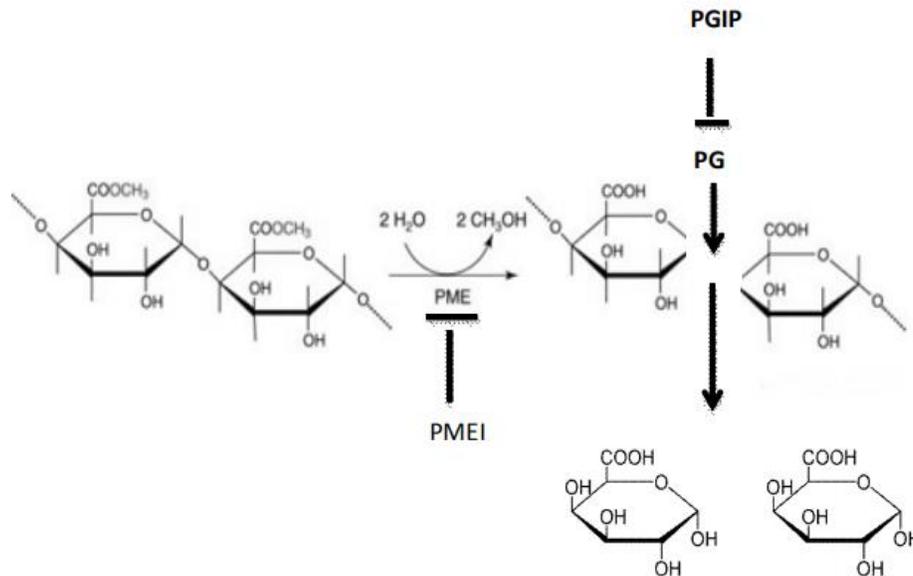


Figura 5. Modificación de los homogalacturonanos por la acción enzimática de las pectin metil esterases (PME) y poligalacturonasas (PG). Tomado de Salazar y Gamboa, 2013.

La desesterificación favorece la hidratación de la pared, aumentando su relajación y la interacción con moléculas de calcio (Ca^{+2}), promoviendo la formación de las denominadas “egg-box”, ocasionando que la pared se vuelva rígida (Figura 6) (Ridley et al., 2001; Mohnen, 2008).

La importancia de las PMEs en el desarrollo vegetal se observa en el incremento o relajación de la pared celular, en la formación de nuevos órganos; el grado de esterificación determina las propiedades mecánicas de la pared, y su participación en la diferenciación de las células meristemáticas, un cambio en su actividad puede causar diversos efectos en el desarrollo llegando a ser difíciles de interpretar (Wolf et al., 2012).

Los cambios en la metil esterificación de las pectinas son importantes señalizadores moleculares, el grado de esterificación afecta las propiedades de la pared celular y otras sustancias como el mucílago, el cual se ha asociado al almacenamiento de agua y alimentos, la germinación de semillas y el engrosamiento de membranas (Płachno et al., 2020).

Diversos estudios han indicado que los cambios en la mecánica de la pared celular son controlados por la esterificación/desesterificación de la pectina e intervienen en el inicio de la embriogénesis, el crecimiento temprano del embrión, la organogénesis y el desarrollo (Levesque-Tremblay et al., 2015a; Levesque-Tremblay et al., 2015b).

Los niveles de esterificación/desesterificación de la pectina han sido reportados como factores cruciales en el cambio de las propiedades de diferenciación de la pared celular en el embrión (Solís et al., 2016).

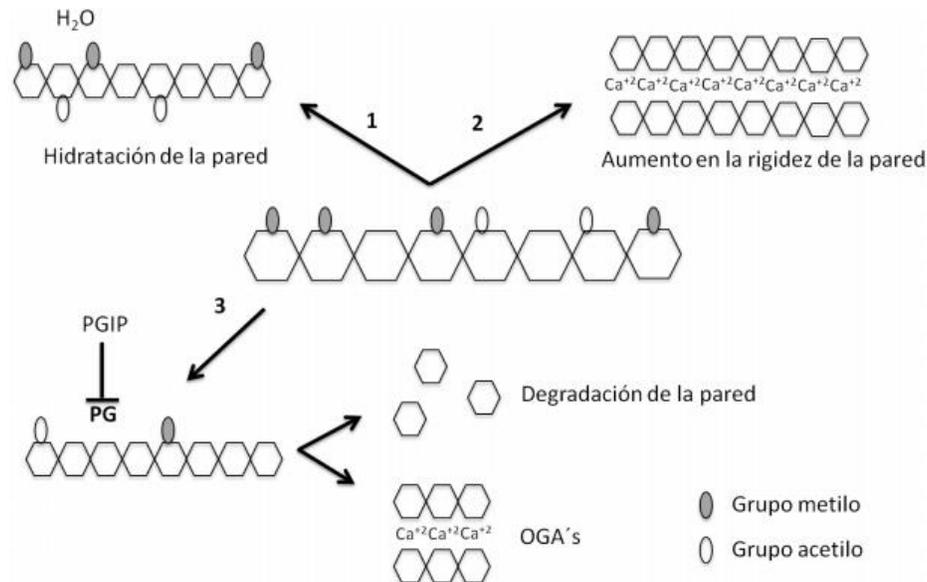


Figura 6. Efectos de la desesterificación de pectina en la pared celular de las plantas. Tomado de Salazar y Gamboa, 2013.

1.2.5. Detección de los cambios de esterificación de la pectina

Las células pueden presentar cambios en los patrones de esterificación en ciertos dominios de la pared celular, esto depende de los factores de regulación de la actividad de las PME's como son el pH, la disponibilidad de iones, la concentración de celulosa, entre otros (Yoneda et al., 2010).

Estos dominios y cambios en la metil esterificación pueden ser identificados por medio de anticuerpos monoclonales específicos, los anticuerpos JIM5 y JIM7 reconocen a los epítomos del homogalacturonano asociados al grado de metil esterificación (Knox et al., 1990; Clausen et al., 2003). El anticuerpo JIM5 reconoce a los epítomos metil desesterificados, y el anticuerpo JIM7 reconoce a los epítomos metil esterificados. El uso de los anticuerpos JIM5 y JIM7 permite observar la distribución de la pectina a través de la pared celular primaria, mostrando la variación espacial en el grado de esterificación (Knox et al., 1990).

La localización de los patrones de desesterificación es de interés para entender la función bioquímica de las pectinas dentro de las paredes de las células vegetales y la asociación de estas con el desarrollo (Knox, 1997).

Los trabajos de Chapman en el 2000, Cruz-Valderrama y colaboradores en el 2018, Pérez-Pastrana y colaboradores en el 2018 y Du en 2020 aportaron conocimiento acerca del comportamiento de la pared celular durante el desarrollo y morfogénesis de embriones tanto somáticos como cigóticos de semillas ortodoxas como *Arabidopsis*, achicoria y *Castanea mullissima*, así como de semillas no ortodoxas o recalcitrantes como el chile habanero. En conjunto, concluyeron que la metil desesterificación de la pectina desempeña un papel importante en la mecánica de la pared celular, debido a que en los embriones y en el endospermo provoca la relajación y ablandamiento de las paredes celulares y que tal evento es importante en el proceso embriogénico.

1.3. Cocotero (*Cocos nucifera* L.)

El cocotero, *Cocos nucifera* L. es una palma perenne monoica, monocotiledónea (Meerow et al., 2000), de la familia Arecaceae, subfamilia Arecoideae (Tabla 2). La familia Arecaceae incluye un total de 27 géneros y 600 especies (Yang et al., 2018). El cocotero es diploide con 32 cromosomas ($2n=32$) (Xiao et al., 2017), es cultivado en más de 92 países, siendo la región de Asia-Pacífico la más representativa con un 86% del área cultivada (Faostat, 2017). El cocotero se distribuye por las áreas tropicales y pantropicales del mundo desde el centro y sur de América, el este y oeste de África, hasta el sur y suroeste asiático y las islas del Pacífico (Yang et al., 2018).

Tabla 2. Taxonomía del cocotero (Niral & Jerard, 2019).

Reino:	Plantae.
Subreino:	Tracheobionta.
Super división:	Spermatophyta.
División:	Magnoliophyta.
Clase:	Liliopsida.
Subclase:	Arecidae.
Orden:	Arecales.
Familia:	Arecaceae.

Subfamilia:	Arecoideae.
Género:	<i>Cocos</i> .
Especie:	<i>Cocos nucifera</i> L.

1.3.1. Origen y distribución

En base a la alta diversidad genética de cocotero que se encuentra en la región Asia-Pacífico, se cree que el sitio de origen del cocotero es la región Indo-Malaya del Pacífico Occidental (Samson, 1983). Dicha propuesta se apoya en el descubrimiento de restos fósiles en Nueva Guinea de más de 4,000 años y en Vanuatu de más de 5,000 años (Greig-Smith & Corner, 1966; Buckley & Harries, 1984).

El coco se ha cultivado en el continente asiático desde hace ~3,000 años, de ahí se introdujo a los sitios insulares y a tierra firme a lo largo de la costa del Pacífico de América Central, de acuerdo con reportes que datan del siglo XVI (Figura 7); (Greig-Smith & Corner, 1966; Gunn et al., 2011).

La mayor producción de coco se sitúa en los países del sudeste de Asia, Indonesia, la India, Filipinas seguido por Sri Lanka, Vietnam, Tailandia y el archipiélago Malayo, destacando también las islas del Pacífico como Papúa Nueva Guinea, y algunos países de América Central y del Sur como México y Brasil (Shahbandeh, 2022).

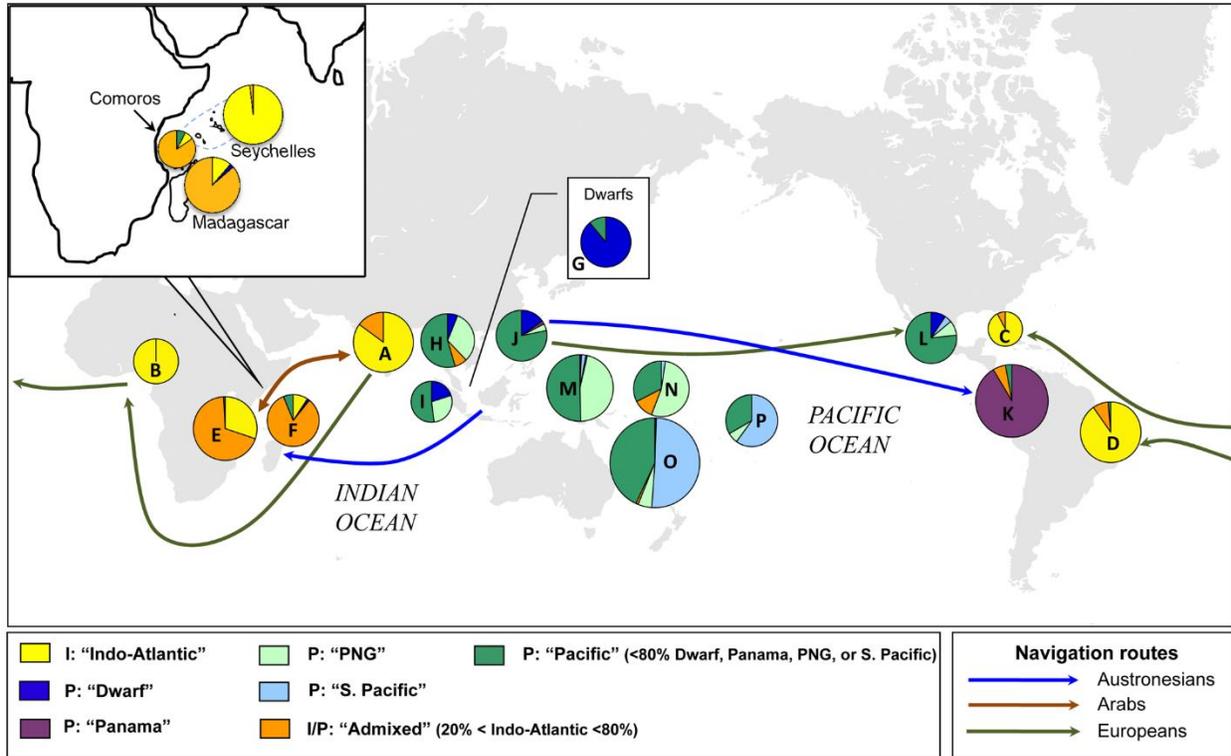


Figura 7. Distribución del coco (*Cocos nucifera* L.). Tomado de Gunn y colaboradores 2011.

1.3.2. Variedad

Basado en hábitat y en las características morfológicas, el cocotero se clasifica en al menos dos variedades, las altas y las enanas (Liyanage, 1958). Dependiendo de la variedad el fruto de cocotero puede llegar a tener una coloración amarilla, verde, marrón o naranja, y su forma es ovalada o elíptica.

1.3.2.1. Variedades altas

Las palmas de las variedades altas crecen de 20 a 30 metros, pueden crecer más de 50 cm por año, tienen un tronco grueso, la floración comienza a los 5-7 años después de ser plantado y tiene una vida productiva de 80 a 100 años, son heterocigóticas, es decir, son de polinización cruzada (Figura 8A). Los frutos varían en cuanto a su tamaño, van de mediano a grande, tienen una copra abundante con un alto contenido de aceite (Figura 8B). Los cultivares altos se encuentran principalmente en la India, Filipinas, Sri Lanka, el oeste de África, Panamá, Malasia, Jamaica y México (Yang et al., 2018; Niral & Jerard, 2019).

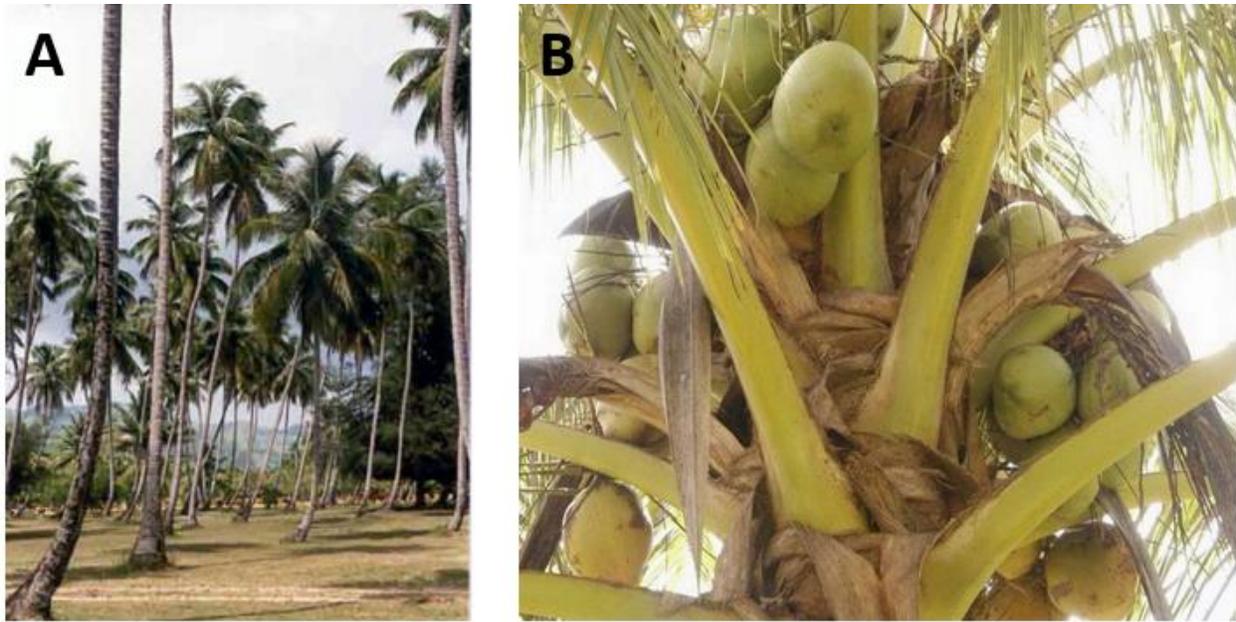


Figura 8. Cocotero de las variedades altas. (A) Palma de coco, *Cocos nucifera* L. de la variedad "Alto de Jamaica". Fuente: (Howard et al., 2021). (B) Fruto de la palma de coco Alto del Pacifico. Fuente: Cocorporativo S. A. de C. V.

1.3.2.2. Variedades enanas

Los cocos enanos tienen un alto valor comercial, debido a su producción temprana de frutos, entre los 3 y 4 años, su corta altura entre 8 a 10 metros, además son más resistentes a ciertas enfermedades; el tiempo de producción es de 40 a 50 años. Las palmas de la variedad enana se autopolinizan y son más homogóticas que las altas. El fruto tiene un tamaño de pequeño a mediano y se cree que se originaron de las palmas altas mediante mutaciones o por endogamia (Figura 9A,B) (Werth, 1933; Swaminathan & Nambiar, 1961; Yang et al., 2018; Niral & Jerard, 2019).

Los cultivares más populares crecen en la India y son el enano verde, naranja de Chowghat, el enano naranja de Kenthali y el enano verde de Gangabondam, algunos cultivares considerados exóticos crecen en Malasia y son el amarillo, naranja y verde, siendo estos últimos los más populares y los que más se cultivan alrededor del mundo (Niral & Jerard, 2019).



Figura 9. Cocotero de las variedades enanas. (A) Palma de coco enano malayo (*Cocos nucifera* L.). Fuente: THE GREEN SHOP. (B) Fruto de la palma de coco enano verde de Brasil. Fuente: Precio D México.

1.3.3. Morfología

La palma de coco es una monocotiledónea, posee un tallo único que carece de corteza, no forma brotes, no está ramificada y no cambia su grosor, carece de una raíz primaria y nunca engrosa una vez formada (Yang et al., 2018; Niral & Jerard, 2019).

La palma posee un solo tallo con una corona de hojas, tiene una sola yema terminal llamada repollo, el grosor del tallo está determinado por su vigor, las condiciones del suelo y el tipo de variedad, por lo general es de color grisáceo (Cuéllar, 2018; Niral & Jerard, 2019).

La raíz emerge de la base del tallo y se produce durante toda la vida de la palma, el número de raíces varía de acuerdo con la edad de la palma, el grosor del tallo, el tipo de suelo, entre otros, el número de raíces oscila entre 1500 a 7000 (Harries, 1978). Las raíces principales forman raíces secundarias las cuales se ramifican generando una superficie por la cual la palma tomará los nutrientes del suelo, estas están en constante desarrollo e inicialmente son de color amarillo y gradualmente por acción de la luz y el tiempo se tornarán grisáceas o marrones (Menon & Pandalai, 1958; Ohler, 1984).

La palma de coco tiene una corona de hojas abiertas en el ápice que rodean a la yema, las hojas pequeñas miden alrededor de 25 cm y las grandes de 80 a 120 cm. Comprenden cuatro conjuntos distintos, el primero se compone de las 10 a 12 hojas más viejas, el segundo tiene de 10 a 14 hojas en donde se sostienen los racimos del fruto, el tercero incluye de las 10 a 12 hojas más jóvenes y el cuarto conjunto comprende a las hojas más internas en estado de despliegue, incluyendo a las que aún no han emergido (Venkatanarayana, 1957; Periasamy, 1965; Padmanabhan, 1992). Las hojas están organizadas en cinco espirales que corren en el sentido de las manecillas del reloj o en sentido contrario y se sitúan de manera que los rayos del sol penetran a cada una de ellas (Davis, 1962).

1.3.3.1. Inflorescencia

El cocotero posee flores masculinas y femeninas en la misma inflorescencia y están recubiertas por una estructura de protección, llamada espádice o espata. Cuando la espata se rompe debido a la fuerza de expansión se expone la inflorescencia. Los primordios de la inflorescencia pueden visualizarse alrededor de los cuatro meses después de que la primera hoja se diferencia (Figura 10A); (Thomas & Josephraj Kumar, 2013; Yang et al., 2018; Niral & Jerard, 2019). El eje central de la inflorescencia se denomina raquis y tiene alrededor de 30 a 35 ramas, cada una de estas lleva numerosas flores, las flores son sésiles o subsésiles (Menon & Pandalai, 1958; Niral et al., 2008).

Las flores masculinas y femeninas se diferencian unos doce meses antes de la apertura de la espata, las flores masculinas se forman un mes después que las femeninas, pero maduran un mes antes, el ovario se diferencia entre 6 y 7 meses antes de la apertura de la espata (Figura 10B); (Niral & Jerard, 2019).

Las palmas altas son consideradas alógamas, aunque se puede presentar la autopolinización cuando hay una interacción entre las flores femeninas de un espádice con las flores masculinas de otra inflorescencia. Por su parte, las palmas enanas son consideradas autógamas, el pistilo y el estambre maduran simultáneamente; eso propicia que las flores femeninas reciban el polen al mismo tiempo (Thomas & Josephraj Kumar, 2013).



Figura 10. Inflorescencia de la palma de coco (*Cocos nucifera* L.) A). Espata cerrada. Fuente: Sudha y colaboradores, 2021. B) Espata abierta con flores masculinas y femeninas. Fuente: Boletín Naturalist Newsletter.

1.3.3.1.1. Flor

Las flores masculinas superan en número a las flores femeninas; el número varía según la longitud de las espigas, son las primeras en abrir, se encuentran en la parte superior de las rachillas y descienden hacia la base del raquis (Thomas & Josephraj Kumar, 2013). La flor se compone de tres sépalos, tres pétalos y seis estambres de aproximadamente 8 mm, las anteras son de color amarillo (Figura 11A). La apertura de las flores comienza desde el ápice de la espiga y se extiende hacia abajo, las cuales abren de 8 a 10 de la mañana, con una vida útil de 18 a 22 días (Nampoothiri, 1970).

Las flores femeninas se encuentran en menor número que las masculinas, el número de las flores depende de la variedad y de las condiciones ambientales; por lo general, la inflorescencia tiene de 10 a 50 flores femeninas, entre el 50-70% de ellas son abortadas. Poseen una estructura globular de alrededor de 13-25 mm, contienen seis periantos con un anillo en la base y un estilo corto con tres estigmas en el centro, el ovario es tricarpelar, con un solo óvulo en cada carpelo, y solo un óvulo es fértil (Figura 11B).

Las flores femeninas se vuelven receptivas de 3 a 4 semanas después de que la espata abrió y se mantienen fértiles por un lapso de 1 a 3 días, el intervalo que transcurre entre la apertura de la primera y la última flor es de 5 a 7 días dependiendo de la variedad (Thomas & Josephraj Kumar, 2013; Yang et al., 2018; Niral & Jerard, 2019).



Figura 11. Flores del cocotero. A) Flores masculinas, de color amarillo, numerosas y de tamaño pequeño presentes en parte superior de la inflorescencia. B) Raquilla con flores femeninas, ubicadas cerca de la base del raquis. Fuente: Sudha y colaboradores, 2021.

1.3.3.2. Fruto

El fruto es considerado una nuez, aunque botánicamente es un fruto tipo drupa; está compuesto de un exocarpio/epicarpio que es la capa más externa y llega a tener tonalidades (verde, amarillo, rojo o naranja, según la variedad) (Figura 12). Cuando el fruto alcanza la madurez este cambia de color y se vuelve café-marrón. El mesocarpio, se sitúa debajo del epicarpio, su grosor va de 2 a 15 cm según la variedad y debajo de este se encuentra el endocarpio también llamado caparazón. En el lado basal del endocarpio hay tres poros que representan los carpelos del ovario, uno de estos es suave y debajo de este se sitúa el embrión, mismo que se encuentra envuelto por el endospermo sólido y los otros dos son duros. Entre el endospermo y el endocarpio hay una delgada capa color marrón llamada testa, esta se adhiere al endospermo (Figura 12) (Menon & Pandalai, 1958).

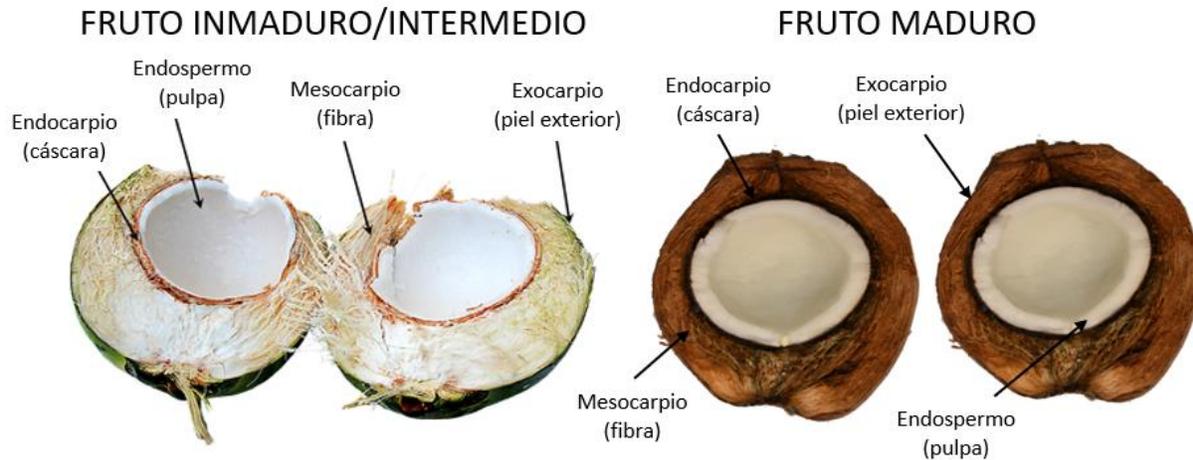


Figura 12. Morfología del fruto de la palma de cocotero. Tomado y modificado de deCocOrgánico.

