



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

**EVALUACIÓN DE DIFERENTES ESTRATEGIAS
PARA INCREMENTAR LA EFICIENCIA DE LA
EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN *Cocos nucifera* L.**

Tesis que presenta

GUSTAVO ALBERTO RIVERA SOLÍS

En opción al título de

Doctor en Ciencias

(Ciencias Biológicas: Opción Biotecnología)

Mérida, Yucatán, México

2018

CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



Por medio de la presente hago constar que el trabajo de tesis de **Gustavo Alberto Rivera Solís**, titulado "**Evaluación de diferentes estrategias para incrementar la eficiencia de la embriogénesis somática en *Cocos nucifera* L.**", fue realizado en el Laboratorio de Cocotero de la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección del Dr. Carlos Mariano Oropeza Salín, dentro de la opción de Doctorado Después de Maestría, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente:



Dr. Manuel Martínez Estévez
Director de Docencia

Mérida, Yucatán, México, a 29 de junio de 2018.

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

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

Firma: _____

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'G. Rivera', written over a horizontal line. The signature is stylized and cursive.

M. en C. Gustavo Alberto Rivera Solís

Este trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán, y forma parte del proyecto titulado “Escalamiento del proceso de micropropagación de diferentes genotipos de cocotero resistentes al Amarillamiento Letal” (FOMIX-Yucatán No. 169886), bajo la dirección del Dr. Carlos Mariano Oropeza Salín.

AGRADECIMIENTOS

A mi asesor, el Dr. Carlos Mariano Oropeza Salín, por su guía académica, pero sobre todo por su calidad humana, el apoyo y la confianza depositada en mi persona.

A los integrantes de mi comité tutorial: Dr. Luis Alfonso Saénz Carbonell y Dr. Alfonso Azpeitia Morales, por sus valiosas aportaciones durante el desarrollo de este trabajo.

Al personal del Laboratorio de Cocotero del CICY: Dra. María Narváez Cab, Ing. Guillermo Rodríguez Martínez, Ing. José Luis Chan Rodríguez y al M. en C. Iván Córdova Lara, por todo su apoyo técnico durante la realización de los experimentos de este trabajo.

Al Centro de Investigación Científica de Yucatán, por la invaluable oportunidad de crecimiento profesional y realización personal al permitirme formar parte de su Posgrado en Ciencias Biológicas.

A mis compañeros y amigos del Laboratorio de Cocotero por siempre haberme brindado un ambiente laboral, por demás, agradable.

A Fomix-Yucatán, por el financiamiento al proyecto “Escalamiento del proceso de micropropagación de diferentes genotipos de cocotero resistentes al amarillamiento letal” (México, YUC-2011-C09-169886).

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por la beca de doctorado autorizada (No: 242979) para Gustavo Alberto Rivera Solís.

DEDICATORIAS

A ti Leonardo, siempre serás el dueño de mi primer pensamiento del día.

A mis padres, quienes son mi máximo ejemplo en la vida. Gracias por todo.

A mis abuelos Beatriz, Rosa y Renán, quienes siempre me han demostrado que la experiencia de la vida se transmite mejor con paciencia y una cálida sonrisa.

A mi hermano Rodrigo, cómplice de toda la infancia, y que junto con Shirley, Diego y Mau complementan de la mejor manera imaginable a mi familia.

A ti hijo, sí, otra vez a ti, porque además de ser el primero en mi lista, también eres el último. Porque el proyecto más importante de mi vida es que tú te sientas tan orgulloso de mí, como yo lo estoy de ti.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
1.1 Ubicación taxonómica de <i>Cocos nucifera</i>	2
1.2 Descripción botánica.....	3
1.3 Hábito y distribución.....	5
1.4 Importancia económica del cocotero.....	7
1.5 Propiedades y aprovechamiento.....	9
1.6 Cultivo del cocotero.....	12
1.7 Industria del coco.....	16
1.8 Productos con valor agregado.....	19
1.9 Problemas fitosanitarios.....	22
1.10 Necesidades y oportunidades.....	24
1.11 La situación actual y el impacto deseado.....	25
2. ANTECEDENTES GENERALES	27
2.1 La embriogénesis somática.....	27
2.2 El rol de las auxinas en la embriogénesis somática.....	28
2.2.1. Transportadores de entrada.....	29
2.2.2. Transportadores de salida.....	29
2.2.3. Regulación del transporte de auxinas.....	30
2.2.4. Rutas de transporte de auxinas durante la embriogénesis.....	31
2.2.5. Calcio y su interacción con las auxinas.....	34
2.2.7. Firmas de calcio.....	35
2.2.8. El efecto de Ca^{2+} sobre la embriogénesis somática.....	35
2.3 La micropropagación de cocotero.....	36

2.3.1. Detrás de la embriogénesis somática en cocotero	39
HIPÓTESIS	43
OBJETIVO GENERAL	44
OBJETIVOS PARTICULARES	44
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	45
CAPÍTULO I	47
EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL FLOROGLUCINOL SOBRE LA FRECUENCIA DE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA DE <i>Cocos nucifera</i> L.	47
1. INTRODUCCIÓN	47
2. MATERIALES Y MÉTODOS	51
2.1 Obtención de material biológico	51
2.2 Medio y condiciones de cultivo	52
2.3 Condiciones experimentales	52
3. RESULTADOS	53
4. DISCUSIÓN	55
CAPÍTULO II	57
EVALUACIÓN DEL EFECTO DE UN PRETRATAMIENTO CON 2,4-D (300µM) SOBRE LA MULTIPLICACIÓN DE CALLO EMBRIOGÉNICO DE <i>Cocos nucifera</i> L.	57
1. INTRODUCCIÓN	57
2. MATERIALES Y MÉTODOS	60
2.1 Obtención de material biológico:	60
Medio y condiciones de cultivo	60
2.2 Condiciones experimentales:	61
Histología.....	61

3.	RESULTADOS	64
4.	DISCUSIÓN	73
CAPÍTULO III		75
ADDITION OF IONOPHORE A23187 INCREASES THE EFFICIENCY OF <i>Coccoloba nucifera</i> SOMATIC EMBRYOGENESIS		75
1.	ABSTRACT	76
2.	INTRODUCTION	76
3.	METHODS	79
3.1	Plant material	79
3.2	Culture media and culture conditions	79
3.3	Ionophore A23187 trials	80
3.4	Histology	81
3.5	Photographic documentation	81
3.6	Statistical Analysis	82
3.7	TaqMan/Real-Time PCR assay	82
4.	RESULTS	83
4.1	Embryogenic callus formation	83
4.2	Embryogenic structure formation	89
4.3	Formation of somatic embryos and plantlet regeneration	90
4.4	<i>CnSERK</i> expression	93
5.	DISCUSSION	94

CAPÍTULO IV	99
DISCUSIÓN GENERAL, CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	99
4.1 DISCUSION GENERAL	99
4.2 CONCLUSIONES	103
4.3 PERSPECTIVAS	104

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1.1. Características generales de la especie de estudio (*Cocos nucifera* L.)..... 3

Figura 1.2. Mapa de distribución de Cocotero (Tomado de www.redd.it.com, 2018)..... 6

Figura 1.3. Estadística anual de los 10 países con mayor producción de nuez de coco en 2016. 7

Figura 1.4. Principales países exportadores (A) e importadores (B) de nuez de coco a nivel mundial durante el 2016. 8

Figura 1.5. Participación histórica (1993-2013) de México en el mercado internacional como productor de nuez de coco..... 9

Figura 1.6. Distribución mundial de la producción de nuez de coco (FAO 2016)..... 15

Figura 1.7. Comparación histórica del rendimiento obtenido en los 3 principales productores de nuez de coco, contra la de Brasil y México (FAO 2016). 16

Figura 1.8. Estados de la República Mexicana que aportan a la producción de coco (Modificado de CONACOCO 2012) 18