1.3.3.2.1. Endospermo

El endospermo de cocotero es triploide de tipo nuclear, en donde los núcleos aumentan en tamaño por la fusión de dos o más de ellos; durante este proceso, el saco embrionario es llenado por un líquido translúcido que contiene numerosos núcleos denominado líquido sincitial o endospermo líquido. Durante el desarrollo del fruto en la periferia del saco embrionario se forma un aglomerado de células que forman un endospermo blanquecino de consistencia gelatinosa llamado endospermo sólido, su deposición se hace desde el lado antipodal hacia el lado micropilar (Cutter Jr et al., 1955; Abraham & Mathew, 1963). Conforme el fruto madura, las células del endospermo sólido aumentan y la cantidad de endospermo líquido se reduce gradualmente (Cutter & Freeman, 1954; Cutter Jr et al., 1955; Niral & Jerard, 2019; Nigam, 2020).

El desarrollo del endospermo sólido se vuelve visible a los 6 meses después de la fertilización y alcanza su punto máximo alrededor de los 9 meses (Satyabalan, 1953; Abraham & Mathew, 1963; Abraham et al., 1965; Bhatnagar & Sawhney, 1981; Niral et al., 2009; Nigam, 2020).

El desarrollo del endospermo nuclear involucra el coenocito, la celularización, la diferenciación y maduración. En la diferenciación celular se encuentran cuatro tipos de células; las que contienen almidón, células de aleurona, células de transferencia y las células que rodean al embrión denominadas células de colapso (Nigam, 2020).

Las células del endospermo son grandes, isodiamétricas, tienen paredes celulares delgadas y almacenan gran cantidad de sustancias de reserva que se acumulan en espacios específicos

dentro de la célula (almidón, carbohidratos, lípidos y proteínas). Durante la maduración las células de la periferia pierden su actividad meristemática, alargándose y engrosando sus paredes celulares, estas células contienen gránulos de aleurona compuestos principalmente de cuerpos lipídicos, proteicos y carbohidratos, y durante la germinación las células aleuronas secretan enzimas que transportan las reservas del endospermo al embrión (DeMason & Sekhar, 1990; Nigam, 2020).

1.3.3.2.2. Embrión

Después de la fertilización del óvulo se forma el cigoto, compuesto por una zona terminal y basal que dará paso a la división celular, las células de la zona terminal se dividen de manera vertical u oblicua, mientras que las células de la zona basal lo hacen de manera vertical (Figura 13A). Las células de la zona terminal tienen mayor actividad de división, solo una parte de ellas dará paso al embrión, las demás células permanecerán sin cambios y formarán las células del suspensor (Figura 13B) (Haccius & Philip, 1979).

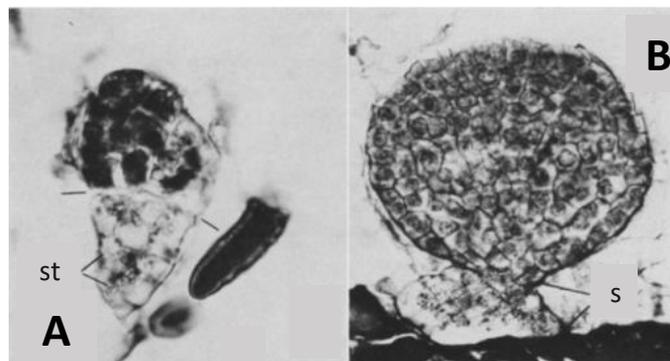


Figura 13. Etapas tempranas del desarrollo del embrión cigótico de cocotero. A) Embrión inmaduro con división celular en la parte superior con presencia de células que contienen almidón (st). B) Embrión globular, con el suspensor (s) derivados de la división celular. Tomado de Haccius & Philip, (1979).

Para la formación del embrión globular las células periféricas se dividen y forman un complejo que rápidamente se alarga formando el protodermo e inicia una diferenciación celular más evidente y las células aumentan su contenido de almidón y el número de vacuolas (Haccius & Philip, 1979).

Las células que formarán al tallo se forman en el polo terminal del embrión globular, cerca de la zona se encuentran células meristemáticas y procambiales, en esa misma zona se forma el hipocótilo y los primordios cotiledonares que se expanden cerca del tallo formando el

meristemo apical; durante este proceso el crecimiento del embrión es asimétrico (Figura 14) (Haccius & Philip, 1979).

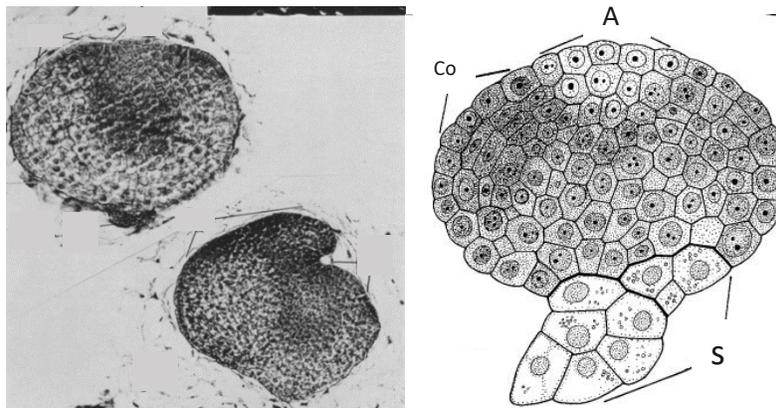


Figura 14. Micrografía e ilustración del embrión cigótico de cocotero en estadio globular. Embrión inmaduro con división celular, formación del meristemo apical del tallo (A), y del cotiledón (Co), en este punto aún se observan las células del suspensor (s). Tomado de Haccius & Philip, (1979).

En el desarrollo del cotiledón se forman ramificaciones que originarán al epicótilo, también llamado plúmula y que desarrollará la hoja primordial. La diferenciación del hipocótilo o el polo radicular se da después de la formación de los primordios de la plúmula (Gátin, 1906; Haccius & Philip, 1979). Enseguida, hay una activación en la división celular de la parte superior del embrión que se encuentra lejana del endocarpo; formando un cuerpo cilíndrico, esta zona se conoce como haustorio que será importante en el proceso de germinación (Figura 15A,B) (Menon & Pandalai, 1958; Abraham & Mathew, 1963; Haccius & Philip, 1979).

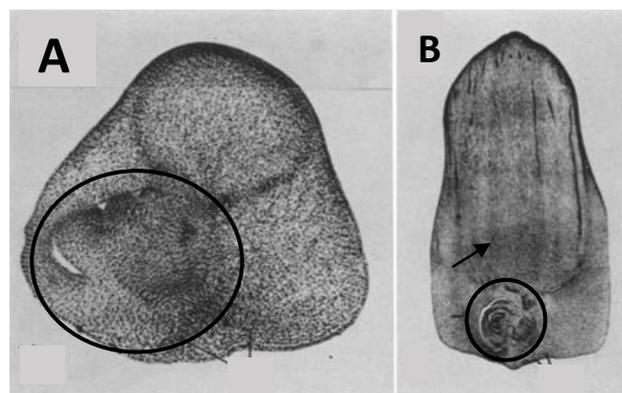


Figura 15. Corte histológico del embrión de cocotero. A) Intermedio. B) Maduro. Los círculos encierran al cotiledón en diferenciación o desarrollado y la flecha señala la zona del haustorio. Tomado de Haccius & Philip, (1979).

El embrión se encuentra embebido en el endospermo, justo debajo del poro de germinación, la plúmula y la radícula se pueden distinguir dentro del extremo proximal del embrión; en cortes transversales, la plúmula se encuentra en la zona meristemática central encerrada por los coleóptilos, la radícula se sitúa frente a la plúmula y dentro de la masa apical de las células meristemáticas (Menon & Pandalai, 1958; Abraham & Mathew, 1963).

En la germinación el embrión se desarrolla simultáneamente en dos direcciones, la parte apical sale a través del poro de germinación, la plúmula y la radícula crecen fuera del endocarpio desde el extremo distal del embrión, el cotiledón se expande para formar un haustorio en forma de pera o manzana dentro de la cavidad central del fruto (Niral & Jerard, 2019).

1.3.4. Sustancias de reserva

El cocotero al ser una semilla oleaginosa almacena en el endospermo sólido lípidos o triacilgliceroles, siendo los triacilgliceroles el mayor componente de las reservas en la célula, en forma de cuerpos lipídicos, oleosomas o esferosomas (Herman, 1995). En el coco hay presencia de ácidos grasos de cadena media y otros ácidos grasos saturados como el palmítico, esteárico, entre otros (Browse, 1997).

El componente principal de las reservas en las semillas son las proteínas, acumuladas en organelos denominados cuerpos proteicos que se encuentran delimitados por una membrana, también se encuentran otras proteínas presentes como enzimas y lectinas, entre otras (Demason, 1997).

En el endospermo de coco hay dos tipos de células, las que actúan como almacén o de reserva y las células aleuronas, las células aleuronas rodean a las células de reserva donde se presentan abundantes cuerpos proteicos ricos en arabinosilanos y glucanos con pequeñas cantidades de glucomanos y celulosa, llamadas granos aleuronares rodeados por lípidos (Fincher, 1989; Demason, 1997). En el endospermo del coco hay presencia de proteínas cristaloides denominadas globulinas, proteínas denominadas 11S y 7S, y una proteína de 55 kDa (DeMason & Sekhar, 1990). Actualmente, a la proteína de 55 kDa se le ha llamado cocosina, que pertenece a la familia de las globulinas 11S (Jin et al., 2017).

El fruto de cocotero tiene un alto contenido de carbohidratos que disminuyen mientras el fruto se desarrolla (Kumar & Samsudeen, 2018). La mayor parte son azúcares solubles totales y polisacáridos hidrolizables, durante los 7-8 meses la cantidad de azúcares solubles totales es de 41.42 mg/ml, durante los meses 8-11 los carbohidratos disminuyen del 73% al 33%, algunos

carbohidratos como los mananos aumentan su presencia del 17% al 64% entre los 8-11 meses (Samonte, 1988).

Las concentraciones de azúcares reductores y solubles aumentan durante la maduración del fruto y disminuyen durante las primeras etapas de germinación, el exceso de carbohidratos almacenados en el endospermo se deposita en el haustorio como almidón, ocupado durante el proceso de germinación, en las células del haustorio se encuentran la amilasa, la β -manosidasa y sacarosa (Balasubramaniam et al., 1973; Manivannan et al., 2018).

Estudios realizados en el embrión de cocotero han demostrado que en el haustorio hay 44.2% de azúcares solubles, 24.5% de almidón, 5.50% de proteínas, 1.99% de lípidos, entre otros compuestos como minerales, polifenoles, alcaloides y sustancias promotoras del crecimiento (Balasubramaniam et al., 1973; Manivannan et al., 2018).

El haustorio posee lípidos y gránulos de almidón que aumentan conforme el fruto madura, ambos participan activamente en la absorción de las reservas de lípidos del endospermo en degradación y la conversión de carbohidratos que se acumulan en el haustorio en las etapas tempranas y se mantienen hasta que el fruto madura y posteriormente se degradan (Sugimura & Murakami, 1990; Sudha et al., 2021), el haustorio almacena lípidos en la parte externa y carbohidratos en la zona interna, ambas son las dos reservas más importantes para la geminación del embrión (Sudha et al., 2021).

En un estudio realizado en 1999 embriones cigóticos maduros germinados *in vitro* y *ex vitro*, además, del endospermo sólido y líquido de los frutos maduros se demostró que hay diferencias en cuanto al contenido de ácidos grasos y que este depende del tipo de tejido (Lopez-Villalobos et al., 1999). El ácido láurico es el ácido graso más abundante en el haustorio (López-Villalobos et al., 2001), durante el desarrollo del tejido haustorial, los lípidos se agrupan en pequeños cuerpos lipídicos y se observan en forma de gotas en el haustorio (López-Villalobos et al., 2011).

En los embriones cigóticos en diferentes etapas de desarrollo hay proteínas cinasas de treonina, serina y de tirosina, todas ellas involucradas en la regulación del desarrollo y morfogénesis del embrión (Islas-Flores et al., 1998). Además, en las variedades de Alto de la costa Oeste y Enano naranja de Chowghat se han encontrado polipéptidos con un rango de peso que van en un rango molecular de entre 12 y 90 a kDa, dicho patrón se conserva durante el desarrollo de los embriones cigóticos (Manimekalai et al., 2011).

Por otra parte, en el tejido haustorial se encuentra menor cantidad de metionina, cisteína, fenilalanina, tirosina, leucina y de isoleucina en comparación con los otros tejidos (Manivannan et al., 2018).

Dado el conjunto de resultados descritos en cuanto al desarrollo del embrión del cocotero, y la capacidad de acumular reservas y que conlleva a la remodelación de las paredes celulares que acompañan al desarrollo y maduración del fruto del cocotero, en este trabajo se analizó la metil esterificación-desesterificación de la pectina, así como la acumulación de las reservas en dos variedades del mismo. El análisis se llevó a cabo en las variedades Alto del Pacífico mexicano y Enano verde de Yucatán con el objetivo de determinar su comportamiento de acumulación durante el desarrollo del embrión cigótico y sus tejidos adyacentes.

JUSTIFICACIÓN

Las propiedades de la pared celular como la elasticidad, hidratación, porosidad y adhesión están estrechamente vinculadas con la composición y modificación de las pectinas (Braybrook et al., 2012; Barnes & Anderson, 2018).

La esterificación y desesterificación de la pectina desempeña un papel importante en la expansión y elongación celular, la desesterificación conduce a la relajación y disminución de la rigidez de la pared celular en las zonas meristemáticas, lo que da paso a la organogénesis. Lo anterior sugiere que hay una conexión entre la esterificación/desesterificación y las propiedades biomecánicas de la pared celular y la división y el crecimiento celular, un ejemplo son los tubos polínicos en los cuales una alta metil esterificación produce un alargamiento más rápido (Lord & Mollet, 2002; Mastroberti & De Araujo Mariath, 2008; Braybrook & Peaucelle, 2013; Levesque-Tremblay et al., 2015; Phan et al., 2020).

La actividad de la PME que desesterifica a la pectina se asocia al alargamiento de la radícula y al debilitamiento del endospermo, que ocurren antes de la germinación, este proceso se lleva a cabo de manera diferencial y específica en el tejido durante la germinación de las semillas, tanto en las angiospermas como gimnospermas (Müller et al., 2006; Bárány et al., 2010; Levesque-Tremblay et al., 2015; Solís et al., 2016). Se ha reportado que en la pared celular de embriones existen variaciones en cuanto a la distribución espacial de la pectina metil desesterificada y metil esterificada, dependiendo de las zonas que forman parte del embrión y las etapas del desarrollo embrionario durante la embriogénesis somática y cigótica (Chapman et al., 2000; Van Hengel et al., 2002; Šamaj et al., 2005; El-Tantawy et al., 2013; Rodríguez-Sanz et al., 2014 Pérez-Pérez et al., 2019).

Chapman y colaboradores en el 2000 reportaron que durante la morfogénesis y el desarrollo de embriones somáticos de chicori, la pectina metil desesterificada tiene un papel importante en la mecánica la pared celular de los embriones. Posteriormente en 2018 Cruz-Valderrama y colaboradores, estudiaron la función de la pectina metil esterificada en el desarrollo del embrión y el endospermo en semillas de *Arabidopsis*, concluyeron que la metil desesterificación de la pectina se asocia a la relajación y ablandamiento de la pared celular; por ello, es vital para el desarrollo del embrión y del endospermo. Ese mismo año Pérez-Pastrana y colaboradores analizaron la dinámica de la metil esterificación/desesterificación de la pectina durante el desarrollo de semillas de chile habanero, con los resultados obtenidos concluyen que la

dinámica de la pared celular es importante en el proceso embriogénico. Por su parte, Du y colaboradores en 2020 estudiaron la dinámica de la pared celular durante la embriogénesis cigótica de *Castanea mullissima*, en su trabajo concluyeron que los cambios en la pared celular acompañan en todo el proceso de desarrollo y que dicha dinámica es vital para el desarrollo del embrión.

El entendimiento de la estructura, la síntesis y la división espacial de la esterificación y desesterificación de la pectina es crucial para comprender los procesos de maduración de los frutos climatéricos como de los no climatéricos y de las semillas ortodoxas y no ortodoxas. El cocotero es un fruto no climatérico y también una semilla no ortodoxa, hasta la fecha se conoce muy poco del comportamiento de la metil esterificación-desesterificación de la pectina en las paredes celulares que acompaña al proceso de maduración del fruto y la ocurrencia de la embriogénesis cigótica de la semilla.

El único trabajo en cocotero reportado es el de Verdeil en 2001, donde se analizó el grado de metil esterificación-desesterificación de la pectina durante las etapas tempranas de formación de embriones somáticos, sin embargo, no se obtuvieron resultados concluyentes.

Durante el desarrollo del fruto de cocotero, se van depositando en las células del embrión y del endospermo sustancias de reserva (lípidos, carbohidratos, almidón y proteínas) que serán degradadas durante el proceso de germinación (Sudha et al., 2021).

Las sustancias de reserva difieren en su distribución espacial en los tejidos, tanto del embrión como del endospermo; por ello, la presencia de sustancias de reserva que se acumulan mientras otras decrecen durante el desarrollo del embrión y el endospermo se correlaciona con el proceso de desarrollo y maduración del fruto de cocotero, el estudio de la acumulación y el transporte que se da desde las etapas tempranas es parte fundamental del entendimiento del desarrollo del fruto de cocotero.

Por lo anterior, en este estudio se analiza el grado de metil esterificación y desesterificación de la pectina y la disposición de las sustancias de reservas en tres estadios de maduración de embriones cigóticos en las dos variedades de cocotero (Enano verde de Yucatán y Alto del Pacífico mexicano). Con el objetivo de aportar conocimiento fundamental y entender en parte como se relacionan dichos procesos con la maduración del embrión cigótico que forma parte y se desarrolla embebido en el endospermo sólido de la semilla, misma que es no ortodoxa, y que a su vez también es un fruto no climatérico.

HIPÓTESIS

La embriogénesis cigótica va acompañada del desarrollo y maduración de la semilla y el fruto. Durante este proceso las paredes celulares sufren cambios en el grado de metil-esterificación /desesterificación de la pectina y existe una acumulación de reservas; por ello, el análisis de frutos y embriones de distintas variedades de cocotero y en distintos estadios de desarrollo mostrará que conforme el embrión cigótico y sus tejidos adyacentes maduran, la pectina se encontrará mayormente metil desesterificada, y la movilización de las reservas aumentará considerablemente en las últimas etapas de desarrollo.

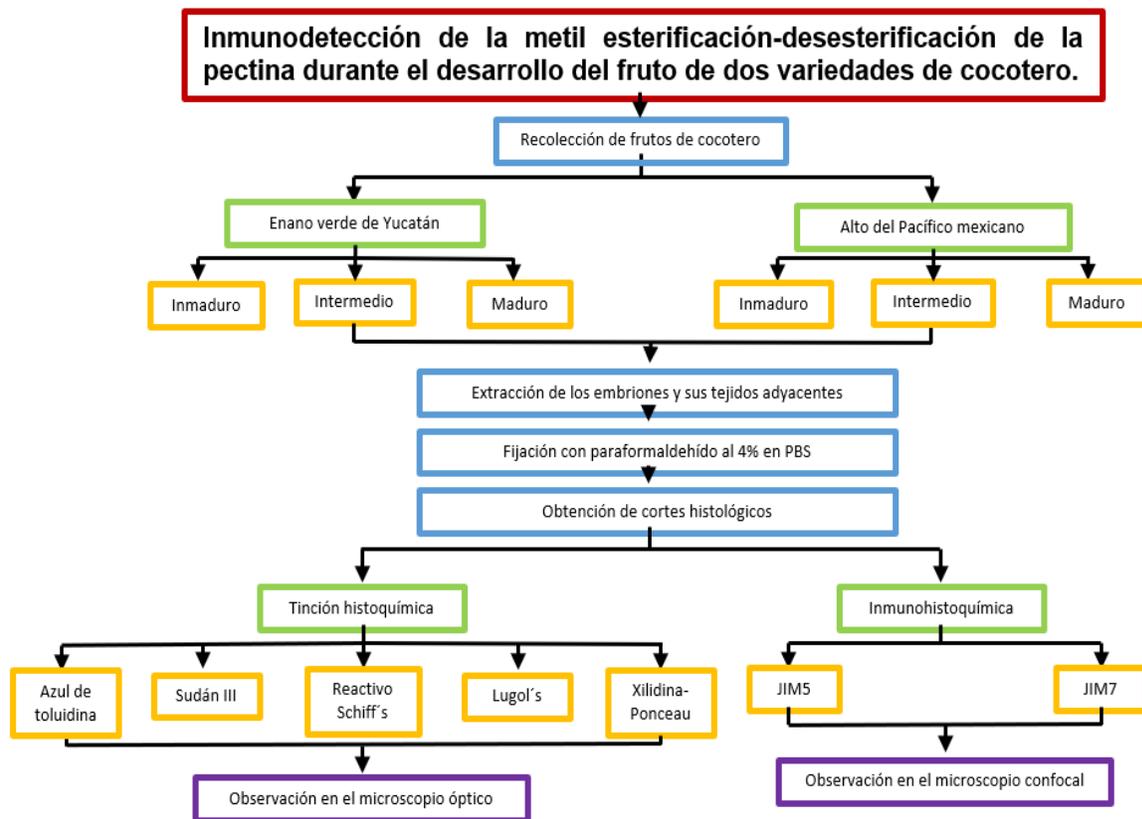
OBJETIVO

Analizar la dinámica de la metil esterificación-desesterificación de la pectina, así como la de las sustancias de reserva en el embrión cigótico y de sus tejidos adyacentes mediante técnicas histológicas e inmunohistoquímicas en tres estadios de maduración en dos variedades de cocotero (*Cocos nucifera* L.)

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Analizar mediante histología y tinción histoquímica la estructura celular de los embriones cigóticos de las dos variedades de cocotero (*Cocos nucifera* L.) en diferentes estadios de madurez.
2. Analizar la acumulación de las reservas a través de tinciones histoquímicas durante el desarrollo del embrión cigótico de cocotero y sus tejidos adyacentes en tres estadios de madurez de dos variedades.
3. Analizar, por medio de inmunohistoquímica con los anticuerpos monoclonales JIM5 y JIM7, la distribución de la metil esterificación y desesterificación de la pectina en embriones cigóticos de las dos variedades de cocotero en diferentes estadios de madurez.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Selección del material

En plantaciones de cocotero, localizadas en la Península de Yucatán, se seleccionaron dos variedades de cocotero (*Cocos nucifera* L.), Enano verde de Yucatán (Ticul, Yucatán) y Alto del Pacífico mexicano (San Crisanto, Yucatán) en tres estadios de maduración (inmaduro, intermedio y maduro).

Se conoce que el cocotero emite una inflorescencia cada 28-30 días. En base a ello, los estadios de maduración de las inflorescencias y por ende, de sus frutos, se basó en la inflorescencia recién emergida y aún sin abrir, ubicada en la parte superior del tronco de la palma, más cercana a la yema apical de las hojas más jóvenes (Islas-Flores et al., 1998; Perera et al., 2010; Krisanapook et al., 2019). Dicha inflorescencia se considera como cero (tomado como mes cero), a partir de ahí las inflorescencias se cuentan en sentido contrario al giro de las manecillas del reloj y en orientación hacia la base del tallo. La edad de las inflorescencias y de los frutos aumenta conforme se avanza en dirección hacia la base del tallo.

Los frutos de seis meses son considerados jóvenes o inmaduros por las características físicas que se observan a simple vista, poseen un exocarpio ceroso, contienen mayor cantidad de endospermo líquido, además, el desarrollo del endospermo sólido ya es visible, aunque es translúcido y su consistencia es gelatinosa.

Los cocos de ocho o nueve meses están en un estadio intermedio, ya no son frutos jóvenes, pero aún no son maduros, el exocarpio ya no es tan ceroso y tiende a cambiar de color verde hacia colores más cafés-pardos, los cocos son menos pesados y al ser agitados producen el sonido del agua en movimiento, y el endospermo ya se ha desarrollado en su totalidad.

Los frutos de diez meses en adelante se consideran maduros, el exocarpio tiende a oscurecerse y en algunos frutos cambia de liso a una apariencia más parecida a la madera, son ligeros y producen un sonido hueco al agitarse (Yang et al., 2018; Javel et al., 2019; Niral & Jerard, 2019).

Los frutos inmaduros, intermedios y maduros de las dos variedades se etiquetaron, se colocaron en costalillos y se transportaron al laboratorio para su procesamiento.

2.2. Extracción del embrión y sus tejidos adyacentes

En el laboratorio, a los frutos de cocotero de acuerdo con su variedad y madurez, se les retiraron las capas externas de la cáscara (epicarpio y mesocarpio), y se cortaron por la mitad. Una sección de endospermo sólido localizada en la región que contiene al embrión se extrajo con un sacabocados. El tejido extraído se recuperó y colocó en recipientes de vidrio, previamente etiquetados para identificar la variedad y estado de madurez.