Figura 1.9. Productos derivados del cocotero que se han logrado colocar de manera exitosa en el mercado. (A) agua de coco embotellada, (B) aceite extravirgen de coco, (C) productos preparados con leche de coco, (D) azúcar de coco, (E) aditivos para motores diesel, (F) autopartes manufacturadas con fibra de coco. 21

Figura 1.10. Sintomatología asociada al ALC. (A) caída prematura de los frutos; (B) necrosis de las inflorescencias; (C) muerte de flores y ausencia de nuevos frutos; (D) amarillamiento de las hojas más viejas; (E) Amarillamiento progresivo hacia las hojas más jóvenes; (F) Secamiento y pudrición de las hojas afectadas; (G) Troncos “desnudos” como remanentes de las palmas muertas por ALC. Figura diseñada por el Dr. Carlos Mariano Oropeza Salín. 23

Figura 1.11. Mapa de la distribución del ALC en el continente americano..... 24

Figura 1.12. Representación esquemática del proceso de formación del embrión somático en comparación con la formación del embrión cigótico..... 28

Figura 1.13. Patrones del transporte de auxinas a través de la membrana plasmática (A) y la expresión génica regulada por las auxinas (B) (Petrásêk and Friml 2009). 31

Figura 1.14. Gradientes de la concentración de auxina y sus transportadores durante la embriogénesis (Petrásêk and Friml 2009)..... 33

Figura 1.15. Representación de comportamiento teórico de las firmas de calcio (Tomado de www.lancaster.ac.uk)..... 35

Figura 1.16. Representación esquemática del protocolo actualmente utilizado para la micropropagación vía embriogénesis somática indirecta de *Cocotero* en el CICY.... 38

Figura 1.17. Representación esquemática de los cambios que ocurren durante la formación de callo embriogénico de *Cocos nucifera* L.(Sáenz *et al.*, 2006) 39

Figura 1.18. Expresión relativa de CnSERK en diferentes tejidos de cocotero in vitro (Pérez-Núñez *et al.*, 2009)..... 41

Figura 1.19. Estrategia experimental propuesta para el desarrollo de este trabajo. 45

Figura 2.1. Estructura química del 1, 3, 5 trihidroxibenceno (floroglucinol)..... 47

Figura 2.2. Rutas metabólicas para la degradación del ácido indol acético (AIA), (Buchanan *et al.*, 2000),..... 49

Figura 2.3. Ruta metabólica para la degradación de 2,4-D (Young and Turnbull 2017)... 50

Figura 3.1. Representación esquemática de los cambios que ocurren durante la formación de callo embriogénico de *Cocos nucifera* L. (Sáenz *et al.*, 2006). 59

- Figura 3.2.** Diferentes etapas de desarrollo durante la formación de callos embriogénicos derivados de explantes de estructuras embriogénicas, a los 0, 30 y 60 días de cultivo (A); y después de 90 días (B) comparando los dos tratamientos (Modificado de Rivera-Solís *et al* 2018?) 65
- Figura 3.3.** Cortes histológicos de callos embriogénicos obtenidos después de 90 días en cultivo sin (A) y con subcultivo en medio fresco con la mitad de la concentración de 2,4-D (B); la amplificación correspondiente (40X), de las áreas señaladas en recuadros son mostradas en (C) y (D); EE: Estructuras embriogénicas, ES: Embrión somático 68
- Figura 3.4.** Imagen comparativa de desarrollo posterior a la germinación entre el grupo testigo (A) y el tratamiento con subcultivo en 2,4-D [0.5]. 71
- Figura 3.5.** Perfiles de expresión relativa de CnSERK durante el desarrollo de callo embriogénico, a partir de estructuras embriogénicas de *Cocos nucifera*, con y sin subcultivo en medio fresco con la mitad de la concentración inicial de 2,4-D. Los datos presentados son el promedio de 3 muestras empleadas por triplicado (n=9) y fueron analizados con una ANOVA $p \leq 0.05$. Las barras marcadas con letras distintas son estadísticamente significativas de acuerdo a la prueba de Tukey. 72
- Figure 4.1.** Alignment of sequences reported at GenBank with the highest identity percentage to CnSERK. The region between the nucleotides on position 230 and 241 was used to design the corresponding TaqMan probe for CnSERK. The red marked sequence corresponds to *Cocos nucifera* SERK gene and it is aligned to the top 9 sequences closest in homology reported at the GeneBank. Shaded letters represents highly (black) and moderately (gray) conserved nitrogenous bases; Non-shaded letters represents non-conserved bases. 82
- Figure 4.2.** Developmental stages during embryogenic callus formation from embryogenic structures explants (A) after 30, 60 days; (B) fully formed embryogenic calli formed at day 90 of culture without (Control) and with 1 μ M ionophore A23187; and (C) corresponding globular somatic embryos. TS: translucent structures. ES: embryogenic structures. SE: somatic embryos. 85