2.3. Fijación y preparación del tejido

Con ayuda de un bisturí, los segmentos de endospermo sólido que rodean a los embriones de las distintas etapas de desarrollo y variedad fueron recortados hasta dejar solo una pequeña sección que recubría a los embriones. Los tejidos fueron lavados con agua destilada estéril. Enseguida, se sumergieron en una solución fijadora compuesta de 4% de paraformaldehído en amortiguador de fosfatos (PBS) pH 7.4, se incubaron y mantuvieron a temperatura ambiente aplicándoles presión negativa (vacío) de 10 psi por tres días. Concluida la fijación, los tejidos fueron lavados 3 veces con amortiguador de fosfato (PBS) [KCl 3 mM, NaCl 138 mM, Na₂HPO₄ 8.1 mM, KH₂PO₄ 1.5 mM pH 7.4] en vacío. Los tejidos fueron puestos a vacío por 3 horas impregnados con sacarosa, primero al 10%, posteriormente, al 20% mas 3 gotas del medio NEG-50 (Thermo Fisher), y para la preparación de cortes congelados al 30% mas 6 gotas del medio NEG-50, toda la noche, en PBS.

2.4. Cortes del tejido en el criostato

En moldes de plástico a -27°C se colocó un pequeño volumen del medio de inclusión NEG-50 (Thermo Fisher) por 20 minutos, esto para prevenir que el endospermo que cubre al embrión de cocotero toque el fondo. Enseguida, los tejidos fijados y embebidos en sacarosa al 30%, se colocaron en el molde, seleccionando la posición deseada para obtener cortes longitudinales; a continuación, al tejido se le agregó NEG-50 (Thermo Fisher) y se congeló a -27°C por 45 minutos. La preparación se retiró del molde y se colocó en las placas para realizar los cortes, a la placa se le agregó del medio de inclusión a manera de cementante, se incubó por 15 minutos a -27°C. Transcurrido el tiempo las placas se colocaron a -80°C por 10 minutos. Enseguida, los cortes se realizaron en un criostato o criotomo (Leica) con grosores de 3,5,10,15 y 30 µm. Los cortes se colocaron en un portaobjetos y se fijaron al cristal con calor por 10 minutos a 65 °C.

2.5. Histoquímica

Una vez fijados en el portaobjetos, los tejidos se calentaron por 45 segundos a 60°C, enseguida se tiñeron por 30 segundos con azul de toluidina al 0.05% (p/v). Los cortes se destiñeron con lavados de agua destilada estéril y se observaron al microscopio para identificar los tejidos de interés. Además, se realizaron tinciones adicionales con Sudán III para la detección de lípidos (Ulrich Welsch & Sobotta, 2008), ácido periódico y reactivo de Schiff's para la detección de polisacáridos neutrales (Feder & O'brien, 1968), Xilidina-Ponceau para proteínas (Vidal, 1970) y reactivo de Lugol para la detección de almidón (Johansen, 1940).

2.6. Inmunocitocalización de la pectina metil esterificada/desesterificada

Las secciones de tejido fueron adicionadas con 50 µL PBS pH 7.4 más 0.5% de Tween 20 (PBS-T), adicionado con 5% de albúmina de suero bovino (BSA) incubando por 10 minutos. Se descartó el amortiguador de bloqueo, los tejidos se lavaron con (PBS-T) pH 7.4 y 1% de BSA; los cortes se incubaron con una dilución 1:7 de los anticuerpos monoclonales JIM5 o JIM7, durante una hora a 4°C. El anticuerpo JIM5 detectó a la pectina metil desesterificada, mientras que el anticuerpo JIM7 detectó a la pectina metil esterificada (Knox et al., 1990; Knox, 1997; Clausen et al., 2003; Sutherland et al., 2009). Concluida la incubación, se descartaron los anticuerpos y las secciones de tejido fueron lavadas 3 veces con 50 µL de PBS-T y 1% de BSA en cada lavado. Enseguida, a los cortes se les adicionó una dilución 1:50 del anticuerpo secundario conjugado a Alexa Fluor 484 y se incubó en oscuridad por media hora a temperatura ambiente. El anticuerpo secundario se descartó y los tejidos se lavaron tres veces con PBS-T y 1% de BSA. A los cortes se les adicionó glicerol puro, se cubrieron con un cubreobjetos y se observaron en un microscopio confocal a 484 nm de longitud de excitación y 555 nm de emisión, correspondiente a la detección de la señal del fluoróforo Alexa Fluor 484.

CAPÍTULO III

RESULTADOS

3.1. Morfología del fruto de cocotero

Siguiendo los criterios descritos en materiales y métodos para la colecta y clasificación de los estadios de maduración, en la figura 16 se muestran frutos de cocotero de los estadios inmaduro (6-8 meses), intermedios (9-10 meses) y maduros (11 meses en adelante). En el fruto inmaduro se observa un mesocarpio no lignificado y un endocarpio más suave sin lignificación y con poca presencia de endospermo sólido y embriones globulares y en forma de nave. En contraste, en el fruto intermedio se observa la acumulación del endospermo sólido, deshidratación e inicio de lignificación del mesocarpio y un endurecimiento y cambio en la coloración del endocarpio con embriones de mayor tamaño en forma de torpedo. Los frutos maduros tienen un endospermo abundante y se le observan embriones más grandes que en los estadios anteriores, y las células del mesocarpio y del endocarpio han cambiado de color y se han lignificado.

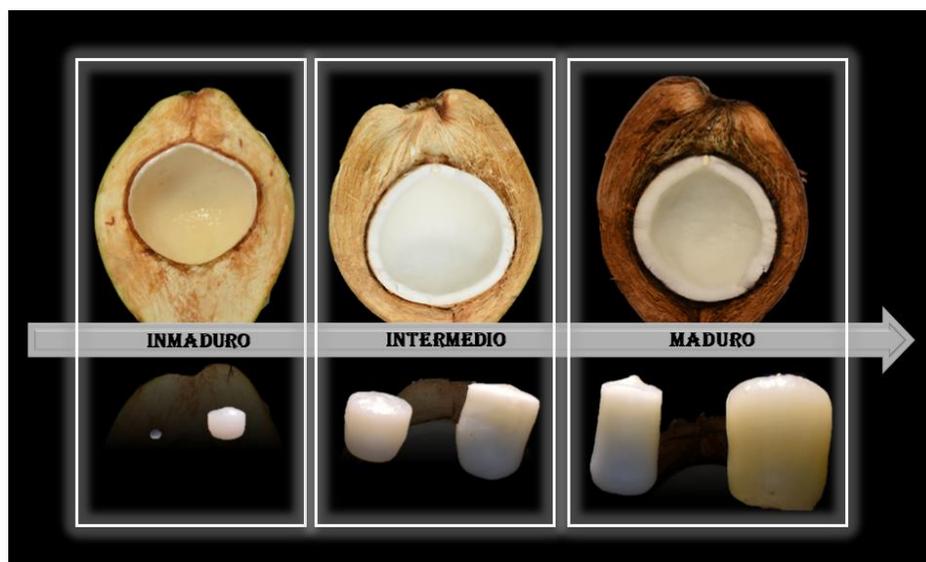


Figura 16. Frutos de cocotero en diferentes estadios de madurez acompañado del desarrollo del embrión (de izquierda a derecha).

3.1.1. Embriones de la variedad Enano verde de Yucatán

Los embriones de cocotero en las distintas etapas de desarrollo muestran similitudes y diferencias. En el estadio inmaduro la forma del embrión es cónica (Figura 17A). Una característica propia de un embrión inmaduro es la visualización de las células del suspensor, (Figura 17D). También es visible la formación de la plúmula misma que contiene a los meristemas apicales, radiculares, vasculares y cotiledonares (Figura 17C-E), además, es notoria la división hecha por la red de células provasculares, que dividen al embrión en la zona apical y distal. No solo el embrión tiene un desarrollo controlado, la formación del endospermo sufre un proceso similar, las células del endospermo se depositan alrededor de la testa y comienzan a agruparse para formar células en palizada. Mientras este proceso se lleva a cabo, se acumula material granular y las células se agrupan alrededor del embrión y conforme éste se desarrolla y madura, las células adyacentes y distales a este también lo hacen (Figura 17B).

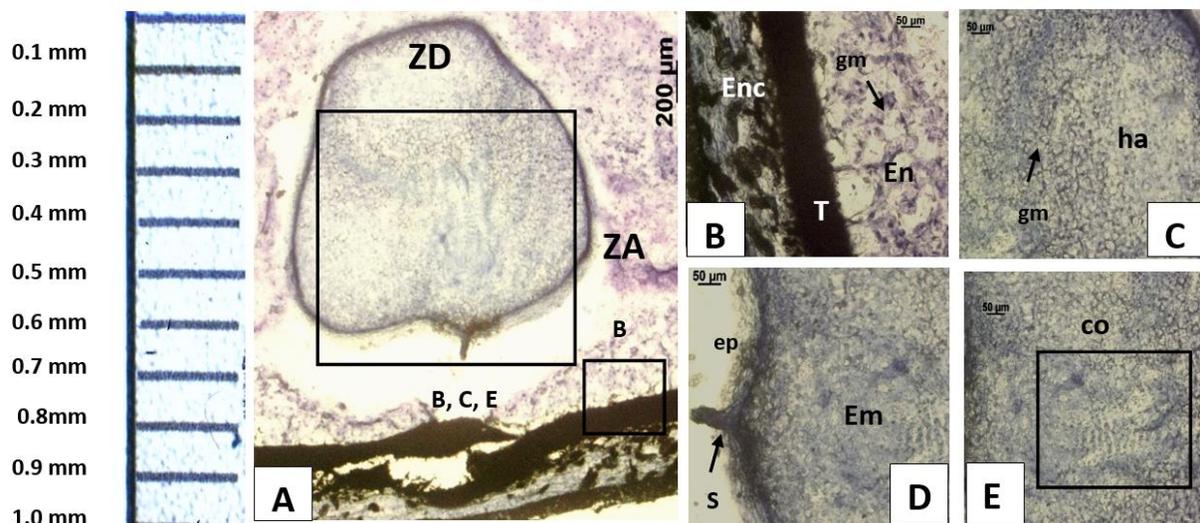


Figura 17. Morfología del embrión inmaduro de la variedad Enano verde de Yucatán y sus tejidos adyacentes. A) vista general del embrión y localización de las partes donde se encuentran los tejidos de interés (B-E). B) células del endospermo en formación. C) células que forman parte del haustorio. D,E) zona apical del embrión. ZA, zona apical; ZD, zona distal; Em, embrión; Enc, endocarpio; gm, material granular; En, endospermo; ha, haustorio; ep, epidermis; S, suspensor; co, cotiledón.

En el estadio intermedio, los embriones se desarrollan hasta alcanzar una forma de torpedo, con una longitud que oscila entre los seis y ocho milímetros (Figura 18A). Se observa la plúmula o cotiledón más desarrollado, los primordios de las hojas son prominentes y de acuerdo a lo reportado en la literatura se pueden llegar a observar pequeñas vellosidades características de las hojas embrionarias [Figura 18B; (Sugimura & Murakami, 1990)]. Los

haces vasculares son más notorios en comparación a los embriones inmaduros y los gránulos están más dispersos (Figura 18C). Las células de colapso del endospermo comienzan a degradarse perdiendo parte de su conformación estructural (Figura 18D); a su vez, se observa la epidermis del embrión y las células que forman el protoderma, las cuales se encuentran de manera ordenada (Figura 18E).

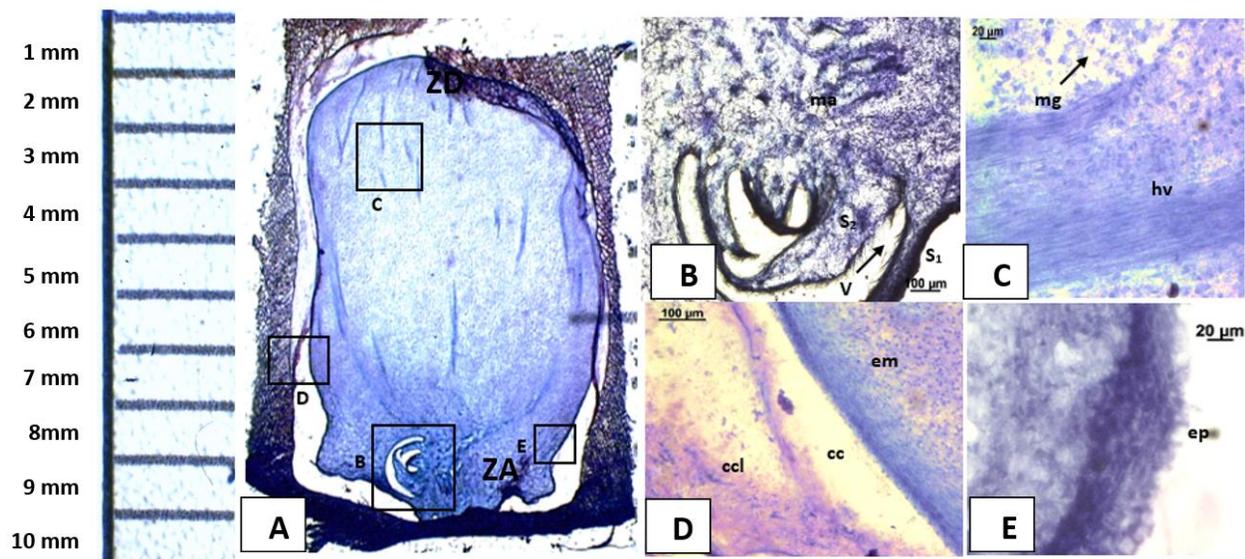


Figura 18. Morfología del embrión intermedio de la variedad Enano verde de Yucatán y sus tejidos adyacentes. A) estructura general del embrión y la localización de las partes donde se encuentran los tejidos de interés (B-E). B) cotiledón (las hojas embrionarias y el meristemo apical del brote). C) haces vasculares presentes en el haustorio. D) interacción entre el embrión y el endospermo. E) epidermis del embrión. ZA, zona apical; ZD, zona distal; S₁, primera hoja embrionaria; S₂, segunda hoja embrionaria; v, vellosidades de las hojas embrionarias; ma, meristemo apical del brote; mg, material granular; hv, haces vasculares; ep, epidermis del embrión; cc, cavidad de corrosión; em, embrión; ccl, células de colapso.

En el estadio maduro, el embrión aumentó su tamaño, llegando a medir casi nueve milímetros (Figura 19A); en la zona del cotiledón es visible el meristemo apical de la raíz, el nodo cotiledonar y los haces vasculares que rodean a la plúmula (Figura 19B). Un acercamiento al eje embrionario muestra la primera y segunda hoja embrionaria, cerca de las hojas embrionarias se localiza el meristemo apical del brote. Frente al epicótilo (hojas embrionarias) se ubican las células que formarán al hipocótilo (radícula), esta zona está rodeada por las células procambiales y las células meristemáticas (Figura 19C). En la parte distal del embrión se observan los haces provasculares que darán paso a la formación del xilema y del floema, así como del material granular (Figura 19D). Las células de la epidermis se han diferenciado en células alargadas que se encuentran aglomeradas y rodean la periferia del embrión (Figura

19E). También son visibles las células del endospermo que se encuentran cerca del embrión (células de colapso), estas células no se encuentran diferenciadas y solo se observa material granular en esas zonas (Figura 19F). Las células del endospermo que se encuentran en la parte distal al embrión están en un arreglo de bloques, estas células muestran grandes vacuolas y espacios intercelulares (Figura 19G). En la zona de la testa se observa una coloración verdosa-azulada con marrón, indicando que en esa zona es rica en lignina y compuestos fenólicos (Figura 19H).

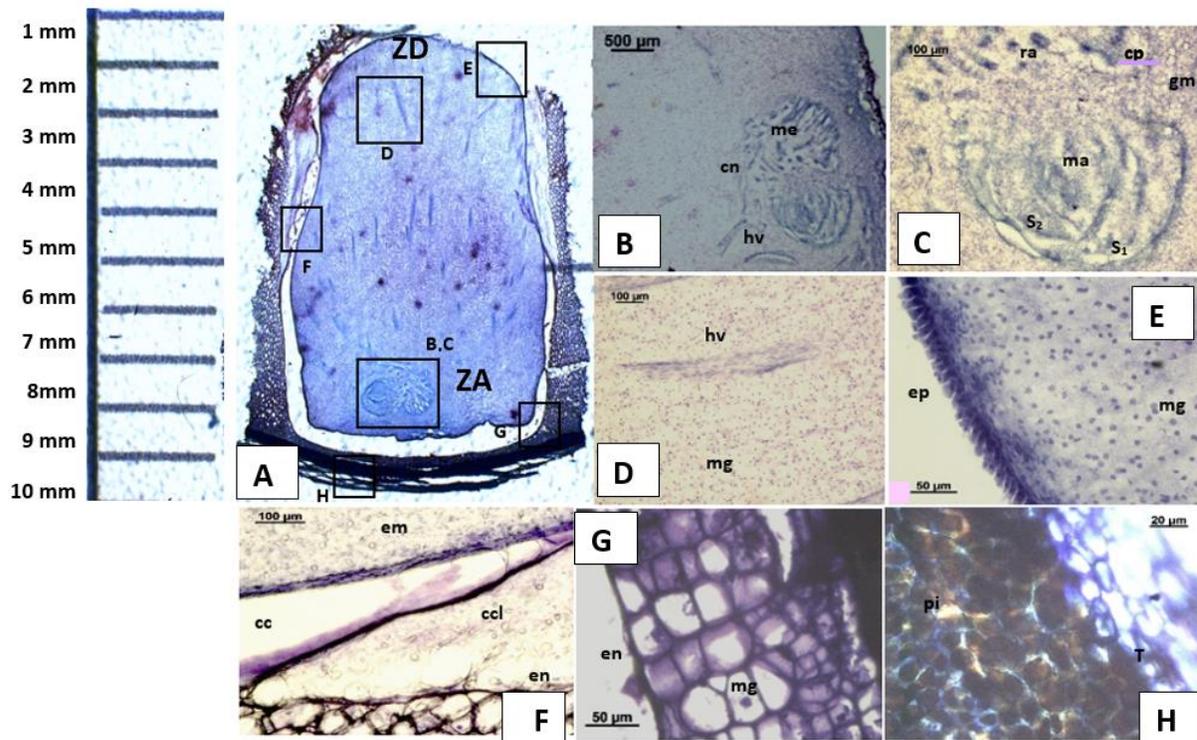


Figura 19. Morfología del embrión maduro de la variedad Enano verde de Yucatán y sus tejidos adyacentes. A) estructura general del embrión de coco con sus respectivas zonas de interés (B-H). B) plúmula. C) acercamiento a la plúmula, ubicado en la misma zona que en el recuadro B. D) zona distal del embrión donde se observan las células del haustorio, los haces vasculares y los gránulos que contienen sustancias de reserva. E) epidermis del embrión. F) células de colapso y la cavidad de corrosión. G) células del endospermo con presencia de vacuolas y espacios intracelulares. H) células de la testa que se encuentran lignificadas. ZA, zona apical; ZD, zona distal; S₁, primera hoja embrionaria; S₂, segunda hoja embrionaria; cn, nodo cotiledonario; ma, meristemo apical del brote; me, meristemo apical del hipocótilo o radícula; gm, grupo de células meristemáticas, mg, material granular; cp, células procambiales; hv, haces vasculares; ra, radícula; ep, epidermis del embrión; cc, cavidad de corrosión; em, embrión; en, endospermo; ccl, células de colapso; pi, tejidos lignificados; T, testa.

3.1.2. Embriones de la variedad Alto del Pacífico mexicano

El embrión inmaduro de la variedad alta tiene una forma cóncava (Figura 20A); en esta etapa hay un crecimiento y conformación celular específica, las zonas de la epidermis y las células del protoderma se encuentran definidas (Figura 20B). También las zonas provasculares, procambiales y cotiledonares están localizadas, y se observan desde las etapas tempranas del desarrollo del cotiledón y el haustorio (Figura 20C). Las células que rodean al embrión se encuentran en proceso de conformación estructural lo que dará paso a las células de colapso y almacenamiento de reservas (Figura 20D). La testa desde las etapas tempranas del desarrollo del embrión se encuentra lignificada, a su vez, se observan las células del endocarpo que forman una especie de red, la cual difiere con las demás células que conforman al fruto de cocotero (Figura 20E).

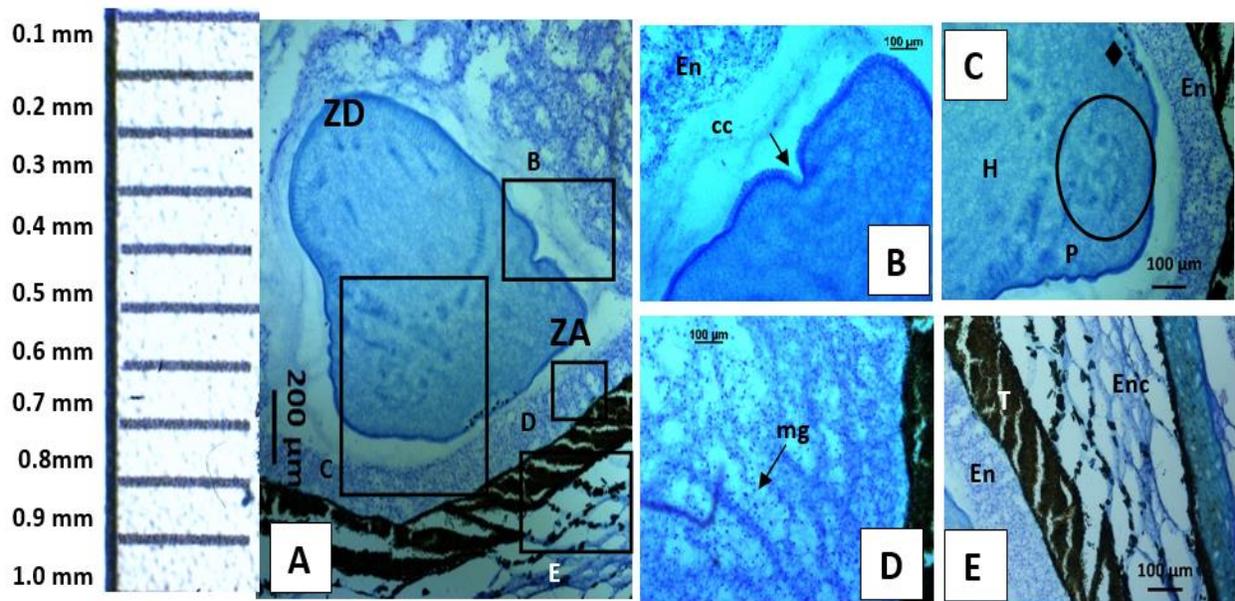


Figura 20. Morfología del embrión inmaduro de la variedad Alto del Pacífico mexicano y sus tejidos adyacentes. A) estructura general del embrión y la ubicación espacial de los tejidos de interés (B-E). B) interacción entre el embrión y el endospermo, y la conformación de la epidermis del embrión (flecha), y las células de colapso y de secreción en formación. C) conformación de las partes del embrión (plúmula y haustorio) y la detección de compuestos (rombo). D) células del endospermo y su conformación con la presencia de material granular. E) células del endocarpo y la testa. ZA, zona apical; ZD, zona distal; En, endospermo; cc, células de colapso; H, haustorio; P, plúmula; mg, material granular, Enc, endocarpo.

En el estadio intermedio se observó un crecimiento en el embrión, su longitud oscila entre 6 a 7 mm (Figura 21A). En este estadio ya se ha desarrollado la plúmula y se observan las hojas embrionarias, los meristemos apicales y parte de los meristemos radiculares (Figura 21B).

También se observan haces provasculares localizados principalmente en el haustorio que posteriormente darán paso a la formación del xilema y el floema. La zona del haustorio está delimitada por las células provasculares (Figura 21E), en contacto con la epidermis del embrión se encuentran las células de colapso (Figura 21C). Durante esta etapa de desarrollo la cavidad de corrosión que divide al embrión del endospermo es visible; las células del endospermo poseen una conformación más estructurada en forma de palizada, dichas células son más grandes que las células del embrión y presentan una mayor cantidad de vacuolas (Figura 21D).

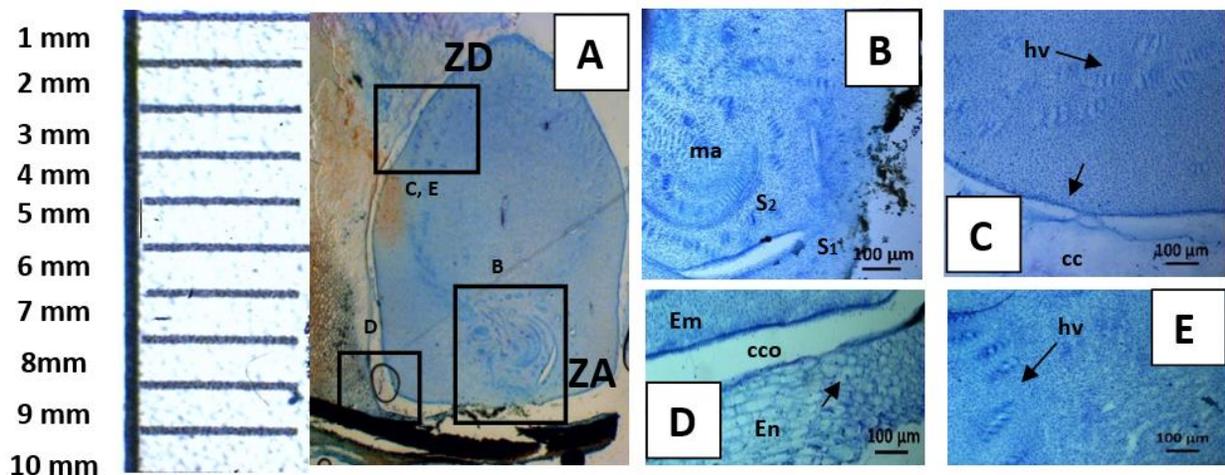


Figura 21. Morfología del embrión intermedio de la variedad Alto del Pacífico mexicano y sus tejidos adyacentes. A) estructura general del embrión y la ubicación espacial de las células de interés (B-E). B) conformación de la plúmula, denotando la presencia de las hojas embrionarias, así como los meristemas apicales del brote. C, E) células del haustorio, con la presencia de los haces vasculares que rodean al haustorio y se encuentran dentro del mismo y la epidermis del embrión en contacto con las células de colapso del endospermo, ubicadas en el mismo recuadro en la figura A. D) interacción de las células del embrión con las del endospermo y la cavidad de corrosión presente entre ambos tejidos. ZA, zona apical; ZD, zona distal; ma, meristemas apicales del brote; S₁, primera hoja embrionaria; S₂, segunda hoja embrionaria; hv, haces vasculares; cc, células de colapso; cco, cavidad de corrosión; Em, embrión, En, endospermo.

En el estadio maduro, los embriones tienen un tamaño mayor que oscila entre 8 a 10 milímetros (22A). A su vez, se observa la estructura completa de los primordios radiculares y foliares, así como las células meristemáticas y procambiales. También se observa el canal o poro germinativo por donde saldrán las hojas embrionarias y la radícula (Figura 22B, C). En este punto del desarrollo y maduración de la semilla, el embrión y el endospermo se han desarrollado por completo y están listos para dar paso al proceso de germinación. Por lo anterior, las células del endospermo son más grandes y se observan vacuolas de mayor tamaño dentro de la célula y con movilización de sus reservas a zonas más cercanas al embrión (Figura 22D). En el interior del embrión, las células del haustorio también están

vacuoladas y muestran una redistribución del material granular (Figura 22E). Se observa que las células del endospermo cercanas al embrión y las de colapso son de mayor tamaño y con evidente reducción de las reservas; además, en ciertas zonas presenta la degradación de la pared celular del endospermo (Figura 22F). Las células del endocarpo y la testa se mantienen con el mismo patrón, formando una red entrelazada (Figura 22G).

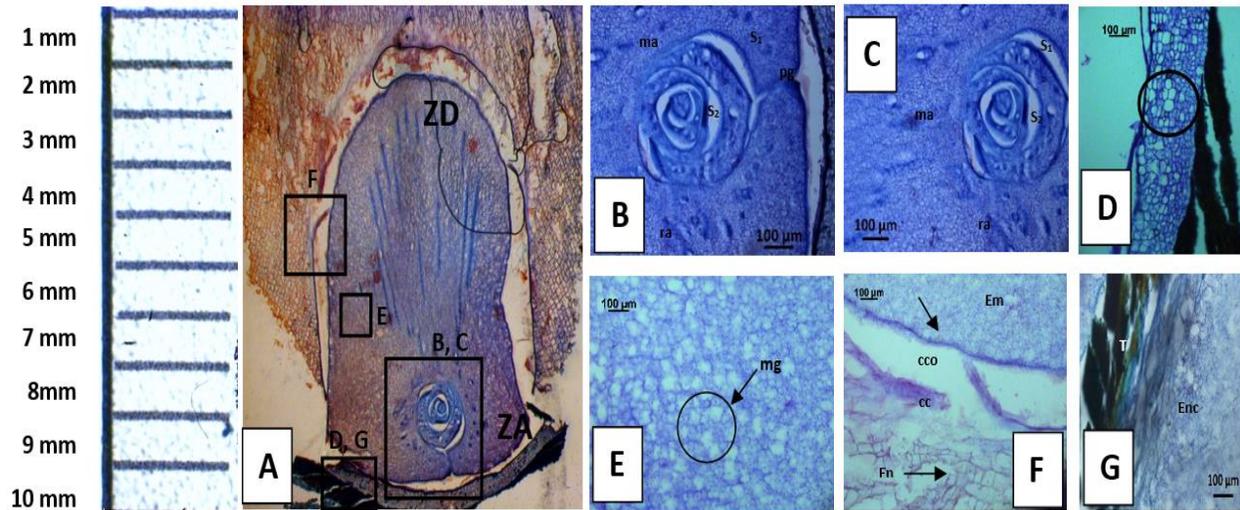


Figura 22. Morfología del embrión maduro de la variedad Alto del Pacífico mexicano y sus tejidos adyacentes. A) estructura general del embrión y la ubicación espacial de las células de interés (B-G). B, C) plúmula y su disposición con respecto a los meristemas apicales del tallo y de la radícula, la presencia de las hojas embrionarias, así como la ubicación de estos elementos en preparación para la germinación a través del poro germinativo. D) células del endospermo que se encuentran cerca de la testa con presencia de vacuolas. E) células del haustorio con presencia de material granular. F) interacción de las células del embrión con el endospermo, se observa la degradación de las células del endospermo y el mayor número de vacuolas en las células del haustorio. G) células del endocarpo y la testa. ZA, zona apical; ZD, zona distal; ma, meristemas apicales del brote; S₁, primera hoja embrionaria; S₂, segunda hoja embrionaria; hv, haces provasculares; mg; material granular; cc, células de colapso; cco, cavidad de corrosión; Em, embrión, En, endospermo; Enc, endocarpo; T, testa.

3.2. Histoquímica

3.2.1. Lípidos

Se observó la presencia de lípidos detectados con Sudán III identificados como pequeñas esferas de color rojizo-naranja en la epidermis, la zona apical y distal, donde se desarrollarán las células procambiales y las provasculares de los embriones inmaduros de ambas variedades (Figura 23A-D). En el estadio intermedio hay un incremento en la acumulación de lípidos en los embriones de ambas variedades con respecto a lo observado en el estadio inmaduro, las zonas de acumulación de los lípidos son las mismas que se observaron en los embriones inmaduros

(epidermis, la zona apical y distal) (Figura 23I-L). En los embriones de estadios maduros, los lípidos se ubican en la epidermis, la zona apical y distal al igual que en los estadios anteriores (Figura 23P-S), además, se observó la presencia de cuerpos lipídicos en la periferia del embrión, principalmente en la variedad alta (Figura 23R, S).

En el estadio inmaduro se observa una mayor acumulación en la variedad enana (Figura 23E, F), con respecto a lo observado en la variedad alta (Figura 23G, H). En los estadios intermedios hay un incremento en el tamaño de los cuerpos lipídicos de la variedad alta (Figura 23Ñ, O), asemejándose a lo observado en el embrión de la variedad Enano verde de Yucatán del mismo estadio de desarrollo (Figura 23M, N). En las células del endospermo del embrión maduro se observa el incremento en número y tamaño de los cuerpos lipídicos en ambas variedades (Figura 23T-W).

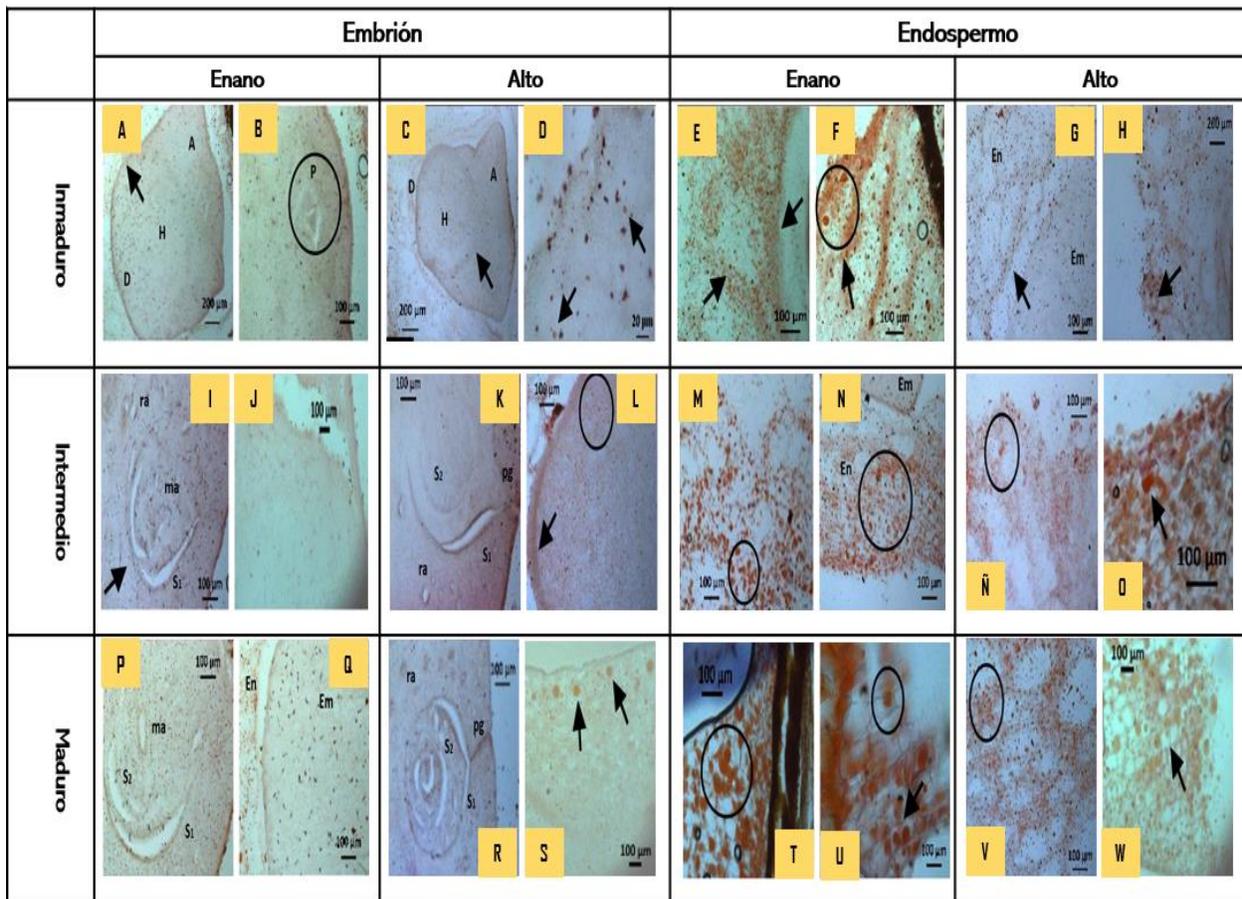


Figura 23. Presencia de lípidos en embriones y sus tejidos adyacentes de las variedades Enano verde de Yucatán y Alto del Pacífico mexicano en tres estadios de madurez detectados como pequeñas esferas de color rojizo-naranja. Embriones de los estadios inmaduro (A-D), intermedio (I-L), maduro (P-S), de las variedades Enano verde de Yucatán (A, B, I, J, P, Q), de la variedad Alto del Pacífico mexicano (C, D, K, L, R, S) y tejidos adyacentes al embrión inmaduro (E-H), intermedio (M-O) y maduro (T-W) de las variedades

Enano verde de Yucatán (E, F, M, N, T, U), y de la variedad Alto del Pacífico mexicano (G, H, Ñ, O, V, W). Las flechas y círculos señalan las zonas de interés. A, zona apical; D, zona distal; ma, meristemos apicales del brote; S₁, primera hoja embrionaria; S₂, segunda hoja embrionaria; Em, embrión, En, endospermo; H, haustorio; ra, radícula; pg, poro germinativo; P, plúmula.

3.2.2. Carbohidratos

En los embriones inmaduros de las dos variedades, se observa que abundan los carbohidratos (detectados con ácido periódico y reactivo de Schiff's que otorgan a los carbohidratos una coloración violeta), y que se acumulan principalmente en la zona de los meristemos apicales, radicales y cotiledonares, al igual que en las células procambiales, el protoderma y la epidermis del embrión; la disposición de estos carbohidratos es menor en las células que conformarán al haustorio (Figura 24A-D). En los embriones del estadio intermedio, se observa que la mayor cantidad y distribución de carbohidratos ocurre en la plúmula (Figura 24I-L). En los estadios maduros la acumulación de carbohidratos tiene un decremento, mismo que se observa en las células del haustorio, meristemáticas, de la epidermis, el protoderma, las células procambiales y en los nodos cotiledonares (Figura 24P-S).

El embrión posee carbohidratos no solo en su estructura, el endospermo de frutos inmaduros también contiene carbohidratos almacenados en sus células; se observan carbohidratos en las células secretoras o aleuronares que rodean al embrión y en las células empalizadas que se encuentran cerca de la testa (Figura 24E-H). En el estadio intermedio se observa mejor la distribución de los carbohidratos. Las células del endospermo alrededor del embrión se encuentran organizadas estructuralmente, mostrando la presencia de carbohidratos en las paredes de las células, y se detecta poca acumulación en su interior, solo en las células de colapso parece existir mayor acumulación de carbohidratos, esto puede deberse a que estas células se encuentran más cerca de la epidermis del embrión (Figura 24M-O). Las células del endospermo de frutos maduros poseen menor cantidad de carbohidratos en comparación con los frutos intermedios; la acumulación de los carbohidratos se encuentra principalmente en las células de colapso y las células cercanas al embrión (Figura 24T-W).

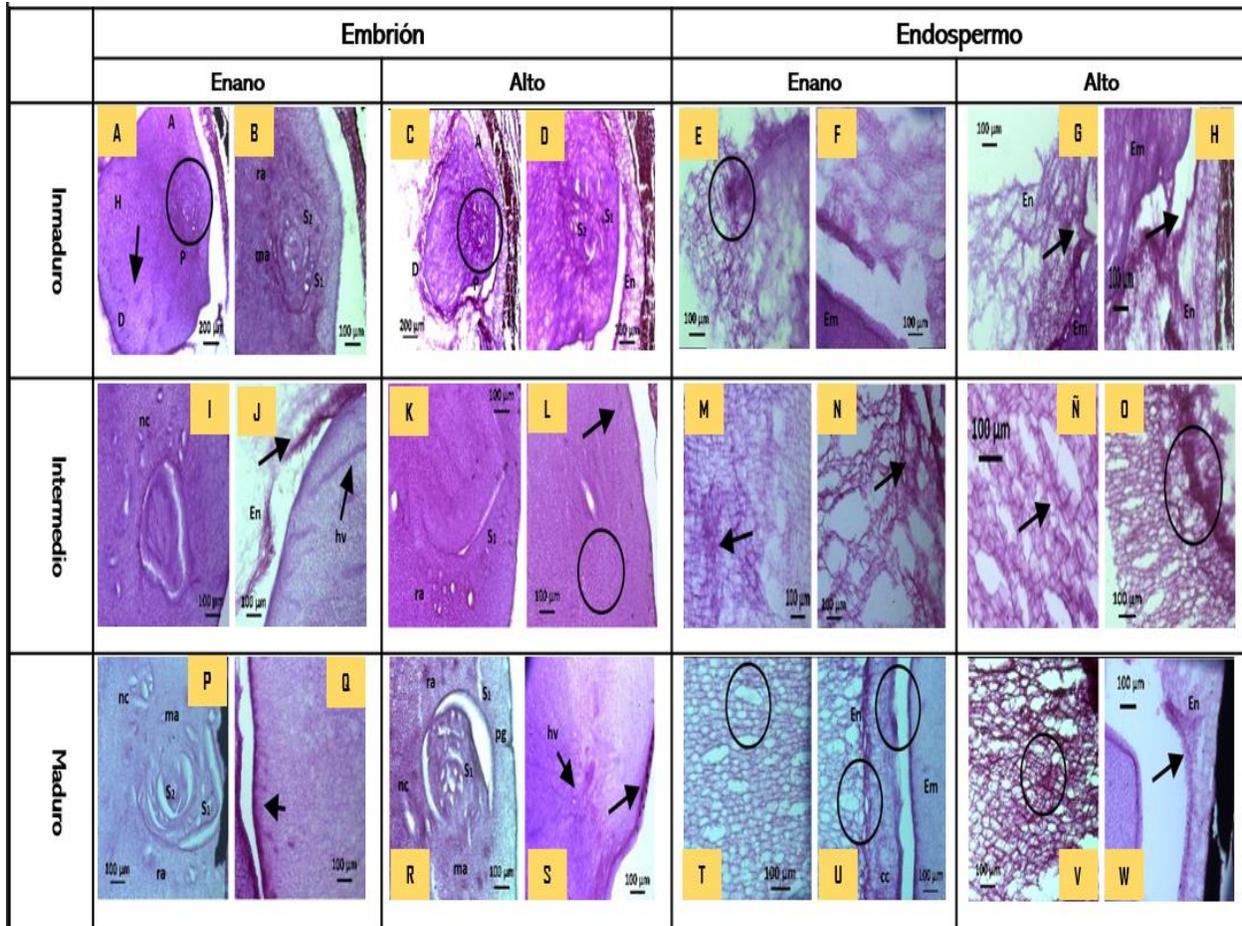


Figura 24. Presencia de carbohidratos detectados con ácido periódico y reactivo de Schiff´s que otorgan a los carbohidratos una coloración violeta en embriones y sus tejidos adyacentes de las variedades Enano verde de Yucatán y Alto del Pacífico mexicano en tres estadios de madurez. Embriones de los estadios inmaduro (A-D), intermedio (I-L), maduro (P-S), de las variedades Enano verde de Yucatán (A, B, I, J, P, Q), de la variedad Alto del Pacífico mexicano (C, D, K, L, R, S) y tejidos adyacentes al embrión inmaduro (E-H), intermedio (M-O) y maduro (T-W) de las variedades Enano verde de Yucatán (E, F, M, N, T, U), y de la variedad Alto del Pacífico mexicano (G, H, Ñ, O, V, W). Las flechas y círculos señalan las zonas de interés. A, zona apical; D, zona distal; ma, meristemos apicales del brote; S₁, primera hoja embrionaria; S₂, segunda hoja embrionaria; Em, embrión, En, endospermo; H, haustorio; ra, radícula; pg, poro germinativo; P, plúmula; nc, nodo cotiledonar; hv, haces provasculares; cc, células de colapso.

3.2.3. Almidón

A diferencia de los carbohidratos y lípidos, las reservas de almidón detectado con reactivo de Lugol son las que se encuentran en menor cantidad en las dos variedades. En el embrión inmaduro de la variedad alta, se observa muy poca presencia de almidón (Figura 25C, D). Similarmente en la variedad enana, se observa una escasa concentración de almidón, en los cotiledones y meristemos apicales (Figura 25A, B). En los estadios intermedios, se observa

mayor acumulación de almidón, en forma de gránulos en la zona apical del embrión en ambas variedades (Figura 25I-L). En el estadio maduro de ambas variedades la acumulación de almidón aumentó, dado que los gránulos son de mayor tamaño en comparación con los embriones inmaduros e intermedios. La zona apical del embrión es la de mayor acumulación en ambos estadios (Figura 25P-S). En la variedad enana se observan agrupaciones de almidón más dispersas (Figura 25P, Q), mientras que en la variedad alta, las agrupaciones de almidón están en una distribución más homogénea (Figura 25R, S).

En los tejidos adyacentes de frutos inmaduros, que se encuentran más lejanos al embrión de ambas variedades, se aglomeran pequeñas cantidades de almidón (Figura 25F, H); en contraste, en los tejidos que se encuentran cerca del embrión no se aprecian gránulos de almidón (Figura 25E, G). En el endospermo de los estadios intermedios, los aglomerados de almidón se observan en diferentes zonas, siendo más evidentes en la variedad enana (Figura 25M, N), que en la variedad alta (Figura 25Ñ, O). Las células del endospermo del estadio maduro contienen más almidón en las células de colapso y las que se encuentran cercanas al embrión, en ambas variedades (Figura 25T-W).

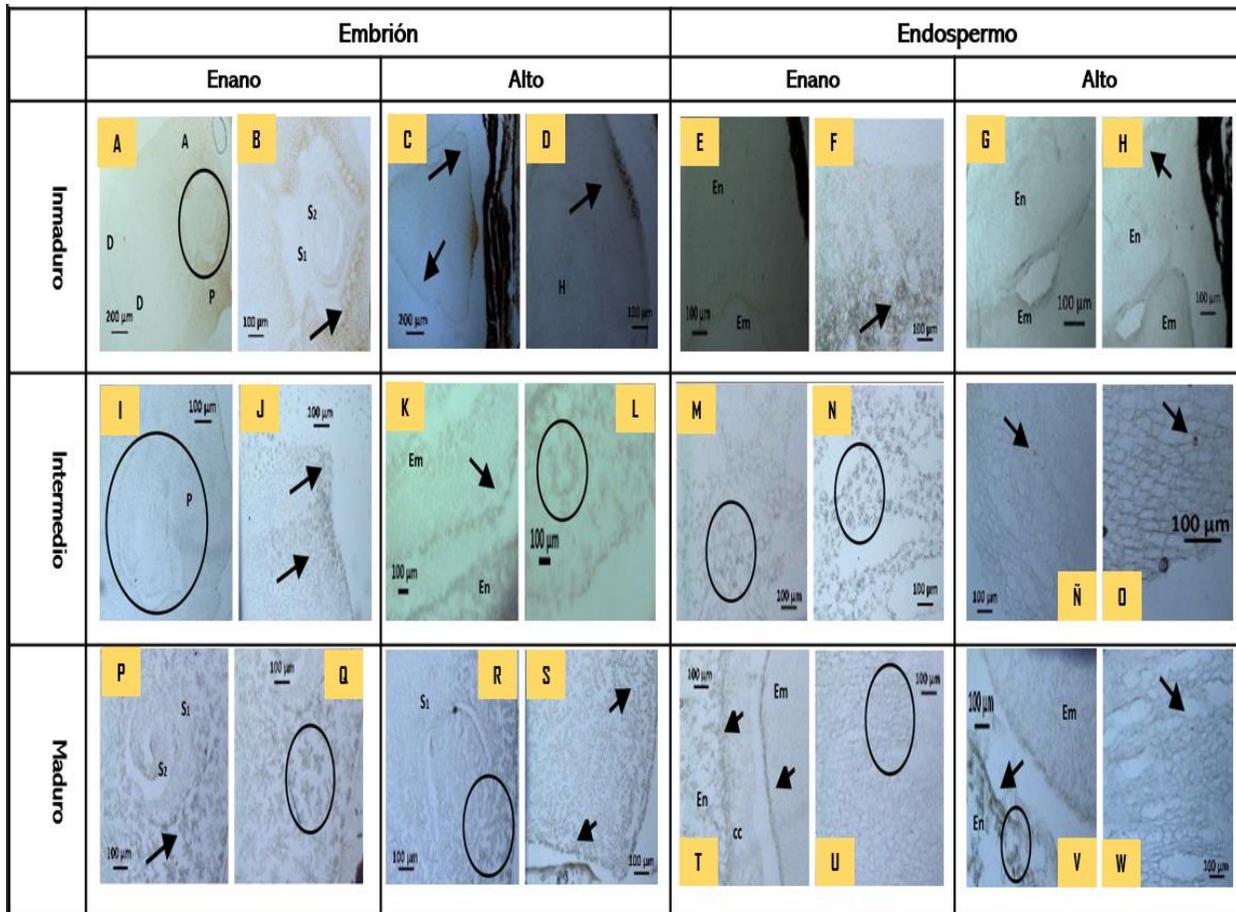


Figura 25. Presencia de almidón determinado con reactivo de Lugol en embriones y sus tejidos adyacentes de las variedades Enano verde de Yucatán y Alto del Pacífico mexicano en tres estadios de madurez. Embriones de los estadios inmaduro (A-D), intermedio (I-L), maduro (P-S), de las variedades Enano verde de Yucatán (A, B, I, J, P, Q), de la variedad Alto del Pacífico mexicano (C, D, K, L, R, S) y tejidos adyacentes al embrión inmaduro (E-H), intermedio (M-O) y maduro (T-W) de las variedades Enano verde de Yucatán (E, F, M, N, T, U), y de la variedad Alto del Pacífico mexicano (G, H, Ñ, O, V, W). Las flechas y círculos señalan las zonas de interés. A, zona apical; D, zona distal; S₁, primera hoja embrionaria; S₂, segunda hoja embrionaria; cc, células de colapso; Em, embrión, En, endospermo; H, haustorio; P, plúmula.

3.2.4. Proteínas

Desde las etapas tempranas del desarrollo del embrión se observa la presencia de proteínas teñidas con Xilidina-Ponceau (Figura 26). Dichas proteínas están en todas las células del embrión inmaduro de ambas variedades (Figura 26A-D). En el estadio intermedio de las dos variedades se observan proteínas, aunque muestran diferencias en su distribución dentro del mismo embrión. En la zona apical de los embriones se observan células más aglomeradas y pequeñas, mientras que las células del haustorio son más grandes y la cantidad de proteínas que éstas contienen también varía (Figura 26I-L). Las diferencias estructurales y de

acumulación de proteínas se observan mejor en la etapa madura, donde en la zona distal del embrión la presencia de las proteínas disminuye en ambas (Figura 26Q,S). A su vez, donde se encuentra la plúmula se puede apreciar una disminución en la cantidad de proteínas (Figura 26P, R). Este contraste entre la etapa madura y la etapa inmadura e intermedia es evidente principalmente en los embriones de la variedad enana (Figura 26A-B, I-J, P-Q), con respecto a la variedad alta (Figura 26C-D, K-L, R-S).

En los frutos inmaduros de ambas variedades, se observa a las células del endospermo en desarrollo y en donde estas poseen proteínas que se agrupan en pequeños cuerpos proteicos (Figura 26E-H). En las células del endospermo de las etapas intermedias (Figura 26M-O) y maduras (Figura 26T-W) de ambas variedades se observan células con mayor diferenciación celular, además de la presencia de cuerpos proteicos, que varían de acuerdo con el estadio y zona del tejido.