- Figure 4.3.** Effect of treatment of embryogenic structures explants with ionophore A23187 (0, 1 μ M, 5 μ M and 10 μ M) on the rate of embryogenic callus formation. Different letters represent statistical differences among groups. 88
- Figure 4.4.** Histological sections of embryogenic calli obtained after 90 days of culture without (A) and with 1 μ M ionophore A23187 treatment (B); and corresponding magnified areas (40x) within squares shown in (C) and (D). ES: embryogenic structures..... 90
- Figure 4.5.** Post-germinative development within 2 months of culture in ionophore-free medium 4. (A) Tissues were previously cultured in ionophore-free media. (B) Tissues were previously cultured in 1 μ M ionophore A23187-containing medium 1 (calli induction) and medium 2 (embryo formation), and ionophore-free medium 3 (embryo germination)..... 92
- Figure 4.6.** Relative expression profiles of CnSERK during embryogenic callus development from of *Cocos nucifera* embryogenic structure explants with and without 1 μ M ionophore A23187 treatment..... 93

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1.1. Usos del cocotero en la medicina tradicional alrededor del mundo (Modificado de Ross 2005) 10

Cuadro 1.2. Listado mundial de los principales cultivos de acuerdo al área cosechada(A), su producción (B) y rendimiento (C)..... 13

Cuadro 1.3. Área asignada al cultivo de cocotero en los diez mayores países productores de nuez de coco. 14

Cuadro 1.4. Valor en el mercado internacional de algunos de los productos obtenidos a partir de *C. nucifera*. Datos publicados en línea por APCC, 2018 (25 de abril de 2018). 17

Cuadro 1.5. Situación de las plantaciones de cocotero en México (SIAP 2012)..... 19

Cuadro 1. 6. Comparación de la información nutrimental de dos presentaciones de agua de coco embotellada contra una bebida deportiva comercial. 20

Cuadro 1.7. Resumen histórico de los avances alcanzados para para el cultivo *in vitro* de *Cocotero*. 37

Cuadro 1.8. Resumen histórico de las estrategias evaluadas para incrementar la eficiencia de la embriogénesis somática en *Cocotero* y otros cultivos de interés comercial. 42

Cuadro 2.1. Resumen de la respuesta exhibida por el material sometido a las condiciones experimentales para evaluar el efecto del floriglucinol después de 60 días.....63

Cuadro 2.2. Efecto de la concentración de floriglucinol (90 días) sobre la formación de callo embriogénico y la oxidación observada en el tejido. 54

Cuadro 3.1. Efecto del subcultivo de callos embriogénicos en un medio fresco con la mitad de la concentración de 2,4-D del medio inicial, sobre la frecuencia de formación de callo embriogénico y el número de estructuras embriogénicas formadas sobre cada callo. 67

Cuadro 3.2. Efecto del subcultivo de callos embriogénicos en un medio fresco con la mitad de la concentración de 2,4-D del medio inicial, sobre la frecuencia de formación de callo embriogénico y el número de estructuras embriogénicas formadas sobre cada callo. 67