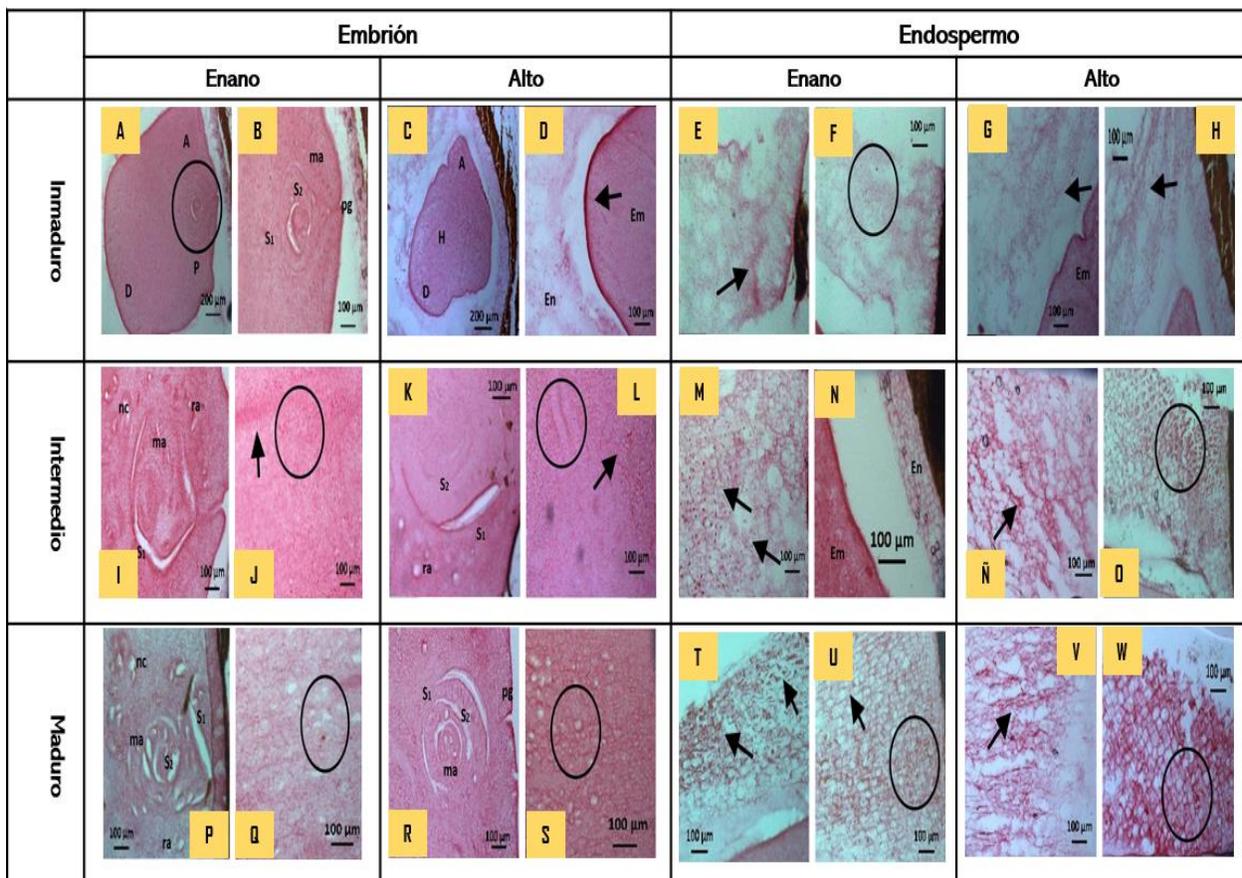


Figura 26. Presencia de proteínas en embriones y sus tejidos adyacentes de las variedades Enano verde de Yucatán y Alto del Pacífico mexicano en tres estadios de madurez detectado con Xilidina-Ponceau. Embriones de los estadios inmaduro (A-D), intermedio (I-L), maduro (P-S), de las variedades Enano verde de Yucatán (A, B, I, J, P, Q), de la variedad Alto del Pacífico mexicano (C, D, K, L, R,S) y tejidos adyacentes al embrión inmaduro (E-H),

intermedio (M-O) y maduro (T-W) de las variedades Enano verde de Yucatán (E, F, M, N, T, U), y de la variedad Alto del Pacífico mexicano (G, H, Ñ, O, V, W). Las flechas y círculos señalan las zonas de interés. A, zona apical; D, zona distal; ma, meristemos apicales del brote; S₁, primera hoja embrionaria; S₂, segunda hoja embrionaria; Em, embrión, En, endospermo; H, haustorio; ra, radícula; pg, poro germinativo; P, plúmula; nc, nodo cotiledonar.

3.3. Inmunodetección

3.3.1. Enano verde de Yucatán

Durante el desarrollo del fruto de cocotero, el embrión también se desarrolla y durante este proceso la pared celular de ambos sufre cambios, uno de ellos es la metil esterificación y desesterificación de la pectina. Como se muestra en la figura 27, en los embriones inmaduros de tipo globular (~6 meses) hay muy poca pectina metil esterificada y desesterificada, de acuerdo con la señal emitida por los anticuerpos JIM5 y JIM7, respectivamente, señaladas con flechas blancas (Figura 27A-D). Por otra parte, en embriones inmaduros cónicos (~7-8 meses), el embrión se muestra más desarrollado, observando que en la zona de la plúmula se encuentra pectina metil esterificada, de acuerdo a la señal emitida por el anticuerpo JIM7 y desesterificada, como mostró el anticuerpo JIM5; es de resaltar, que la señal de pectina metil esterificada es uniforme en todas las células (Figura 27G, H), en comparación con la señal de la pectina metil desesterificada, que muestra una señal más intensa en la zona de la plúmula (Figura 27E), y menor en el haustorio (Figura 27F).

En los estadios intermedios (Figura 27I-L) y maduros (Figura 27M-O), se observó que la pectina tanto en la plúmula como en el haustorio se encuentra mayoritariamente metil desesterificada (Figura 27I, J, M, N), siendo más abundante en la lámina media y en las zonas de unión de las células. En contraste, la pectina metil esterificada, se localizó principalmente en la pared celular primaria (Figura 27K, L, Ñ, O).

En todos los estadios de desarrollo del embrión se observa la presencia de núcleos de gran tamaño, por la señal azul emitida por DAPI (Figura 27), un colorante específico para DNA. Los núcleos se agruparon principalmente en la zona de la plúmula, en donde se encuentran las células procambiales y meristemáticas (Figura 27M, Ñ), mientras que, en la zona del haustorio los núcleos se encuentran menos agrupados (Figura 27F, O). La presencia de lípidos detectados con rojo Nilo se sobrelapa con los núcleos, dando un color magenta (Figura 27A, B, F, O), esto se debería a la presencia de lípidos en los núcleos (Figura 27G, K, L). La

localización del rojo Nilo se ubicó en las membranas celulares donde se sabe que hay gran cantidad de lípidos (Figura 27A, B, O).

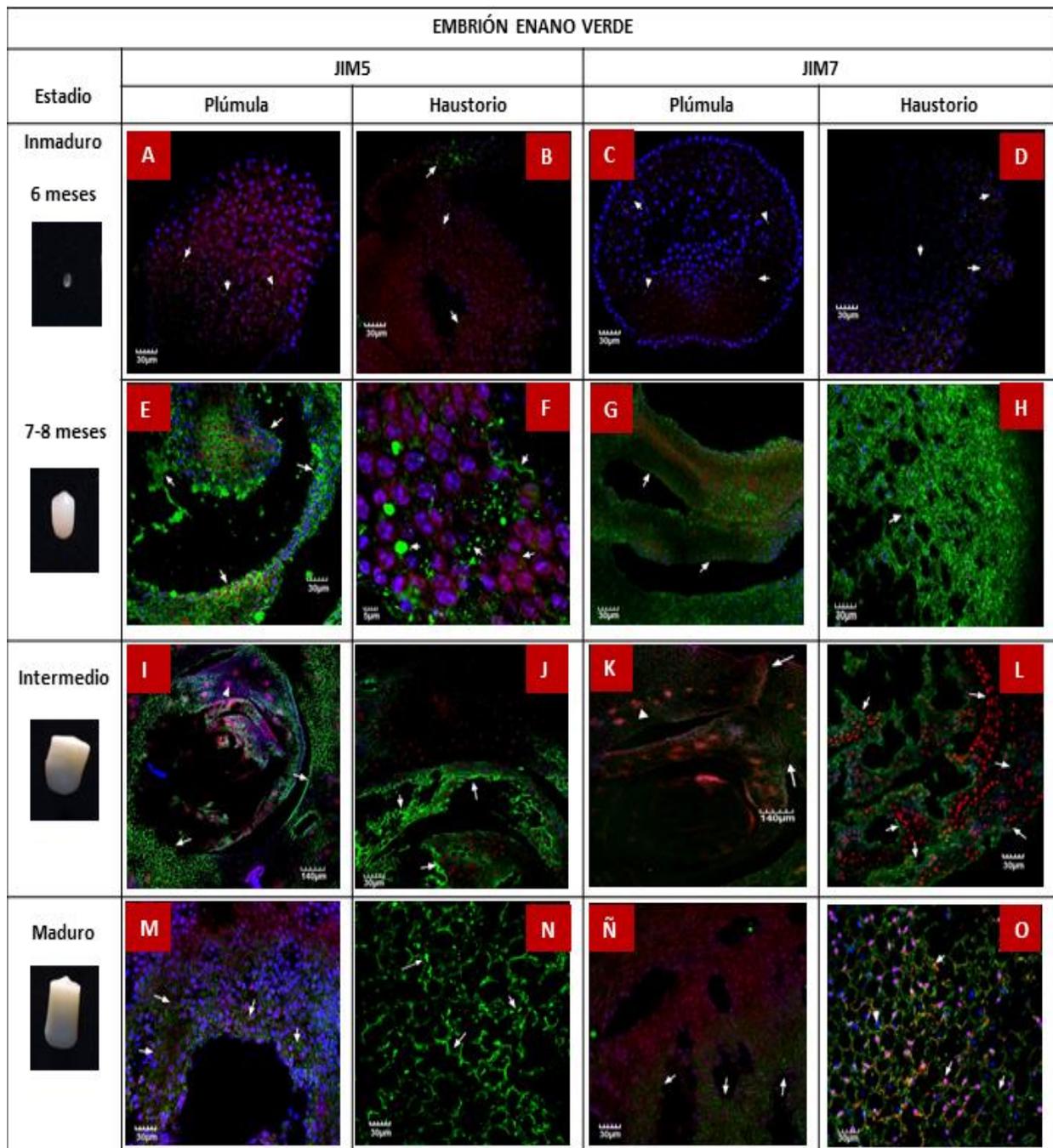


Figura 27. Inmunodetección con los anticuerpos JIM5 y JIM7 de la pectina metil desesterificada-esterificada en embriones de diferentes etapas de desarrollo de la variedad Enano verde de Yucatán. Inmunodetección de la pectina metil desesterificada (A, B, E, F, I, J, M, N), y de la pectina metil esterificada (C, D, G, H, K, L, Ñ, O), embriones inmaduros globulares (A-D), e inmaduros cónicos (E-H), embrión intermedio (I-L), embrión maduro (M-O), plúmula (A, E, I, M, C, G, K, Ñ), haustorio (B, D, F, H, J, L, N, O). Las flechas señalan las zonas de interés, la señal de color verde pertenece a la localización de los anticuerpos JIM5

y JIM7, la señal de color rojo señala a los lípidos teñidos con rojo Nilo, la señal azul indica a los núcleos teñidos con DAPI, la señal magenta es el resultado del solapamiento de las imágenes obtenidas con rojo Nilo y DAPI.

En los tejidos adyacentes cercanos a la testa del embrión cigótico globular de frutos inmaduros de alrededor de 6 meses se observó que las pectinas se encuentran, tanto metil desesterificadas, como metil esterificadas de acuerdo con las señales detectadas con los anticuerpos JIM5 (Figura 28C) y JIM7 (Figura 28A), respectivamente, señaladas con flechas blancas. En las zonas distales de los tejidos adyacentes al embrión la señal de JIM5 fue ligeramente mayor (Figura 28B), que la de JIM7 (Figura 28D), indicando que la pectina metil desesterificada es ligeramente más abundante. En los tejidos adyacentes al embrión de 7 u 8 meses; las señales emitidas por los anticuerpos JIM5 y JIM7 fueron uniformes (Figura 28E-H), sugiriendo que hay un equilibrio en el grado de metil esterificación-desesterificación en la pectina.

En los embriones intermedios (~9-10 meses), el endospermo cercano al embrión se encuentra mayormente metil esterificado (Figura 28K), y en menor medida metil desesterificado (Figura 28I), en las zonas distales hay más presencia de pectina metil desesterificada (Figura 28J), y la pectina metil esterificada se localiza agrupada en pequeñas vesículas (Figura 28L).

En el endospermo de frutos maduros la pectina se encuentra principalmente metil desesterificada (Figura 28M,N) y en menor medida metil esterificada (Figura 28Ñ, O). En conclusión, en los tejidos adyacentes al embrión, en ambas variedades, la pectina metil esterificada y desesterificada se localiza en las paredes celulares.

Por otra parte, se observaron numerosos núcleos en el endospermo de frutos inmaduros (Figura 28A-D), siendo menos evidentes conforme el fruto maduro (Figura 28I, L, M, O). La detección de lípidos es casi nula, siendo evidentes solo en frutos inmaduros (Figura 28A-C).

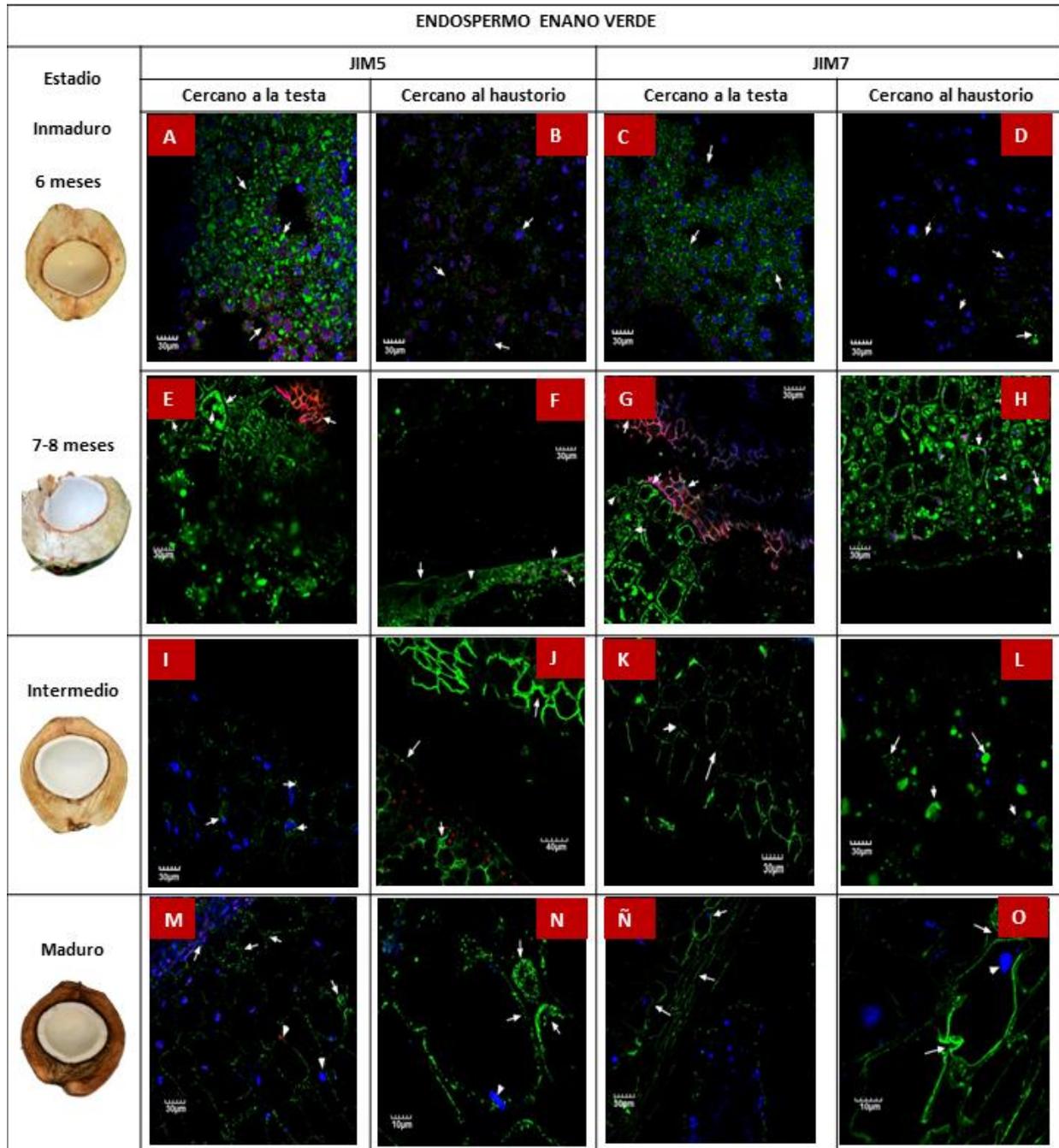


Figura 28. Inmunodetección con los anticuerpos JIM5 y JIM7 de la pectina metil desesterificada-esterificada en el tejido adyacente de la variedad Enano verde de Yucatán. Detección de la pectina metil desesterificada (A, B, E, F, I, J, M, N), y de la pectina metil esterificada (C, D, G, H, K, L, Ñ, O), endospermo de frutos inmaduros de ~6 meses (A-D) y de ~7-8 meses (E-H), endospermo de frutos intermedios (I-L), endospermo de frutos maduros (M-O), zonas adyacentes al embrión (A, E, I, M, C, G, K, Ñ), zonas distales al embrión (B, D, F, H, J, L, N, O). Las flechas señalan las zonas de interés, la señal de color verde pertenece a la localización de los anticuerpos JIM5 y JIM7, la señal de color rojo señala a los lípidos teñidos con rojo Nilo, la señal azul indica la posición de núcleos teñidos con DAPI, la señal magenta es el resultado del sobrelapamiento de las imágenes del rojo Nilo y DAPI.

3.3.2. Alto del Pacífico mexicano

Los embriones globulares (estadio inmaduro) de la variedad Alto del Pacífico mexicano poseen muy poca pectina metil esterificada y desesterificada señaladas con flechas blancas (Figura 29A-D). Un comportamiento similar se observó en los embriones inmaduros cónicos; en específico, en la zona de la plúmula, donde hay poca pectina metil esterificada y desesterificada (Figura 29E,G). Sin embargo, en la zona del haustorio se observó que la pectina se encuentra más metil desesterificada (Figura 29F), que metil esterificada (Figura 29H), de acuerdo con la señal emitida por los anticuerpos JIM5 y JIM7, respectivamente.

En los embriones de estadios intermedios, la cantidad de pectina metil esterificada y desesterificada en la zona de la plúmula aumentó, siendo más abundante la pectina metil desesterificada (Figura 29I). Por otra parte, la pectina metil esterificada se ubica principalmente en algunas zonas que abarca la plúmula (Figura 29K), y el haustorio. En este último, se presenta un comportamiento similar al que sucede en la plúmula; sin embargo, se observa la presencia de pequeñas vesículas, con una señal intensa de pectina metil desesterificada, ubicada también en las paredes celulares (Figura 29J). La presencia de vesículas es mayor en las células metil desesterificadas que en las células metil esterificadas (Figura 29L).

En los embriones maduros, se observa que en las zonas de la plúmula existe muy poca pectina metil desesterificada (Figura 29M) y esterificada (Figura 29Ñ); sin embargo, en la zona del haustorio se observa un aumento de la pectina metil esterificada (Figura 29O), y la pectina metil desesterificada se concentra principalmente en las paredes celulares delimitando a las células (Figura 29N).

En la zona de la plúmula se observan abundantes núcleos (Figura 29E, G, M, Ñ); también hay abundantes lípidos tanto en los núcleos de la célula como en las membranas celulares, desde los embriones inmaduros hasta los maduros (Figura 29A, C, E, Ñ). En contraste, en el haustorio estos se detectaron en menor cantidad (Figura 29F, J, L, N, O).

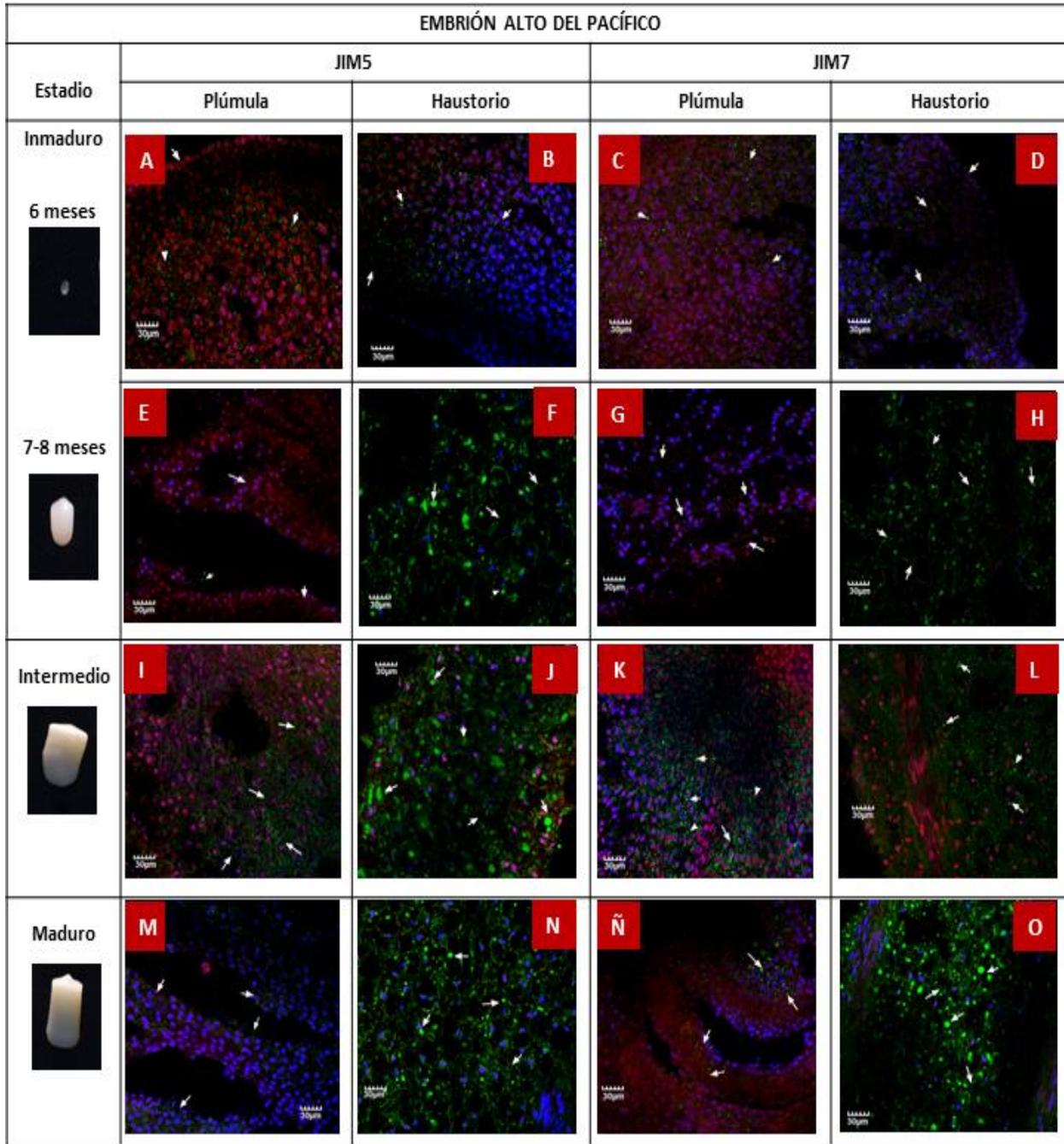


Figura 29. Inmunodetección con los anticuerpos JIM5 y JIM7 de la pectina metil desesterificada-esterificada en embriones de la variedad Alto del Pacífico mexicano. Detección de la pectina metil desesterificada (A, B, E, F, I, J, M, N), y de la pectina metil esterificada (C, D, G, H, K, L, Ñ, O), embrión globular inmaduros (A-D), y embrión cónico inmaduro (E-H), embrión intermedio (I-L), embrión maduro (M-O), plúmula (A, E, I, M, C, G, K, Ñ), haustorio (B, D, F, H, J, L, N, O). Las flechas señalan las zonas de interés, la señal de color verde pertenece a la localización de los anticuerpos JIM5 y JIM7, la señal de color rojo señala a los lípidos teñidos con rojo Nilo, la señal azul indica la posición de núcleos teñidos con DAPI, la señal magenta es el resultado del solapamiento de las imágenes del rojo Nilo y DAPI.

En los tejidos adyacentes a los embriones globulares se observó que el endospermo posee abundante pectina metil esterificada (Figura 30C) y desesterificada (Figura 30A), señaladas con flechas blancas; particularmente en las zonas que se encuentran en contacto con el embrión, mientras que, en las zonas donde los tejidos están más distanciados al embrión la cantidad de pectina metil esterificada/desesterificada disminuye (Figura 30B, D). Durante el desarrollo la cantidad de pectina metil desesterificada/esterificada decrece en las zonas cercanas al embrión (Figura 30E, G); por el contrario, en las zonas distales donde las células tienen un mayor tamaño, se observa que hay grandes vacuolas conteniendo pectina metil desesterificada (Figura 30F) y pequeñas vacuolas conteniendo pectina metil esterificada (Figura 30H).

En las células del endospermo de embriones del estadio intermedio se observa que hay más pectina metil desesterificada en las zonas cercanas y lejanas del embrión (Figura 30I, J), y menor señal de pectina metil esterificada en las zonas cercanas al embrión (Figura 30K), mientras que en las zonas distales hay presencia de grandes vacuolas dentro de las células conteniendo pectina metil esterificada (Figura 30L).

En las células del endospermo maduro se observa la presencia de pectina metil desesterificada en las paredes celulares primarias que delimitan a las células (Figura 30M), y muy poca pectina metil esterificada en esa misma zona (Figura 30Ñ); en las zonas lejanas se encuentra la señal más intensa de pectina metil esterificada ubicada en vesículas (Figura 30O), aunque también hay vacuolas más grandes con señal de pectina metil desesterificada (Figura 30N).

Los núcleos son más grandes y dispersos en los endospermos de frutos intermedios y maduros (Figura 30I, K, M, Ñ), en los frutos inmaduros los núcleos son más evidentes en las células, porque se encuentran en división, la presencia de lípidos es casi nula, y solo se observan en los tejidos más inmaduros adyacentes al embrión (Figura 30A-D).

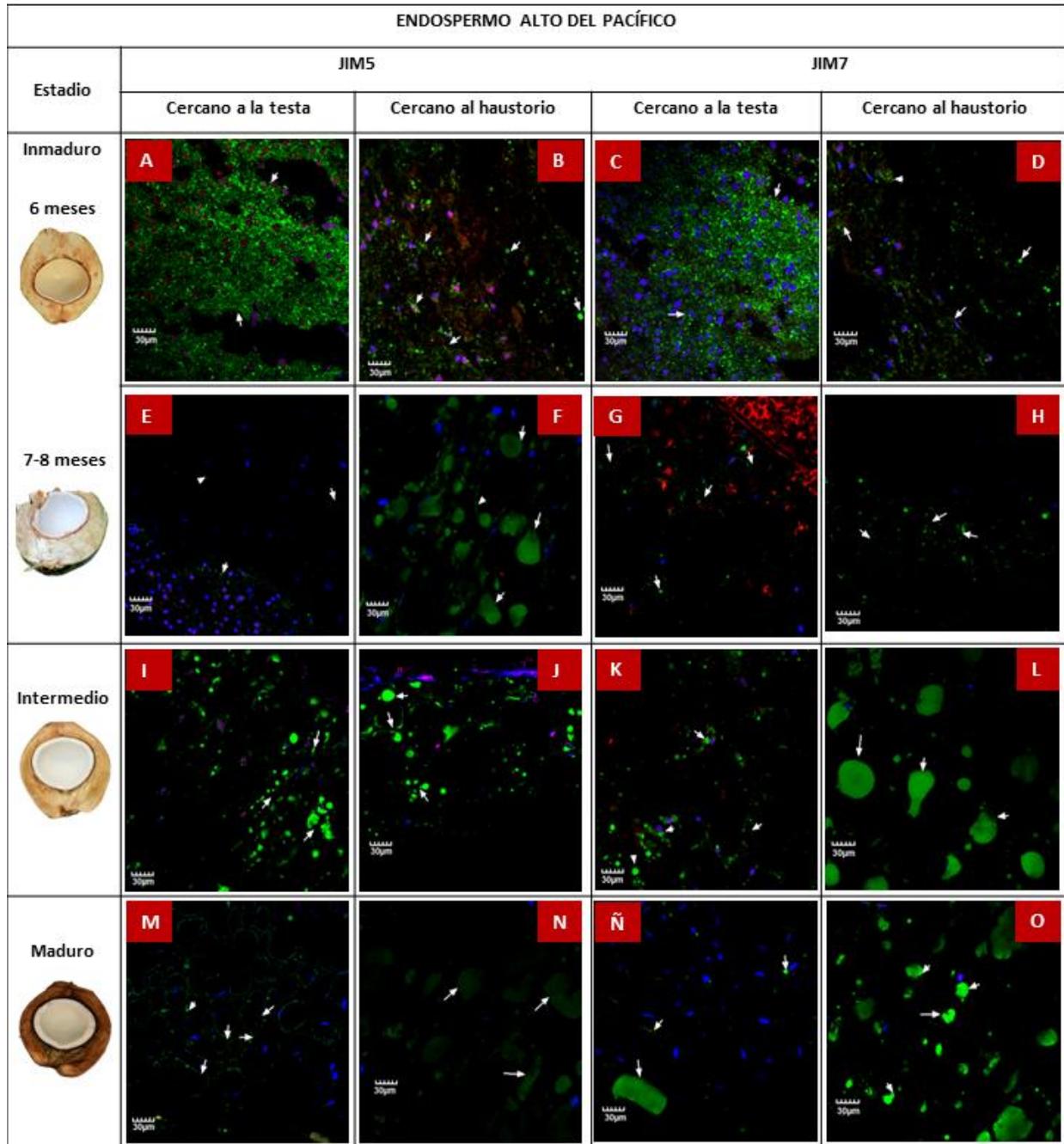


Figura 30. Inmunodetección con los anticuerpos JIM5 y JIM7 de la pectina metil desesterificada-esterificada en el tejido adyacente de la variedad Alto del Pacífico mexicano. Detección de la pectina metil desesterificada (A, B, E, F, I, J, M, N), detección de la pectina metil esterificada (C, D, G, H, K, L, Ñ, O), endospermo de frutos inmaduros de ~6 meses (A-D) y de ~7-8 meses (E-H), endospermo de frutos intermedios (I-L), endospermo de frutos maduros (M-O), zonas adyacentes al embrión (A,E,I,M,C,G,K,Ñ), zonas distales al embrión (B, E, I, M, C, G, K, Ñ). Las flechas señalan las zonas de interés, la señal de color verde pertenece a la localización de los anticuerpos JIM5 y JIM7, la señal de color rojo señala a los lípidos teñidos con rojo Nilo, la señal azul indica la posición de núcleos teñidos con DAPI, la señal magenta es el resultado del sobrelapamiento de las imágenes del rojo Nilo y DAPI.

CAPÍTULO IV

DISCUSIÓN

4.1. Morfología del embrión

La determinación de los criterios para la clasificación de los estadios de madurez del coco está establecida pero no es del todo precisa y, por lo tanto, está sujeta a criterios que son subjetivos, dependiendo de quien realiza el estudio o a las condiciones en que se encuentran las palmas de cocotero. Por ejemplo, en campo se han observado hasta dos inflorescencias con espatas cerradas en la misma palmera de coco, dificultando así la asignación de la inflorescencia cero.

En este trabajo, la anterior fue la primera dificultad a la que nos enfrentamos al querer clasificar los frutos por grado de madurez y utilizar a la inflorescencia como el indicativo de la edad de los frutos, siguiendo el protocolo descrito por Perera et al., (2010).

En la familia de las Arecaceae se incluyen más de 2600 especies (Baker & Dransfield, 2016), la mayoría son monocotiledóneas y entre ellas se encuentra el cocotero, único en su especie. Sus cotiledones tienen un tamaño mayor al de otras monocotiledóneas y dicotiledóneas y cuentan con una diversa estructura celular (Moura et al., 2019).

En este estudio se utilizaron las variedades Alto del Pacífico mexicano y Enano verde de Yucatán. Los embriones cigóticos de ambas variedades poseen las mismas estructuras celulares y forma, se observó que a diferencia de otros embriones que pasan por diferentes etapas de desarrollo embrionario, el cocotero solo posee dos formas; una forma globular en frutos inmaduros y una forma cilíndrica en frutos maduros. Esta característica ya había sido descrita por Haccius y Philip en 1979. No obstante, durante el desarrollo embrionario el crecimiento y aumento de volumen se da en dos direcciones, lo que otorga al embrión una forma cónica o de nave y que cambia a cilíndrica o torpedo conforme el embrión madura.

Debido a que el desarrollo del embrión no es uniforme, este se divide en dos zonas, la zona apical donde se desarrollará la plúmula y la zona distal que corresponde al haustorio, la división de ambas zonas se puede observar principalmete en embriones maduros, donde se encuentran grupos de células que delimitan al cotiledón del haustorio (Selvaratnam, 1952). En nuestro trabajo se observó que el haustorio se sigue desarrollando una vez que la plúmula está

formada, esto hasta que el embrión esté listo para germinar. Una vez que esto ocurre, los primordios foliares y radicales emergerán y el haustorio crecerá dentro de la semilla y le servirá a la plántula como fuente de alimento (Haccius & Philip, 1979; Demason & Thomson, 1981), este tipo de tejido es característico en las semillas pertenecientes a la familia Arecaceae (*M. flexuosa*, *B. capitata*, *A. aculeata*, *P. dactylifera* L., *W. filifera*, *E. guineensis* Jacq., entre otras).

El embrión cigótico de cocotero posee un solo cotiledón como se ha reportado en otros embriones de palmas. En el centro de la zona que abarca la plúmula se encuentran un grupo de células meristemáticas rodeado por dos hojas embrionarias, y que a su vez están rodeadas por coleoptilos, y cada una de ellas tienen un protoderma definido, separadas por espacios intercelulares. Estas hojas se encuentran en pares, las cuales son hojas rudimentarias, que poseen pequeñas escamas o vellosidades y se encuentran de manera transversal al eje axilar, el cual se ubica en la zona apical del embrión (Selvaratnam, 1952; DeMason, 1988a; Sugimura & Murakami, 1990; Panza et al., 2004; Ribeiro et al., 2012; Moura et al., 2019; de Araújo Silva-Cardoso et al., 2020; Ferreira et al., 2020).

Del lado opuesto a las hojas embrionarias con una inclinación de alrededor de 45° se ubica el eje radicular (Selvaratnam, 1952), las células que lo conforman no están del todo diferenciadas como se observa en *E. precatória* (Ferreira et al., 2020). También, posee meristemas radicales que se conectan con el poro germinativo o canal micropilar y con células procambiales tal como se ha observado que ocurre en *Washingtonia filifera*, *A. aculeata*, *Mauritia flexuosa* L., entre otras (Panza et al., 2004; Ribeiro et al., 2012; Moura et al., 2019; de Araújo Silva-Cardoso et al., 2020).

Durante el desarrollo del embrión cigótico de cocotero, el eje embrionario de la plúmula y radícula rotan hacia la abertura del poro de germinación conforme el embrión madura, esto para facilitar el proceso de germinación. Esta rotación y la abertura también se observa en embriones de *Euterpe edulis* durante la germinación (Panza et al., 2004),

En el embrión cigótico hay células del protoderma, del meristemo, del procambio y del parénquima, que se distinguen por la forma y en las zonas donde se encuentran (Demason & Thomson, 1981; DeMason, 1988a; Panza et al., 2004; de Araújo Silva-Cardoso et al., 2020).

En la zona distal del embrión se encuentra el haustorio que se expande para absorber los nutrientes primeramente del endospermo líquido y posteriormente del endospermo sólido, siendo el coco el único que pertenece a la familia de las Arecaceae que posee un

endospermo líquido; sin embargo, las características del haustorio de cocotero coincide con el de *Phoenix dactylifera* (DeMason, 1985).

El haustorio posee abundante material granular, que está más disperso en embriones intermedios y maduros, en dichos embriones es perceptible la presencia de células de mayor tamaño y con vacuolas como ocurre en *Butia capitata* (Souza Dias et al., 2018) y *Acrocomia aculeata* (Ribeiro et al., 2012), estos cambios celulares pueden asociarse al proceso de almacenamiento de reservas, intercambio de elementos, enzimas y demás, por la presencia de células del parénquima y haces provasculares.

En el embrión de cocotero, los haces provasculares podrían ayudar al transporte de sustancias de almacenamiento, durante la germinación y, al igual que en la palma dactilera podrían usarse para la traslocación de componentes de carbono y enzimas como las hidrolasas (DeMason, 1985; Sugimura & Murakami, 1990).

En este estudio se observaron haces provasculares en la zona de separación entre las células del haustorio y las de la plúmula, en embriones inmaduros y maduros. Además, se visualizaron vascularidades más pequeñas y con arreglos celulares más unidos, estas vascularidades podrían ser traqueidas que se encuentran cerca del parénquima, resultados parecidos a lo observado en embriones de *Washingtonia filifera* (DeMason, 1988b).

Las células del endospermo cerca de la testa son más pequeñas y posiblemente con paredes celulares más delgadas para permitir el paso de la plúmula durante la germinación como ocurre en las semillas de *Butia capitata* (Oliveira et al., 2013).

Las células del endospermo que están en contacto con el haustorio tienen una reducción en la densidad celular y forman las células de colapso, las cuales son las primeras en degradarse durante el proceso de germinación, y a su vez, facilitan el transporte de sustancias de reservas de las células más lejanas hacia el embrión. El área de colapso, también se denomina como zona de digestión, presente en otras Arecaceas (Oliveira et al., 2013; Mazzottini-dos-Santos et al., 2017; Souza Dias et al., 2018).

Las células del endospermo que se encuentran lejanas al embrión son grandes, isodiamétricas y poligonales, con densidad celular evidente, debido a la acumulación de polisacáridos y demás sustancias de reservas como ocurre en otras semillas (DeMason et al., 1983; 1986; Buckeridge et al., 2000; Moura et al., 2010). Tienen presencia de vacuolas, principalmente en los embriones provenientes de frutos maduros, esto podría deberse a la formación del arénquima

para facilitar el transporte de sustancias como ocurre en las células del haustorio en otras palmas (Ribeiro et al., 2012; Neves et al., 2013).

4.2. Histoquímica

Durante la tinción de los cortes histológicos de cocotero, la coloración del azul de toluidina en el tejido está dada por la alta afinidad con ácidos nucleicos y proteínas, el color verde-azul está asociado con polifenoles y el color violeta-rosa a sustancias pécticas (Feder & O'Brien, 1968). Las zonas con mayor presencia de compuestos fenólicos fueron la testa y el endocarpio. Estos son tejidos ricos en polifenoles que se endurecen, además que tienden a obstaculizar la difusión del oxígeno y con ello, se mantiene estéril el interior de la semilla (Debeaujon et al., 2000; Benech-Arnold et al., 2006; Carvalho et al., 2015).

También se pueden encontrar otros compuestos fenólicos, como los taninos, que se han observado en otros embriones de palmas y se han asociado como un mecanismo de defensa contra patógenos o como respuesta al estrés abiótico (Panza et al., 2004; Ferreira et al., 2020), relacionándolos, a su vez, con la abundancia de metabolitos secundarios. Estos se encuentran también en coco, situados cerca de la plúmula (Haccius & Philip, 1979).

En las semillas de angiospermas, en las que se encuentra el coco, las sustancias de reserva se acumulan en forma de cuerpos proteicos, principalmente en vacuolas o vesículas. Los cuerpos proteicos se han clasificado en tres grupos, las enzimas, encargadas de la movilización de las reservas, proteínas que son de reserva y las proteínas estructurales, clasificadas en globulinas, prolaminas, gluteninas, albúminas y vicilinas. Estos cuerpos proteicos, se forman en los tejidos vegetales durante la embriogénesis cigótica e intervienen en las interacciones embrión-endospermo y cuerpos lipídicos; por ejemplo, oleosomas y amiloplastos. También hay hemicelulosa en las paredes celulares del endospermo que sirve como reserva (Matilla, 2008; Laibach et al., 2015).

La cantidad de lípidos presente en los tejidos del endospermo y del embrión, nos dan a entender que la acumulación de cuerpos lipídicos en el embrión no afecta la presencia de lípidos en el endospermo, además de que tienden a aumentar. Esto podría deberse a que la movilización y acumulación de los lípidos ocurre después de la movilización de las proteínas, y dicha transposición es observada en el inicio de la germinación (Oliveira et al., 2013; Zienkiewicz et al., 2014; Huang, 2018; Souza Dias et al., 2018). Por lo tanto, en nuestro trabajo

no fue posible observar dicha movilización en los embriones de cocotero de ambas variedades porque el estudio no llegó hasta el proceso de germinación.

El aumento de lípidos en la zona del haustorio podría deberse al tipo de células especializadas que facilitan la acumulación de lípidos como lo describió DeMason en 1984 y 1985, además, se sabe que el coco acumula grandes cantidades de lípidos (Kumar, 2011; Reynolds et al., 2019).

Por otra parte, la movilización de reservas está relacionada a la secreción de enzimas y hormonas que activan determinadas rutas metabólicas en las células; por ejemplo, las citocininas, que incrementan la movilización de los lípidos y carbohidratos (Bewley et al., 2013).

Se sabe que en semillas ortodoxas los cuerpos lipídicos están rodeados por oleosinas, que les dan soporte y conformación (Matilla, 2008; Huang & Huang, 2015; Huang, 2018). El coco es una semilla no ortodoxa o recalcitrante con presencia de oleosinas de acuerdo a lo reportado en el trabajo de Reynolds y colaboradores en 2019, y datos obtenidos en nuestro grupo de trabajo (datos no publicados). Quizás, esa sea una de las razones por las cuales la cantidad de cuerpos lipídicos aumentan conforme el embrión se desarrolla.

En este trabajo se determinó que en los embriones maduros hay menor cantidad de carbohidratos, tal como se observa en la figura 24. Estos carbohidratos se concentran en las células de colapso del endospermo y en la epidermis del embrión de ambas variedades. La movilización de los carbohidratos de la pared celular y de los encontrados en el interior de las células, es facilitada por enzimas, como, las endo- β -mananasas, que movilizan el manano de las paredes celulares del endospermo, tal como ocurre en las semillas de *B. capitata* (Souza Dias et al., 2018), *P. dactylifera* (DeMason, 1985), *E. guineensis* (Alang et al., 1988), *A. aculeata* (Mazzottini-dos-Santos et al., 2017), entre otras.

La presencia de almidón en algunas especies tiende a incrementar conforme las semillas maduran, se sabe que el almidón es la principal fuente de reserva en los cereales (Bewley, 2001), encontrándose durante la formación del embrión cigótico y del endospermo, como reserva (Otegui et al., 1998).

Aunque no es muy común, en algunas especies de palmas hay presencia de almidón (Demason & Thomson, 1981; Ribeiro et al., 2012; Oliveira et al., 2013; de Araújo Silva-Cardoso et al., 2020).

En *B. capitata* (Oliveira et al., 2013), *Syagrus oleraceae* (de Araújo Silva-Cardoso et al., 2020), *Elaeis guineensis* (Alang, 1981), *Mauritia flexuosa* (Moura et al., 2019) y *Euterpe edulis* (Panza

et al., 2004), se observan gránulos de almidón en la plúmula que se distribuyen de manera irregular por las células del meristemo. El mismo comportamiento se observó en los embriones de cocotero, en la zona de la plúmula hay pequeños y abundantes gránulos de almidón, y dependiendo de la zona la presencia de estos gránulos incrementan o disminuyen (Figura 25).

Es posible que la principal función que cumple el almidón en el embrión de cocotero sea igual al observado en otras especies, donde actúa como una fuente de energía; sin embargo, la presencia del almidón en ciertas especies de palmas se asocia con la recalcitrancia de las semillas y se vincula al proceso de germinación, aunque no se ha determinado cual es la asociación directa (Oliveira et al., 2013).

En semillas dicotiledóneas el almidón inicia su acumulación en las etapas tempranas del desarrollo embrionario (15 días después de la fertilización); posteriormente, los gránulos de almidón crecen y se acumulan por toda la semilla (Matilla, 2008). El coco es una semilla monocotiledónea, aunque acumula almidón, en las semillas con edades de 6 y 7 meses no es tan evidente la presencia de esta macromolécula; por ende, se sugiere que la acumulación del almidón es más tardía que en las semillas dicotiledóneas, mostrando así, una diferencia entre mono y dicotiledóneas; sin embargo, se necesitaría observar a semillas más jóvenes para corroborar lo antes mencionado.

En el caso de las proteínas, en este estudio se observó que en las semillas de la variedad Alto del Pacífico había más proteínas que en la variedad Enano verde; esto ocurrió principalmente en el estadio maduro. Hasta la fecha hay muy poca comparación de las proteínas de semilla entre las variedades; no obstante, mediante la histoquímica realizada en este trabajo se observó esta diferencia.

En el endospermo podemos observar cuerpos proteicos alargados, un tanto esféricos y se distribuyen por todo el tejido, mientras que, los cuerpos proteicos que se encuentran en el embrión son más pequeños y globulares, siendo similares a los cuerpos proteicos de *A. aculeata* (Moura et al., 2010), *P. dactylifera* L. (Demason & Thomson, 1981; DeMason et al., 1983) y *W. filifera* (DeMason, 1986, 1988a).

En algunas especies de palmas no se pueden observar proteínas en el embrión, solo en el endospermo, como sucede en *Euterpe edulis* (Panza et al., 2004). Sin embargo, en el coco se encontraron proteínas en los dos tejidos, aunque tenían una agrupación diferente. Una explicación es que el endospermo secreta enzimas que intervienen en la presencia de

proteínas específicas en ambos tejidos, tal como ocurre en *Phoenix dactylifera* (Sekhar & DeMason, 1988).

En nuestro trabajo se observó que hay más proteínas en la plúmula del embrión que en el haustorio, principalmente en los embriones maduros de ambas variedades, en comparación a los otros estadios. Esto podría deberse a que, durante la germinación, las proteínas de reserva son degradadas y sus aminoácidos utilizados para la emergencia del epicótilo e hipocótilo. Es posible que, por esta razón, que en las últimas etapas del desarrollo del embrión hay mayor concentración de las proteínas en la zona de la plúmula, mientras que en las células del haustorio hay presencia de vacuolas con residuos de cuerpos proteicos (Figura 26). Dichas proteínas también se movilizan hacia la zona apical del embrión como ocurre en *Butia capitata* (Oliveira et al., 2013).

La presencia de cuerpos proteicos que se distribuyen por todo el endospermo y el embrión, y que se encuentran en su mayoría contenidos en vacuolas se ha asociado a la recalcitrancia en las semillas de acuerdo con Veloso y colaboradores (2016) y Ferreira y colaboradores (2020).

La movilización de las reservas del endospermo hacia el embrión, así como del haustorio hacia la plúmula, tiene que ver con las señales que el embrión envía a sus propios tejidos y al endospermo (Bewley, 2001; Sudha et al., 2021). Esto provoca cambios que derivan en el incremento de las hormonas giberelinas (GA), ácido indol acético (IAA), zeatina (Z) en el endospermo y de ácido abscísico (ABA), ácido indol acético (IAA), citocininas (CKs) y castasteronas (CS) en el haustorio, y la presencia de especies reactivas de oxígeno (ROS). Este incremento hormonal inicia la movilización de los cuerpos proteicos, la degradación de lípidos y carbohidratos y la acumulación del almidón (Bewley et al., 2013; Silva et al., 2014; Verma et al., 2015; Gómez-Maqueo & Gamboa-deBuen, 2016).

Aunque, la mayor movilización de las reservas ocurre durante el proceso de germinación y emergencia de la nueva plántula, la movilización también puede ocurrir durante el desarrollo de la plúmula y radícula (Bewley, 2001); es decir, durante el desarrollo del embrión. La movilización de reservas ayuda al crecimiento de este, tal como se pudo observar en este trabajo, ya que el transporte y acumulación fue visible desde las etapas tempranas de la embriogénesis.

4.3. Inmunodetección

Si bien las implicaciones que tiene el grado de metil esterificación de la pectina en el desarrollo embriogénico y germinación, han sido estudiadas en varias especies, en el caso de coco, los reportes son escasos (Verdeil et al., 2001). En este estudio el comportamiento de la metil esterificación y desesterificación de la pectina detectada en los embriones cigóticos de cocotero mediante los anticuerpos monoclonales JIM5 que detecta a la pectina metil desesterificada y JIM7 que detecta a la metil esterificada (Knox et al., 1990; Verherbruggen et al., 2009), mostraron que el grado de metil esterificación y desesterificación dependen del tejido y del estadio de madurez, como se ha observado en *Arabidopsis* (Dolan et al., 1997).

Verdeil y colaboradores (2001) utilizando los anticuerpos JIM5 y JIM7 reportaron que en las etapas tempranas de la formación de embriones somáticos hay más pectina metil desesterificada que esterificada.

Este hallazgo es limitado debido a que el estudio no se realizó durante todo el desarrollo del embrión somático. No obstante, al estudiar a los embriones cigóticos de la variedad Alto del Pacífico mexicano y Enano Verde de Yucatán, se encontró que en los embriones globulares hay muy poca pectina metil esterificada y desesterificada. Esto podría deberse a que por ser células muy jóvenes y aún en proceso de formación, sus paredes no estén desarrolladas y las redes de celulosa y hemicelulosa aún están constituyéndose, por lo que la pectina aún no se deposita. Otra posibilidad es que debido al transporte intracelular de las vesículas que acarrean la pectina, el depósito en sus sitios de función sea más tardado en las etapas tempranas del desarrollo embriogénico.

En los embriones más desarrollados, pero de frutos aún inmaduros de cocotero, hay pectina mayormente metil esterificada de acuerdo con la señal emitida por el anticuerpo JIM7, esto podría estar relacionado con el hecho de que el embrión pasa de la forma cónica hacia la de torpedo, por lo que se necesitaría del aumento de células y de la pectina metil esterificada para facilitar la división celular, tal como ocurre en los proembriones somáticos de *Capsicum annum* y *B. napus* (Bárány et al., 2010; Solís et al., 2016), así como de *Quercus suber* (Pérez-Pérez et al., 2019).