Cuadro 3.3. Efecto del subcultivo en 2,4-D [0.5] sobre el número de embriones somáticos generados por callo. 69

Cuadro 3.4. Efecto del subcultivo en 2,4-D [0.5] sobre el número de embriones somáticos generados por callo y el número de brotes obtenidos por callo. Los callos fueron cultivados por 2 meses en medio para la formación de embriones y posteriormente en medio para el desarrollo de brotes durante 2 meses. 70

Cuadro 3.5. Cálculo teórico del potencial para incrementar la eficiencia del protocolo de micropropagación de cocotero cuando se incluye un subcultivo en medio I modificado. 74

Table 4.1. Effect of different treatments combining calcium with ionophore A23187 on the formation of embryogenic callus from embryogenic structure explants cultured for three month in medium 1. 87

Table 4.2. Effect of treatment of embryogenic structure explants with ionophore A23187 on the frequency of the formation of embryogenic callus and the number of embryogenic structures formed per callus during a three month culture in medium 1. 89

Table 4.3. Effect of treatment of embryogenic callus with ionophore A23187 on the number of somatic embryos per callus and the number of shoots per callus. Ionophore

LISTADO DE CUADROS

A23187 was included in medium 2 (for embryo formation), but not in medium 3 and 4 (for embryo germination and plantlet development, respectively).....	91
Cuadro 5.1. Cálculo teórico del potencial para incrementar la eficiencia del protocolo de micropropagación de cocotero cuando los callos embriogénicos son expuestos al ionóforo A23187 (1 μ M).....	101

LISTADO DE ABREVIATURAS

ALC	Amarillamiento Letal del Cocotero.
Sr16	16S rDNA group-subgroup.
2,4-D	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético.
6-BAP	6-Bencilaminopurina.
CnSERK	<i>Cocos nucifera</i> Somatic Embryogenesis Receptor Kinase.
PPFD	Photosynthetic Photon Flux Density.
GA³	Ácido giberélico.
MXPT	Mexican Pacific Tall.
qRT-PCR	Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction.

RESUMEN

Ante la creciente relevancia económica del cocotero, se ha identificado la urgente necesidad mundial por replantar las áreas dedicadas a su cultivo, sin embargo, la propagación tradicional no es lo suficientemente eficiente para satisfacer esta demanda. La micropropagación vía embriogénesis somática es una alternativa viable y se han logrado avances importantes, No obstante, es necesario incrementar su eficiencia.

En este estudio se reporta el efecto de la adición de floroglucinol al medio de cultivo, un subcultivo en medio fresco adicionado con la mitad de la concentración de 2,4-D, y tratamientos con el ionóforo A23187 para promover la embriogénesis somática.

Los resultados revelan el potencial de dos de las estrategias propuestas, para incrementar la eficiencia del protocolo.

Estos tratamientos también generaron un cambio en el patrón de expresión del gen CnSERK durante la formación de callo embriogénico.

En consecuencia, se propone que, si dichos tratamientos se acoplan a la multiplicación de callo embriogénico, éstos podrían representar una mejora muy importante en la eficiencia del protocolo de micropropagación de cocotero.

ABSTRACT

As the economic importance of the coconut tree is growing, the urgent global need to replant the areas dedicated to its cultivation has been identified; however, the traditional propagation is not efficient enough to satisfy this demand. Micropropagation via somatic embryogenesis is a viable alternative and important advances have been made. Nevertheless, it is necessary to increase its efficiency.

In this study we report the effect of the addition of phloroglucinol to the culture medium, a subculture in fresh medium added with half the concentration of 2,4-D, and treatments with the ionophore A23187 to promote somatic embryogenesis.

The results reveal the potential of two of the proposed strategies to increase the efficiency of the protocol.

These treatments also generated a change in the expression pattern of the CnSERK gene during the formation of embryogenic callus.

Consequently, it is proposed that, if these treatments are coupled with the multiplication of embryogenic callus, these could represent a very important improvement in the efficiency of the coconut micropropagation protocol.