Para explicar el comportamiento descrito de la metil esterificación de la pectina en los trabajos reportados y en nuestro estudio, debe considerarse la posibilidad de que éste sea influenciado por el origen del tejido, si es *in vitro* o *in vivo*, o si son tejidos somáticos o cigóticos, tal como se

ha descrito en *Castanea mullisima* (Du et al., 2020) y *Brassica napus* (Corral-Martínez et al., 2019).

Se ha reportado que la pectina se encuentra principalmente en la lámina media, facilitando la interacción célula a célula que ayuda a su vez durante la maduración de los frutos (Mohnen, 2008; Wolf et al., 2009; Levesque-Tremblay et al., 2015; Wang et al., 2018). La metil desesterificación de la pectina promueve la separación celular que es necesaria para el ablandamiento de los frutos (Parra et al., 2020). En el caso del fruto de cocotero, aunque en las células del embrión y principalmente las del endospermo hay separación celular, no se presenta un ablandamiento; esto podría deberse a que el endospermo se endurece conforme madura.

Por otra parte, se sabe que la pectina con un bajo nivel de metil esterificación tiende a unirse con iones de Ca^{+2} , manteniendo una dinámica en las interacciones célula a célula (Albersheim et al., 2011; Formiga et al., 2013). El cocotero en su endospermo líquido posee cantidades considerables de iones entre ellos el calcio y mantienen una estrecha relación con el endospermo sólido, donde ocurre una movilización de reservas (Prades et al., 2012; Niral & Jerard, 2019; Kumar et al., 2021).

Entre los iones de calcio y la pectina metil desesterificada se da la formación de las denominadas cajas de huevo, que dan rigidez a la pared celular (Salazar & Gamboa deBuen, 2013); esto podría explicar por qué en el cocotero, conforme el fruto madura, el endospermo sólido se endurece.

La composición celular de los embriones cigóticos de cocotero, es variada (de Vries & Weijers, 2017). En el presente estudio, se encontró que, en las células del parénquima localizadas en el haustorio, la pectina estaba principalmente metil desesterificada en ambas variedades. Además, en el eje axial del haustorio existen haces provasculares que darán paso a la formación del xilema y del floema, y sus paredes celulares están metil desesterificadas primordialmente. Esta característica podría explicarse debido a que son células especializadas con mayor tiempo de formación; esta similitud se describió en el floema y las células del parénquima de píceas de Noruega y de pino silvestre (Kim & Daniel, 2017).

En el caso de los tejidos adyacentes al embrión de cocotero, se observó claramente una diferencia en el grado de metil esterificación y desesterificación de la pectina en las zonas que rodean a embrión cigótico. Asumimos que hay una relación entre la extensibilidad y cohesión de las paredes celulares durante el desarrollo de la semilla o fruto. Un comportamiento similar

se observó en las paredes celulares de achicoria (Chapman et al., 2000) y *Castanea mollissima* (Du et al., 2020).

Como se ha reportado en la literatura, la pectina metil desesterificada ayuda a la expansión celular dado que relaja las paredes celulares para que puedan expandirse y crecer (Zhang & Zhang, 2020). La comparación de las células de los frutos inmaduros con la de los de estadios intermedios y maduros, mostró que, en frutos jóvenes, las células son pequeñas y están agrupadas mientras que, en los estadios con más madurez, las células son más grandes y alargadas.

Se ha descrito que la síntesis de la pectina ocurre en el retículo endoplasmático y que su transporte inicia en el aparato de Golgi, a partir de donde se originan vesículas que contienen pectina metil esterificada y se transportan hacia las paredes celulares donde depositan su carga (Willats et al., 2001; Harholt et al., 2010; Anderson, 2016). Estas vesículas también se observaron en este estudio, particularmente en la variedad Alto del Pacífico mexicano, donde el anticuerpo JIM7 produjo la señal más intensa, apoyando la teoría de la síntesis y disposición de la pectina en las paredes celulares.

Con los resultados anteriores se puede concluir que el cocotero posee una dinámica y niveles de metil esterificación/desesterificación de la pectina comparables al de otras monocotiledóneas y dicotiledóneas, como se observó en banano (Xu et al., 2011), y en *Arabidopsis* (Sala et al., 2013). Además, ambos autores proponen que la presencia de la pectina metil esterificada y desesterificada es un evento universal en mono y dicotiledóneas.

En los embriones inmaduros y maduros de coco no se observaron variaciones en cuanto a la pectina metil esterificada y desesterificada. Estos resultados coincidieron con los obtenidos en *Mauritia flexuosa* (Dias et al., 2020), donde había poca variación en el grado de metil esterificación. Esto explicaría porqué tienen un comportamiento similar en el grado de metil esterificación.

En conjunto con los resultados de este estudio, se puede asegurar que existe una dinámica en el grado de metil esterificación y desesterificación de la pectina, tanto en el embrión como en sus tejidos adyacentes, y que este evento acompaña todo el proceso de desarrollo del fruto. Esto confirma lo reportado por Micheli (2001) y Levesque-Tremblay y colaboradores (2015a), quienes describen que la modificación de los homogalacturonanos de la pectina; en específico, la metil esterificación/desesterificación, es selectiva y específica de acuerdo al papel que desempeñarán las células.

Por otra parte, Betekhtin y colaboradores (2018), afirmaron que los cambios en la pared celular son factores que están estrechamente relacionados con los diferentes estados de desarrollo tanto en los tejidos, los órganos y durante los estadios embriogénicos y posteriores a estos. Esto también se observó en los embriones cigóticos de cocotero donde hubo cambios significativos en el comportamiento de la pectina en etapas claves del desarrollo.

Junto con el desarrollo de la semilla en *A. thaliana* se ha observado que la actividad de la PME incrementa durante el desarrollo y maduración del embrión, y también participa, al menos en parte, en la regulación de la germinación, dado que su actividad es diferencial en la pectina de la pared celular de los diferentes tejidos (Müller et al., 2006; Levesque-Tremblay et al., 2015a). Los resultados anteriores están de acuerdo con lo observado en durante el desarrollo de la semilla y el embrión del cocotero, dado que, en esta investigación se encontró que conforme el fruto madura la pectina metil desesterificada aumentaba en comparación a los estadios inmaduros, y el patrón de pectina metil desesterificada es diferente en el embrión como en el endospermo, lo que podría indicar que la actividad de la PME de manera general aumenta, conforme la semilla madura.

CAPÍTULO V**CONCLUSIONES**

El desarrollo y maduración del fruto de cocotero y del embrión es asincrónico, sin embargo, el propósito final del fruto o semilla es la formación de una nueva planta; por ello, los cotiledones, las células del endospermo y las células que formarán al haustorio maduran y se desarrollan a su propio ritmo.

Designar el estadio de maduración del fruto de cocotero en base a la posición de las inflorescencias puede no ser estrictamente correcto; esto porque la polinización de las flores ocurre de manera asincrónica, y también porque las condiciones ambientales en donde crecen las palmas de cocotero pueden influir en la maduración.

La morfología del embrión cigótico de cocotero es similar a la de otras especies de la familia de las Arecaceae, poseen un embrión que tiene un tejido especializado que crece durante la germinación denominado haustorio y un endospermo abundante.

Los lípidos están presentes en los embriones inmaduros de ambas variedades. Conforme el embrión y el endospermo se desarrollan la cantidad de lípidos aumenta, habiendo mayor presencia de cuerpos lipídicos en las células del endospermo que en las del embrión.

En lo que respecta a las proteínas y los carbohidratos, el patrón es similar; la presencia de ambos es mayor en los estadios inmaduros que en los maduros, independientemente de la variedad. Tal patrón de acumulación podría deberse a los procesos metabólicos que ocurren en la célula, a la conversión de carbohidratos a almidón, al tipo de proteínas presentes y que pueden ser de tipo estructural, y sobre todo, a la movilización de las mismas para el proceso de germinación.

La metil esterificación y desesterificación es un proceso dinámico que ocurre en las células del embrión y del endospermo y estas variaciones van acompañadas con el proceso de maduración, ya que en todos los estadios la dinámica de la metil esterificación varió, sobre todo en los tejidos donde había división celular y acumulación de reservas.

BIBLIOGRAFÍA

- Abraham, A., & Mathew, P. M. (1963). Cytology of coconut endosperm. *Annals of Botany*, 27(3), 505–512.
- Abraham, A., Ninan, C. A., & Gopinath, P. (1965). Cytology of development of abnormal endosperm in Philippine Makapuno coconuts. *Caryologia*, 18(3), 395–408.
- Alang, Z. C. (1981). *Aspects of the physiology and biochemistry of germination in the oil palm (Elaeis guineensis Jacq.)*. Ph. D. dissertation, University of Agriculture, Malaysia.
- Alang, Z. C., Moir, G. F. J., & Jones, L. H. (1988). Composition, degradation and utilization of endosperm during germination in the oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). *Annals of Botany*, 61(2), 261–268.
- Albersheim, P., Darvill, A. G., O’neill, M. A., Schols, H. A., & Voragen, A. G. J. (1996). An hypothesis: the same six polysaccharides are components of the primary cell walls of all higher plants. In *Progress in biotechnology* (Vol. 14, pp. 47–55). Elsevier.
- Albersheim, P., Darvill, A., Roberts, K., Sederoff, R., & Staehelin, A. (2011). Plant Cell Walls: from Chemistry to Biology. *Annals of Botany*, 108(1), viii–ix.
- Anderson, C. T. (2016). We be jammin’: an update on pectin biosynthesis, trafficking and dynamics. *Journal of Experimental Botany*, 67(2), 495–502.
- Aspinall, G. O. (1959). Structural chemistry of the hemicelluloses. In *Advances in Carbohydrate Chemistry* (Vol. 14, pp. 429–468). Elsevier.
- Atmodjo, M. A., Hao, Z., & Mohnen, D. (2013). Evolving views of pectin biosynthesis. *Annual Review of Plant Biology*, 64, 747–779. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042811-105534>
- Baker, W. J., & Dransfield, J. (2016). Beyond *Genera Palmarum*: progress and prospects in palm systematics. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 182(2), 207–233.
- Balasubramaniam, K., Atukorala, T. M. S., Wijesundera, S., Hoover, A. A., & De Silva, M. A. T. (1973). Biochemical changes during germination of the coconut (*Cocos nucifera*). *Annals of Botany*, 37(3), 439–445.

- Bar-Peled, M., Urbanowicz, B. R. A. E., & O'Neill, M. A. (2012). The synthesis and origin of the pectic polysaccharide rhamnogalacturonan II—insights from nucleotide sugar formation and diversity. *Frontiers in Plant Science*, 3, 92.
- Bárány, I., Fadón, B., Risueño, M. C., & Testillano, P. S. (2010). Microspore reprogramming to embryogenesis induces changes in cell wall and starch accumulation dynamics associated with proliferation and differentiation events. *Plant Signaling & Behavior*, 5(4), 341–345.
- Barnes, W. J., & Anderson, C. T. (2018). Release, recycle, rebuild: cell-wall remodeling, autodegradation, and sugar salvage for new wall biosynthesis during plant development. *Molecular Plant*, 11(1), 31–46. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2017.08.011>
- Benech-Arnold, R. L., Gualano, N., Leymarie, J., Coñme, D., & Corbineau, F. (2006). Hypoxia interferes with ABA metabolism and increases ABA sensitivity in embryos of dormant barley grains. *Journal of Experimental Botany*, 57(6), 1423–1430.
- Betekhtin, A., Milewska-Hendel, A., Lusinska, J., Chajec, L., Kurczynska, E., & Hasterok, R. (2018). Organ and tissue-specific localisation of selected cell wall epitopes in the zygotic embryo of *Brachypodium distachyon*. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(3), 725.
- Bewley, J., Bradford, K., Hilhorst, H., & Nonogaki, H. (2013). Seeds: Physiology of development, germination and dormancy. *New York: Springer*, 23(4), 289.
- Bewley, J. D. (2001). Seed germination and reserve mobilization. *Enciclopedia de Ciencias de La Vida*, 1, 7.
- Bhatnagar, S. P., & Sawhney, V. (1981). Endosperm—Its Morphology, infrastructure, and Histochemistry. *International Review of Cytology*, 73, 55–102.
- Bosch, M., Cheung, A. Y., & Hepler, P. K. (2005). Pectin methylesterase, a regulator of pollen tube growth. *Plant Physiology*, 138(3), 1334–1346. <https://doi.org/10.1104/pp.105.059865>
- Braybrook, S. A., Hofte, H., & Peaucelle, A. (2012). Probing the mechanical contributions of the pectin matrix: insights for cell growth. *Plant Signaling & Behavior*, 7(8), 1037–1041.
- Braybrook, S. A., & Peaucelle, A. (2013). Mechano-chemical aspects of organ formation in *Arabidopsis thaliana*: the relationship between auxin and pectin. *PloS One*, 8(3), e57813.
- Brett, C. T., & Waldron, K. W. (1996). *Physiology and Biochemistry of Plant Cell walls* (Vol. 2).

Springer Science & Business Media.

- Browse, J. (1997). Synthesis and storage of fatty acids. *Cellular and Molecular Biology of Plant Seed Development*, 407–440.
- Buckeridge, M. S., dos Santos, H. P., & Tiné, M. A. S. (2000). Mobilisation of storage cell wall polysaccharides in seeds. *Plant Physiology and Biochemistry*, 38(1–2), 141–156.
- Buckley, R., & Harries, H. (1984). Self-sown wild-type coconuts from Australia. *Biotropica*, 16(2), 148–151.
- Caffall, K. H., & Mohnen, D. (2009). The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides. *Carbohydrate Research*, 344(14), 1879–1900.
- Carpita, N. C., & Gibeaut, D. M. (1993). Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *The Plant Journal*, 3(1), 1–30.
- Carpita, N., McCann, M., & Griffing, L. R. (1996). The plant extracellular matrix: news from the cell's frontier. *The Plant Cell*, 8(9), 1451.
- Carpita, N., Tierney, M., & Campbell, M. (2001). Molecular biology of the plant cell wall: searching for the genes that define structure, architecture and dynamics. In *Plant Cell Walls* (pp. 1–5). Springer.
- Carvalho, V. S., Ribeiro, L. M., Lopes, P. S. N., Agostinho, C. O., Matias, L. J., Mercadante-Simões, M. O., & Correia, L. N. F. (2015). Dormancy is modulated by seed structures in palms of the cerrado biome. *Australian Journal of Botany*, 63(5), 444–454.
- Cassab, G. I. (1998). Plant cell wall proteins. *Annual Review of Plant Biology*, 49(1), 281–309.
- Chapman, A., Blervacq, A. S., Hendriks, T., Slomianny, C., Vasseur, J., & Hilbert, J. L. (2000). Cell wall differentiation during early somatic embryogenesis in plants. II. Ultrastructural study and pectin immunolocalization on chicory embryos. *Canadian Journal of Botany*, 78(6), 824–831. <https://doi.org/10.1139/b00-060>
- Clausen, M. H., Willats, W. G. T., & Knox, J. P. (2003). Synthetic methyl hexagalacturonate hapten inhibitors of anti-homogalacturonan monoclonal antibodies LM7, JIM5 and JIM7. *Carbohydrate Research*, 338(17), 1797–1800. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(03\)00272-6](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(03)00272-6)

- Corral-Martínez, P., Driouich, A., & Seguí-Simarro, J. M. (2019). Dynamic changes in arabinogalactan-protein, pectin, xyloglucan and xylan composition of the cell wall during microspore embryogenesis in *Brassica napus*. *Frontiers in Plant Science*, *10*, 332.
- Cosgrove, D. J. (1993). Wall extensibility: its nature, measurement and relationship to plant cell growth. *New Phytologist*, *124*(1), 1–23.
- Cosgrove, D. J. (2005). Growth of the plant cell wall. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *6*(11), 850–861.
- Cruz-Valderrama, J. E., Jiménez-Durán, K., Zúñiga-Sánchez, E., Salazar-Irbe, A., Márquez-Guzmán, J., & Gamboa-deBuen, A. (2018). Degree of pectin methyl esterification in endosperm cell walls is involved in embryo bending in *Arabidopsis thaliana*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *495*(1), 639–645. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.11.077>
- Cuéllar, E. B. (2018). Reutilización de la palma de coco (*Cocos nucifera* L.) con fines madereros. *Revista Científica Agroecosistemas*, *6*(3), 121–128.
- Cumming, C. M., Rizkallah, H. D., McKendrick, K. A., Abdel-Massih, R. M., Baydoun, E. A. H., & Brett, C. T. (2005). Biosynthesis and cell-wall deposition of a pectin–xyloglucan complex in pea. *Planta*, *222*(3), 546–555.
- Cutter Jr, V. M., Wilson, K. S., & Freeman, B. (1955). Nuclear behavior and cell formation in the developing endosperm of *Cocos nucifera*. *American Journal of Botany*, 109–115.
- Cutter, V. M., & Freeman, B. (1954). Development of the syncytial endosperm of *Cocos nucifera*. *Nature*, *173*(4409), 827–828.
- Davis, T. A. (1962). Asymmetry and yield in *Cocos nucifera* L. *Experientia*, *18*(7), 321–322.
- de Araújo Silva-Cardoso, I. M., Meira, F. S., Gomes, A. C. M. M., & Scherwinski-Pereira, J. E. (2020). Histology, histochemistry and ultrastructure of pre-embryogenic cells determined for direct somatic embryogenesis in the palm tree *Syagrus oleracea*. *Physiologia Plantarum*, *168*(4), 845–875.
- de Vries, S. C., & Weijers, D. (2017). Plant embryogenesis. *Current Biology*, *27*(17), R870–R873.
- Debeaujon, I., Léon-Kloosterziel, K. M., & Koornneef, M. (2000). Influence of the testa on seed

-
- dormancy, germination, and longevity in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 122(2), 403–414.
- Demason, D. A. (1997). Endosperm structure and development. In *Cellular and molecular biology of plant seed development* (pp. 73–115). Springer.
- DeMason, D. A. (1984). Growth parameters in the cotyledon of date seedlings. *Botanical Gazette*, 145(2), 176–183.
- DeMason, D. A. (1985). Histochemical and ultrastructural changes in the haustorium of date (*Phoenix dactylifera* L.). *Protoplasma*, 126(3), 168–177.
- DeMason, D. A. (1986). Endosperm structure and storage reserve histochemistry in the palm, *Washingtonia filifera*. *American Journal of Botany*, 73(9), 1332–1340.
- DeMason, D. A. (1988a). Embryo structure and storage reserve histochemistry in the palm *Washingtonia filifera*. *American Journal of Botany*, 75(3), 330–337.
- DeMason, D. A. (1988b). Seedling development in *Washingtonia filifera* (Arecaceae). *Botanical Gazette*, 149(1), 45–56.
- DeMason, D. A., & Sekhar, K. N. C. (1990). Electrophoretic characterization and immunological localization of coconut (*Cocos nucifera* L.) endosperm storage proteins. *Botanical Gazette*, 151(3), 302–313.
- DeMason, D. A., Sexton, R., & Reid, J. S. G. (1983). Structure, composition and physiological state of the endosperm of *Phoenix dactylifera* L. *Annals of Botany*, 52(1), 71–80.
- Demason, D. A., & Thomson, W. W. (1981). Structure and ultrastructure of the cotyledon of date palm (*Phoenix dactylifera* L.). *Botanical Gazette*, 142(3), 320–328.
- Derbyshire, P., McCann, M. C., & Roberts, K. (2007). Restricted cell elongation in *Arabidopsis* hypocotyls is associated with a reduced average pectin esterification level. *BMC Plant Biology*, 7(1), 1–12.
- Dias, G. P., Mazzottini-dos-Santos, H. C., Ribeiro, L. M., Nunes, Y. R. F., Bragança, G. P. P., dos Santos Isaias, R. M., & Mercadante-Simões, M. O. (2020). Reserve mobilization dynamics and degradation pattern of mannan-rich cell walls in the recalcitrant seed of *Mauritia flexuosa* (Arecaceae). *Plant Physiology and Biochemistry*, 156, 445–460.
- Dolan, L., Linstead, P., & Roberts, K. (1997). Developmental regulation of pectic polysaccharides in the root meristem of *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany*,
-

48(3), 713–720.

- Du, B., Zhang, Q., Cao, Q., Xing, Y., Qin, L., & Fang, K. (2020). Changes of cell wall components during embryogenesis of *Castanea mollissima*. *Journal of Plant Research*, 133(2), 257–270.
- El-Tantawy, A. A., Solís, M. T., Da Costa, M. L., Coimbra, S., Risueño, M. C., & Testillano, P. S. (2013). Arabinogalactan protein profiles and distribution patterns during microspore embryogenesis and pollen development in *Brassica napus*. *Plant Reproduction*, 26, 231–243. <https://doi.org/10.1007/s00497-013-0217-8>
- Esau, K., Cheadle, V. I., & Gill, R. H. (1966). Cytology of differentiating tracheary elements II. Structures associated with cell surfaces. *American Journal of Botany*, 53(8), 765–771.
- Faostat, F. A. O. (2017). Available online: <http://www.fao.org/faostat/en/#data>. QC (Accessed on January 2018).
- Feder, N. E. D., & O'Brien, T. P. (1968). Plant microtechnique: some principles and new methods. *American Journal of Botany*, 55(1), 123–142.
- Ferreira, C. D., Silva-Cardoso, I. M. de A., Ferreira, J. C. B., Costa, F. H. da S., & Scherwinski-Pereira, J. E. (2020). Morphostructural and histochemical dynamics of *Euterpe precatoria* (Arecaceae) germination. *Journal of Plant Research*, 133(5), 693–713.
- Fincher, G. B. (1989). Molecular and cellular biology associated with endosperm mobilization in germinating cereal grains. *Annual Review of Plant Physiology*, 40, 305–346.
- Florack, D. E. A., & Stiekema, W. J. (1994). Thionins: properties, possible biological roles and mechanisms of action. *Plant Molecular Biology*, 26(1), 25–37. <https://doi.org/10.1007/BF00039517>
- Formiga, A. T., de Oliveira, D. C., Ferreira, B. G., Magalhães, T. A., de Castro, A. C., Fernandes, G. W., & Isaias, R. M. dos S. (2013). The role of pectic composition of cell walls in the determination of the new shape-functional design in galls of *Baccharis reticularia* (Asteraceae). *Protoplasma*, 250(4), 899–908.
- Freshour, G., Clay, R. P., Fuller, M. S., Albersheim, P., Darvill, A. G., & Hahn, M. G. (1996). Developmental and tissue-specific structural alterations of the cell-wall polysaccharides of *Arabidopsis thaliana* roots. *Plant Physiology*, 110(4), 1413–1429.

- Freudenberg, K., & Neish, A. C. (1968). Molecular biology, biochemistry and biophysics. In H. Springer Berlín (Ed.), *Constitution and Biosynthesis of Lignin*. (1st ed., p. 132). Springer-Verlag.
- Gátin, C.-L. (1906). Recherches anatomiques et chimiques sur la germination des palmiers. *Annales Des Sciences Naturelles; Botanique*, 3, 191–314.
- Gifford, E. M. (1989). Morphology and evolution of vacular plants. *International Association for Plant Taxonomy*, 38(4), 613.
- Gómez-Maqueo, X., & Gamboa-deBuen, A. (2016). The dynamics of plant cell wall in muro modifications and its physiological implications on seed germination. *New Challenges in Seed Biology-Basic and Translational Research Driving Seed Technology*. London: InTech, 155–177.
- Greig-Smith, P., & Corner, E. J. H. (1966). The natural history of palms. *The Journal of Ecology*, 56(1), 311. <https://doi.org/10.2307/2258081>
- Guillemin, F., Guillon, F., Bonnin, E., Devaux, M.-F., Chevalier, T., Knox, J. P., Liners, F., & Thibault, J.-F. (2005). Distribution of pectic epitopes in cell walls of the sugar beet root. *Planta*, 222(2), 355–371.
- Gunn, B. F., Baudouin, L., & Olsen, K. M. (2011). Independent origins of cultivated coconut (*Cocos nucifera* L.) in the old world tropics. *Plos One*, 6(6), e21143.
- Haas, K. T., Wightman, R., Meyerowitz, E. M., & Peaucelle, A. (2020). Pectin homogalacturonan nanofilament expansion drives morphogenesis in plant epidermal cells. *Science*, 367(6481), 1003–1007. <https://doi.org/10.1126/science.aaz5103>
- Haccius, B., & Philip, V. J. (1979). Embryo development in *Cocos nucifera* L.: a critical contribution to a general understanding of palm embryogenesis. *Plant Systematics and Evolution*, 132(1), 91–106.
- Handford, M. (2006). Biosynthesis of plant cell walls. *Ciencias de Investigación Agraria*, 33(3), 179–196.
- Harholt, J., Suttangkakul, A., & Vibe Scheller, H. (2010). Biosynthesis of pectin. *Plant Physiology*, 153(2), 384–395.
- Harries, H. C. (1978). The evolution, dissemination and classification of *Cocos nucifera* L. *The*

- Botanical Review*, 44(3), 265–319.
- Harris, P. J., & Northcote, D. H. (1971). Polysaccharide formation in plant Golgi bodies. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 237(1), 56–64.
- Hayashi, T. (1989). Xyloglucans in the primary cell wall. *Annual Review of Plant Biology*, 40(1), 139–168.
- Hayashi, T., Ogawa, K., & Mitsuishi, Y. (1994). Characterization of the adsorption of xyloglucan to cellulose. *Plant and Cell Physiology*, 35(8), 1199–1205.
- Herman, E. M. (1995). Cell and molecular biology of seed oil bodies. In *Seed development and germination* (1st ed., p. 20). Routledge.
- Höfte, H., Peaucelle, A., & Braybrook, S. (2012). Cell wall mechanics and growth control in plants: the role of pectins revisited. *Frontiers in Plant Science*, 3, 121.
- Howard, F., Moore, D., Abreu, E., & Gallo, S. (2021). *Acaro del coco, Aceria guerreronis Keifer (Arácnidae: Acari: Eriophyidae)1* (EENY-405).
- Huang, A. H. C. (2018). Plant lipid droplets and their associated proteins: potential for rapid advances. *Plant Physiology*, 176(3), 1894–1918.
- Huang, M.-D., & Huang, A. H. C. (2015). Bioinformatics reveal five lineages of oleosins and the mechanism of lineage evolution related to structure/function from green algae to seed plants. *Plant Physiology*, 169(1), 453–470.
- Hv, S., & Ulvskov, P. (2010). Hemicelluloses. *Annual Review of Plant Biology*, 61, 263–289.
- Islas-Flores, I., Oropeza, C., & Hernández-Sotomayor, S. M. T. (1998). Protein Phosphorylation during Coconut Zygotic Embryo Development1. *Plant Physiology*, 118(1), 257–263. <https://doi.org/10.1104/pp.118.1.257>
- Javel, I. M., Bandala, A. A., Salvador, R. C., Bedruz, R. A. R., Dadios, E. P., & Vicerra, R. R. P. (2019). Coconut fruit maturity classification using fuzzy logic. *2018 IEEE 10th International Conference on Humanoid, Nanotechnology, Information Technology, Communication and Control, Environment and Management (HNICEM)*, 1–6.
- Jin, T., Wang, C., Zhang, C., Wang, Y., Chen, Y.-W., Guo, F., Howard, A., Cao, M.-J., Fu, T.-J., & McHugh, T. H. (2017). Crystal structure of cocosin, a potential food allergen from coconut (*Cocos nucifera*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(34), 7560–7568.

- Johansen, D. A. (1940). *Plant microtechnique*. McGraw-Hill Book Company, Inc: London; 530p.
- Keegstra, K. (2010). Plant cell walls. *Plant Physiology*, 154(2), 483–486.
- Keegstra, K., Talmadge, K. W., Bauer, W. D., & Albersheim, P. (1973). The structure of plant cell walls: III. A model of the walls of suspension-cultured sycamore cells based on the interconnections of the macromolecular components. *Plant Physiology*, 51(1), 188–197.
- Keegstra, K., Varner, J. E., & Lin, L.-S. (1989). Plant cell wall architecture. *Cell*, 154(2), 231–239.
- Kim, J. S., & Daniel, G. (2017). Immunolocalization of pectin and hemicellulose epitopes in the phloem of Norway spruce and Scots pine. *Trees*, 31(4), 1335–1353.
- Knox, J. P. (1997). The use of antibodies to study the architecture and developmental regulation of plant cell walls. *International Review of Cytology*, 171, 79–120. [https://doi.org/10.1016/s0074-7696\(08\)62586-3](https://doi.org/10.1016/s0074-7696(08)62586-3)
- Knox, J. P., Linstead, P. J., King, J., Cooper, C., & Roberts, K. (1990). Pectin esterification is spatially regulated both within cell walls and between developing tissues of root apices. *Planta*, 181, 512–521. <https://doi.org/10.1007/BF00193004>
- Kolattukudy, P. E. (2001). Polyesters in higher plants. *Biopolyesters. Avances En Ingeniería Bioquímica/Biotecnología*, 71, 1–49.
- Krisanapook, K., Anusornpornpong, P., Havananda, T., & Luengwilai, K. (2019). Inflorescence and flower development in Thai aromatic coconut. *Journal of Applied Horticulture*, 21(1), 3–12.
- Kumar, A., & Samsudeen, K. (2018). Seasonal variation and developmental changes in the biochemical composition of coconut kernel in Mohachao Narel, a sweet endosperm coconut (*Cocos nucifera* L.) population from Maharashtra. *BioScience Trends*, 11, 1599–1603.
- Kumar, M., Saini, S. S., Agrawal, P. K., Roy, P., & Sircar, D. (2021). Nutritional and metabolomics characterization of the coconut water at different nut developmental stages. *Journal of Food Composition and Analysis*, 96, 103738.
- Kumar, S. N. (2011). Variability in coconut (*Cocos nucifera* L.) germplasm and hybrids for fatty acid profile of oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(24), 13050–13058.

- Laibach, N., Post, J., Twyman, R. M., Gronover, C. S., & Prüfer, D. (2015). The characteristics and potential applications of structural lipid droplet proteins in plants. *Journal of Biotechnology*, 201, 15–27.
- Levesque-Tremblay, G., Müller, K., Mansfield, S. D., & Haughn, G. W. (2015). Highly methyl esterified seeds is a pectin methyl esterase involved in embryo development. *Plant Physiology*, 167(3), 725–737. <https://doi.org/10.1104/pp.114.255604>
- Levesque-Tremblay, G., Pelloux, J., Braybrook, S. A., & Müller, K. (2015). Tuning of pectin methylesterification: consequences for cell wall biomechanics and development. *Planta*, 242, 791–811. <https://doi.org/10.1007/s00425-015-2358-5>
- Liyanage, D. V. (1958). Varieties and forms of the coconut palm grown in Ceylon. *Ceylon Coconut Quarterly*, 9, 1–10.
- López-Villalobos, A., Dodds, P. F., & Hornung, R. (2011). Lauric acid improves the growth of zygotic coconut (*Cocos nucifera* L.) embryos in vitro. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 106(2), 317–327.
- Lopez-Villalobos, A., Hornung, R. K. W., & Dodds, P. F. (1999). Fatty acid composition of zygotic embryos of coconut during germination in vitro and ex-vitro. *II ISHS Conference on Fruit Production in the Tropics and Subtropics 531*, 237–240.
- López-Villalobos, A., Dodds, P. F., & Hornung, R. (2001). Changes in fatty acid composition during development of tissues of coconut (*Cocos nucifera* L.) embryos in the intact nut and in vitro. *Journal of Experimental Botany*, 52(358), 933–942.
- Lord, E. M., & Mollet, J.-C. (2002). Plant cell adhesion: a bioassay facilitates discovery of the first pectin biosynthetic gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(25), 15843–15845.
- Lucas, W. J. (1995). Plasmodesmata: intercellular channels for macromolecular transport in plants. *Current Opinion in Cell Biology*, 7(5), 673–680.
- Manimekalai, R., Karun, A., & Sajini, K. K. (2011). Polypeptide variability among the coconut zygotic embryos in two culture conditions. *Progressive Horticulture*, 43(1), 2.
- Manivannan, A., Bhardwaj, R., Padmanabhan, S., Suneja, P., Hebbar, K. B., & Kanade, S. R. (2018). Biochemical and nutritional characterization of coconut (*Cocos nucifera* L.) haustorium. *Food Chemistry*, 238, 153–159.

- Mastroberti, A. A., & De Araujo Mariath, J. E. (2008). Development of mucilage cells of *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae). *Protoplasma*, 232, 233–245. <https://doi.org/10.1007/s00709-007-0274-7>
- Matilla, A. J. (2008). Desarrollo y germinación de las semillas. *Fundamentos de Fisiología Vegetal*, 2, 549.
- Mazzottini-dos-Santos, H. C., Ribeiro, L. M., & Oliveira, D. M. T. (2017). Roles of the haustorium and endosperm during the development of seedlings of *Acrocomia aculeata* (Arecaceae): dynamics of reserve mobilization and accumulation. *Protoplasma*, 254(4), 1563–1578.
- Meerow, A. W., Henderson, A., & Borchsenius, F. (2000). Evolution, variation, and classification of palms. *Systematic Botany*, 25(1), 152–153. <https://doi.org/10.2307/2666681>
- Menon, K. P. V., & Pandalai, K. M. (1958). The coconut palm. A monograph. In *The coconut palm. A monograph*. Indian Central Coconut Committee. S. India.
- Micheli, F. (2001). Pectin methylesterases: cell wall enzymes with important roles in plant physiology. *Trends in Plant Science*, 6(9), 414–419.
- Mohnen, D. (2008). Pectin structure and biosynthesis. *Current Opinion in Plant Biology*, 11(3), 266–277. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2008.03.006>
- Moura, A. C. F., Ribeiro, L. M., Mazzottini-dos-Santos, H. C., Mercadante-Simões, M. O., & Nunes, Y. R. F. (2019). Cytological and histochemical evaluations reveal roles of the cotyledonary petiole in the germination and seedling development of *Mauritia flexuosa* (Arecaceae). *Protoplasma*, 256(5), 1299–1316.
- Moura, E. F., Ventrella, M. C., & Motoike, S. Y. (2010). Anatomy, histochemistry and ultrastructure of seed and somatic embryo of *Acrocomia aculeata* (Arecaceae). *Scientia Agricola*, 67, 399–407.
- Müller, K., Tintelnot, S., & Leubner-Metzger, G. (2006). Endosperm-limited Brassicaceae seed germination: abscisic acid inhibits embryo-induced endosperm weakening of *Lepidium sativum* (cress) and endosperm rupture of cress and *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology*, 47(7), 864–877.
- Nampoothiri, K. U. K. (1970). Pollen studies in coconut (*Cocos nucifera* L.) with special reference to a sampling procedure. *Indian Journal of Agricultural Science*, 40, 457–460.

- Neves, S. da C., Ribeiro, L. M., da Cunha, I. R. G., Pimenta, M. A. S., Mercadante-Simões, M. O., & Lopes, P. S. N. (2013). Diaspore structure and germination ecophysiology of the babassu palm (*Attalea vitrivir*). *Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*, 208(1), 68–78.
- Nigam, A. (2020). *BBYCL-136 Plant Anatomy and Embryology* (pp. 111–196). Indira Gandhi National Open University, New Delhi.
- Niral, V., & Jerard, B. A. (2019). Botany, origin and genetic resources of coconut. In S. Springer (Ed.), *The Coconut Palm (Cocos nucifera L.) - Research and Development Perspectives* (pp. 57–111). https://doi.org/10.1007/978-981-13-2754-4_3
- Niral, V., Jerard, B. A., Kavitha, K. V, Samsudeen, K., & Nair, R. V. (2008). Variability and association among floral traits and pollen recovery in coconut (*Cocos nucifera L.*). *Journal of Plantation Crops*, 36(3), 186–191.
- Niral, V., Nair, R. V, Jerard, B. A., Samsudeen, K., & Ratnambal, M. J. (2009). Evaluation of coconut germplasm for fruit component traits and oil yield. *J Oilseeds Res*, 26(Special issue), 668–670.
- Northcote, D. H. (1969a). Fine structure of cytoplasm in relation to synthesis and secretion in plant cells. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences*, 173(1030), 21–30.
- Northcote, D. H. (1969b). The synthesis and metabolic control of polysaccharides and lignin during the differentiation of plant cells. *Essays in Biochemistry*, 5, 89–137.
- Northcote, D. H. (1972). Chemistry of the plant cell wall. *Annual Review of Plant Physiology*, 23(1), 113–132.
- Northcote, D. H. (1986). Control of pectin synthesis and deposition during plant cell wall growth. In *Chemistry and Function of Pectins* (pp. 134–140). ACS Publications.
- O'Neill, M. A., Eberhard, S., Albersheim, P., & Darvill, A. G. (2001). Requirement of borate cross-linking of cell wall rhamnogalacturonan II for Arabidopsis growth. *Science*, 294(5543), 846–849.
- Ohler, J. (1984). *Coconut, tree of life*. (No. 57).
- Oliveira, N. C. C., Lopes, P. S. N., Ribeiro, L. M., Mercadante-Simões, M. O., Oliveira, L. A. A.,

- & Silvério, F. O. (2013). Seed structure, germination, and reserve mobilization in *Butia capitata* (Arecaceae). *Trees*, 27(6), 1633–1645.
- Otegui, M., Lima, C., Maldonado, S., & de Lederkremer, R. M. (1998). Histological and chemical characterization of *Myrsine laetevirens* seed. *International Journal of Plant Sciences*, 159(5), 762–772.
- Padmanabhan, D. (1992). Evolution of leaf forms among palms. *Palaeobotanist*, 41, 204–210.
- Panza, V., Lainez, V., & Maldonado, S. (2004). Seed structure and histochemistry in the palm *Euterpe edulis*. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 145(4), 445–453.
- Parra, R., Paredes, M. A., Labrador, J., Nunes, C., Coimbra, M. A., Fernandez-Garcia, N., Olmos, E., Gallardo, M., & Gomez-Jimenez, M. C. (2020). Cell wall composition and ultrastructural immunolocalization of pectin and arabinogalactan protein during *Olea europaea* L. fruit abscission. *Plant and Cell Physiology*, 61(4), 814–825.
- Peaucelle, A., Wightman, R., & Höfte, H. (2015). The control of growth symmetry breaking in the *Arabidopsis* hypocotyl. *Current Biology*, 25(13), 1746–1752. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.05.022>
- Pelloux, J., Rustérucchi, C., & Mellerowicz, E. J. (2007). New insights into pectin methylesterase structure and function. *Trends in Plant Science*, 12(6), 267–277. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2007.04.001>
- Perera, P. I. P., Hoher, V., Weerakoon, L. K., Yakandawala, D. M. D., Fernando, S. C., & Verdeil, J.-L. (2010). Early inflorescence and floral development in *Cocos nucifera* L. (Arecaceae: Arecoideae). *South African Journal of Botany*, 76(3), 482–492.
- Pérez-Pastrana, J., Islas-Flores, I., Bárány, I., Álvarez-López, D., Canto-Flick, A., Canto-Canché, B., Peña-Yam, L., Muñoz-Ramírez, L., Avilés-Viñas, S., Testillano, P. S., & Santana-Buzzy, N. (2018). Development of the ovule and seed of Habanero chili pepper (*Capsicum chinense* Jacq.): Anatomical characterization and immunocytochemical patterns of pectin methyl-esterification. *Journal of Plant Physiology*, 230, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2018.08.005>
- Pérez-Pérez, Y., Carneros, E., Berenguer, E., Solís, M. T., Bárány, I., Pintos, B., Gómez-Garay, A., Risueño, M. C., & Testillano, P. S. (2019). Pectin de-methylesterification and AGP increase promote cell wall remodeling and are required during somatic embryogenesis of

-
- quercus suber. *Frontiers in Plant Science*, 9, 1–17. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01915>
- 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 plications. *Australian Journal of Botany*, 13(2), 225–234.
- Phan, J. L., Cowley, J. M., Neumann, K. A., Herliana, L., O'Donovan, L. A., & Burton, R. A. (2020). The novel features of *Plantago ovata* seed mucilage accumulation, storage and release. *Scientific Reports*, 10(1), 11766. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-68685-w>
- Pickett-Heaps, J. D., & Northcote, D. H. (1966). Relationship of cellular organelles to the formation and development of the plant cell wall. *Journal of Experimental Botany*, 17(1), 20–26.
- Płachno, B. J., Kapusta, M., Świątek, P., Stolarczyk, P., & Kocki, J. (2020). Immunodetection of pectic epitopes, arabinogalactan proteins, and extensins in mucilage cells from the ovules of *Pilosella officinarum* vaill. and *taraxacum officinale* agg. (asteraceae). *International Journal of Molecular Sciences*, 21(24), 9642. <https://doi.org/10.3390/ijms21249642>
- Prades, A., Dornier, M., Diop, N., & Pain, J.-P. (2012). Coconut water uses, composition and properties: a review. *Fruits*, 67(2), 87–107.
- Reynolds, K. B., Cullerne, D. P., El Tahchy, A., Rolland, V., Blanchard, C. L., Wood, C. C., Singh, S. P., & Petrie, J. R. (2019). Identification of genes involved in lipid biosynthesis through de novo transcriptome assembly from *Cocos nucifera* developing endosperm. *Plant and Cell Physiology*, 60(5), 945–960.
- Ribeiro, L. M., Oliveira, D. M. T., & Garcia, Q. de S. (2012). Structural evaluations of zygotic embryos and seedlings of the macaw palm (*Acrocomia aculeata*, Arecaceae) during in vitro germination. *Trees*, 26(3), 851–863.
- Ridley, B. L., O'Neill, M. A., & Mohnen, D. (2001). Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochemistry*, 57(6), 929–967.
- Roberts, K., & Northcote, D. H. (1970). The structure of sycamore callus cells during division in a partially synchronized suspension culture. *Journal of Cell Science*, 6(2), 299–321.
- Rodríguez-Sanz, H., Manzanera, J. A., Solís, M. T., Gómez-Garay, A., Pintos, B., Risueño, M. C., & Testillano, P. S. (2014). Early markers are present in both embryogenesis pathways from microspores and immature zygotic embryos in cork oak, *Quercus suber* L. *BMC Plant*
-

Biology, 14(224). <https://doi.org/10.1186/s12870-014-0224-4>

- Sala, K., Potocka, I., & Kurczynska, E. (2013). Spatio-temporal distribution and methyl-esterification of pectic epitopes provide evidence of developmental regulation of pectins during somatic embryogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *Biologia Plantarum*, 57(3), 410–416.
- Salazar Iribe, A., & Gamboa De Buen, A. (2013). Importancia de las pectinas en la dinámica de la pared celular durante el desarrollo vegetal. *Revista de Educación Bioquímica*, 32(2), 67–75.
- Šamaj, J., Bobák, M., Blehová, A., & Pret'ová, A. (2005). Importance of cytoskeleton and cell wall in somatic embryogenesis. In *Plant Cell Monographs* (Somatic Em, pp. 35–50). Springer, Berlín, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/7089_024
- Samonte, J. L. (1988). *Galactomannan metabolism in the endosperm of developing normal and mutant (makapuno) and germinating normal coconuts*. Universidad de Filipinas en Los Baños, Tesis.
- Samson, J. A. (1983). Tropical tree crops. *Scientia Horticulturae*, 20, 107–110. [https://doi.org/10.1016/0304-4238\(83\)90117-6](https://doi.org/10.1016/0304-4238(83)90117-6)
- Satyabalan, K. (1953). A Note on the Occurrence of "Buttery" Kernel, in Coconut. *Indian Coconut Journal*, 6, 152–154.
- Sekhar, K. N. C., & DeMason, D. A. (1988). Quantitative ultrastructure and protein composition of date palm (*Phoenix dactylifera*) seeds: a comparative study of endosperm vs. embryo. *American Journal of Botany*, 75(3), 323–329.
- Selvaratnam, E. M. (1952). Embryo of the coconut. *Nature*, 169, 714–715.
- Shahbandeh, M. (2022). *Producción de coco en todo el mundo en 2020, por país líder (en millones de toneladas métricas)*. Enero 24. <https://www.statista.com/statistics/1040499/world-coconut-production-by-leading-producers/>
- Silva, R. S., Ribeiro, L. M., Mercadante-Simões, M. O., Nunes, Y. R. F., & Lopes, P. S. N. (2014). Seed structure and germination in buriti (*Mauritia flexuosa*), the swamp palm. *Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*, 209(11), 674–685.

- Solís, M. T., Berenguer, E., Risueño, M. C., & Testillano, P. S. (2016). BnPME is progressively induced after microspore reprogramming to embryogenesis, correlating with pectin de-esterification and cell differentiation in *Brassica napus*. *BMC Plant Biology*, *16*(1), 176. <https://doi.org/10.1186/s12870-016-0863-8>
- Somerville, C., Bauer, S., Brininstool, G., Facette, M., Hamann, T., Milne, J., Osborne, E., Paredes, A., Persson, S., Raab, T., Vorwerk, S., & Youngs, H. (2004). Toward a systems approach to understanding plant cell walls. *Science*, *306*(5705), 2206–2211. <https://doi.org/10.1126/science.1102765>
- Souza Dias, D., Monteiro Ribeiro, L., Sérgio Nascimento Lopes, P., Aclécio Melo, G., Müller, M., & Munné-Bosch, S. (2018). Haustorium–endosperm relationships and the integration between developmental pathways during reserve mobilization in *Butia capitata* (Arecaceae) seeds. *Annals of Botany*, *122*(2), 267–277.
- Sudha, R., Niral, V., & Samsudeen, K. (2021). Botanical Study and Cytology. In *The Coconut Genome* (pp. 13–25). Springer.
- Sugimura, Y., & Murakami, T. (1990). Structure and function of the haustorium in germinating coconut palm seed. *Jap. Agric. Research Quart*, *24*, 1–14.
- Sutherland, P., Hallett, I., & Jones, M. (2009). Probing cell wall structure and development by the use of antibodies: A personal perspective. *New Zealand Journal of Forestry Science*.
- Swaminathan, M. S., & Nambiar, M. C. (1961). Cytology and origin of the dwarf coconut palm. *Nature*, *192*(4797). <https://doi.org/10.1038/192085a0>
- Thomas, R. J., & Josephraj Kumar, A. (2013). Flowering and pollination biology in coconut. *Journal of Plantation Crops*, *41*(2), 109–117.
- Thompson, J. E., & Fry, S. C. (2000). Evidence for covalent linkage between xyloglucan and acidic pectins in suspension-cultured rose cells. *Planta*, *211*(2), 275–286.
- Van Hengel, A. J., Van Kammen, A., & De Vries, S. C. (2002). A relationship between seed development, Arabinogalactan-proteins (AGPS) and the AGP mediated promotion of somatic embryogenesis. *Physiologia Plantarum*, *114*(4), 637–644. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.2002.1140418.x>
- Veloso, V. H. S., Ribeiro, L. M., Mercadante-Simões, M. O., & Nunes, Y. R. F. (2016). Cytological aspects of recalcitrance in dormant seeds of *Mauritia flexuosa* (Arecaceae).

-
- Acta Physiologiae Plantarum*, 38(7), 1–11.
- Venkatanarayana, G. (1957). On certain aspects of the development of the leaf of *Cocos nucifera* L. *Phytomorphology*, 7, 297–305.
- Verdeil, J. L., Hocher, V., Huet, C., Grosdemange, F., Escoute, J., Ferrière, N., & Nicole, M. (2001). Ultrastructural changes in coconut calli associated with the acquisition of embryogenic competence. *Annals of Botany*. <https://doi.org/10.1006/anbo.2001.1408>
- Verhertbruggen, Y., Marcus, S. E., Haeger, A., Ordaz-Ortiz, J. J., & Knox, J. P. (2009). An extended set of monoclonal antibodies to pectic homogalacturonan. *Carbohydrate Research*, 344(14), 1858–1862.
- Verma, G., Mishra, S., Sangwan, N., & Sharma, S. (2015). Reactive oxygen species mediate axis-cotyledon signaling to induce reserve mobilization during germination and seedling establishment in *Vigna radiata*. *Journal of Plant Physiology*, 184, 79–88.
- Vidal, B. de C. (1970). Dichroism in collagen bundles stained with Xylidine-Ponceau 2R. *Annales d'histochimie*, 15(4), 289–296.
- Wang, D., Yeats, T. H., Uluisik, S., Rose, J. K. C., & Seymour, G. B. (2018). Fruit softening: revisiting the role of pectin. *Trends in Plant Science*, 23(4), 302–310. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2018.01.006>
- Welsch, Ulrich, & Sobotta, J. (2008). *Histología* (U. Welsch (ed.)). Ed. Médica Panamericana.
- Werth, E. (1933). Distribution, origin and cultivation of the coconut palm. *Ber. Deutschen Bot. Ges.*, 51, 301–304.
- Willats, W. G. T., Knox, J. P., & Mikkelsen, J. D. (2006). Pectin: new insights into an old polymer are starting to gel. *Trends in Food Science & Technology*, 17(3), 97–104.
- Willats, W. G. T., McCartney, L., Mackie, W., & Knox, J. P. (2001). Pectin: Cell biology and prospects for functional analysis. *Plant Molecular Biology*, 47, 9–27. <https://doi.org/10.1023/A:1010662911148>
- Wolf, S., Hématy, K., & Höfte, H. (2012). Growth control and cell wall signaling in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 63, 381–407.
- Wolf, S., Mouille, G., & Pelloux, J. (2009). Homogalacturonan methyl-esterification and plant development. *Molecular Plant*, 2(5), 851–860. <https://doi.org/10.1093/mp/ssp066>
-

- Xiao, Y., Xu, P., Fan, H., Baudouin, L., Xia, W., Bocs, S., Xu, J., Li, Q., Guo, A., & Zhou, L. (2017). The genome draft of coconut (*Cocos nucifera*). *Gigascience*, 6(11), gix095.
- Xu, C., Zhao, L., Pan, X., & Šamaj, J. (2011). Developmental localization and methylesterification of pectin epitopes during somatic embryogenesis of banana (*Musa* spp. AAA). *PLoS One*, 6(8), e22992.
- Yang, Y., Iqbal, A., & Qadri, R. (2018). Breeding of coconut (*Cocos Nucifera* L.): The tree of life. In *Advances in Plant Breeding Strategies: Fruits* (pp. 673–725). Springer.
- Yoneda, A., Ito, T., Higaki, T., Kutsuna, N., Saito, T., Ishimizu, T., Osada, H., Hasezawa, S., Matsui, M., & Demura, T. (2010). Cobtorin target analysis reveals that pectin functions in the deposition of cellulose microfibrils in parallel with cortical microtubules. *The Plant Journal*, 64(4), 657–667.
- Zhang, D., & Zhang, B. (2020). Pectin drives cell wall morphogenesis without turgor pressure. *Trends in Plant Science*, 25(8), 719–722.
- Zienkiewicz, A., Zienkiewicz, K., Rejón, J. D., de Dios Alché, J., Castro, A. J., & Rodríguez-García, M. I. (2014). Olive seed protein bodies store degrading enzymes involved in mobilization of oil bodies. *Journal of Experimental Botany*, 65(1), 103–115.