INTRODUCCIÓN

Cocos nucifera L., conocida comúnmente como palma de coco o cocotero, es tal vez una de las especies tropicales mejor reconocidas en el mundo por su valioso aporte como componente ornamental para el paisaje paradisiaco de los destinos turísticos de playa. Además, el aprovechamiento integral de todas sus partes le confieren una alta importancia económica y social a escala global ya que de ella se obtienen diversos beneficios ecológicos, económicos y culturales. Por todo ello es que en más de una ocasión se le ha denominado como “el árbol de la vida”. Sin embargo, la incidencia de enfermedades, principalmente el Amarillamiento Letal del Cocotero (ALC), en conjunción con la falta de planificación para renovar las plantaciones de cocotero, han derivado en la dramática disminución tanto de área destinada al cultivo de cocotero, como de la productividad de cada hectárea destinada a dicha labor.

En consecuencia, se ha identificado la necesidad por desarrollar estrategias que permitan revertir el panorama previamente descrito y en este sentido el desarrollo de tecnología altamente eficiente para la propagación de cocotero resulta apremiante.

Actualmente se cuenta con un protocolo para embriogénesis somática indirecta y regeneración de plantas de cocotero (Chan *et al.*, 1998), que resulta ampliamente confiable y que ha sido mejorado valiéndose de la multiplicación de callo embriogénico y la embriogénesis somática secundaria (Pérez-Núñez *et al.*, 2006). Con base en dicho desarrollo tecnológico se ha establecido una biofábrica dentro del Parque Científico y Tecnológico de Yucatán, la cual cuenta con una capacidad para producir 200,000 plantas anuales. Sin embargo, para satisfacer la demanda actual del mercado es necesario incrementar su capacidad de producción anual.

Por lo tanto, el objetivo del trabajo presentado en las páginas siguientes ha sido evaluar el potencial de diferentes estrategias para incrementar la eficiencia del protocolo de micropropagación vía embriogénesis somática de Cocotero que se realiza rutinariamente en las instalaciones del Centro de Investigación Científica de Yucatán

1.1 Ubicación taxonómica de *Cocos nucifera*

La ubicación sistemática de *Cocos nucifera* es la siguiente (Uhl and Dransfield 1987):

Reino: Plantae

Subreino: Tracheobionta

Superdivisión: Spermatophyta

Clase: Liliopsida

Subclase: Arecidae

Orden: Arecales

Familia: Arecaceae

Subfamilia: Arecoideae

Tribu: Cocoideae

Subtribu: Butinae

Género: *Cocos*

Especie: *Cocos nucifera* L.

1.2 Descripción botánica

La palma de coco es una especie monocotiledónea, monoica, perenne, leñosa, que se desarrolla como una planta alta con un penacho de hojas pinnadas y un solo tallo cilíndrico, el cual carece de corteza, ramificaciones y cambium secundario que a su vez pueda generar crecimiento secundario, que en términos botánicos se llama estipe y que por lo tanto no puede ser considerado un árbol. Los individuos adultos de cocotero alcanzan los 20-22 metros de altura, así como los 8-9 metros de diámetro en la copa (Figura 1.1) (Ohler 1999).

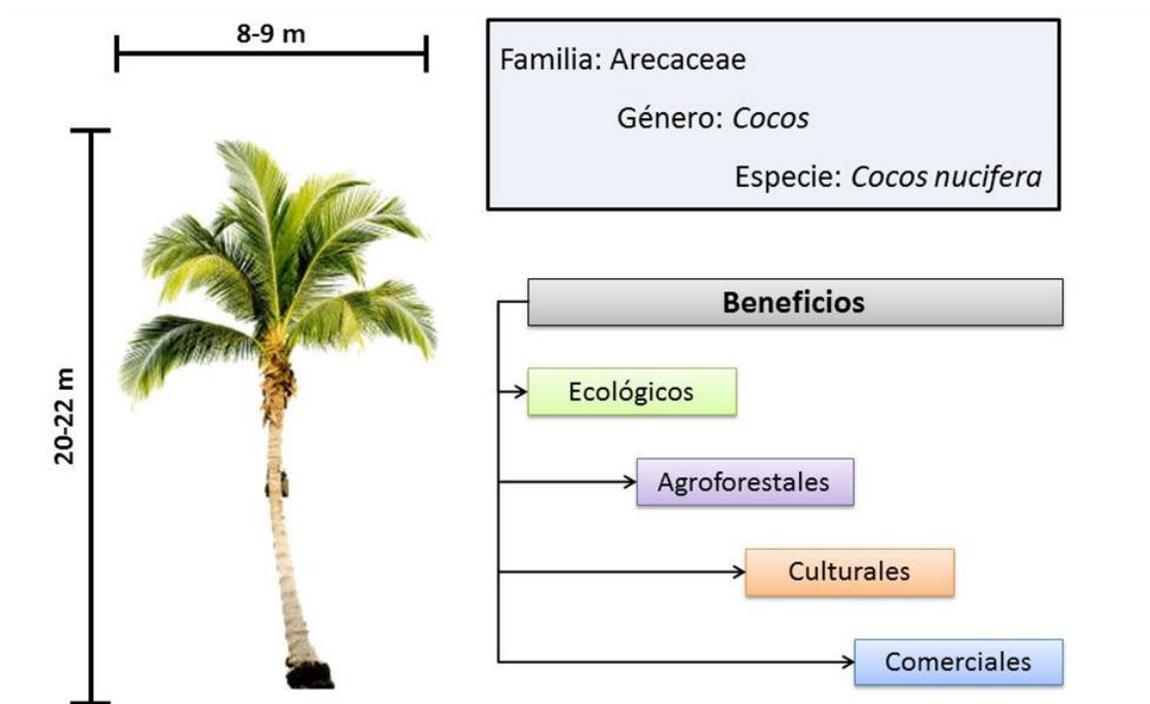


Figura 1.1. Características generales de la especie de estudio (*Cocos nucifera* L.).

El tallo es columnar, recto o inclinado, alcanza de 10 a 20 metros de altura y de 20.3 a 60.9 cm de diámetro, siendo la base la parte más ancha, estrechándose hacia la parte superior. En toda su longitud muestra las cicatrices de las hojas que han ido cayendo y es coronado por varios verticilos de hoja en forma de penacho. En el ápice presenta un grupo de hojas que protegen el único punto de crecimiento o yema terminal que posee

tejido meristemático. El crecimiento en altura depende de las condiciones ecológicas, de la edad de la planta y del tipo de cocotero.

Las hojas son pinnadas y miden de 1.5 a hasta 5.5 m de largo y 1.8 m de ancho, con foliolos coráceos de 50-70 cm de longitud de color verde-amarillento y se encuentran agrupadas densamente en el ápice. Bajo condiciones ambientales favorables una planta adulta de crecimiento gigante emite entre 12 a 14 hojas por año, en cambio en enano puede emitir hasta 18 hojas en el mismo periodo. La copa no es muy amplia y se compone de hasta 30 hojas arqueadas.

En cada axila foliar, ubicadas bajo una bráctea llamada espata, existen inflorescencias paniculadas de hasta 70 cm de largo y racimos de nueces de coco en diferentes fases de desarrollo; el desarrollo de las inflorescencias dura de 3 a 4 meses; las flores son pequeñas, de color amarillo claro y aparecen aproximadamente después de 6 años de vida de la palma siendo su temporada de floración de noviembre a marzo.

La polinización puede ocurrir por anemofilia o por entomofilia. En los cocoteros gigantes las flores masculinas se abren antes que las femeninas estén receptivas, lo cual contribuye a la polinización cruzada. En el caso de los cocoteros enanos es simultánea, por tanto hay un porcentaje alto de autofecundación.

El fruto es una drupa de forma ovoide que alcanza a medir hasta 38 cm de largo por 30.5 cm de ancho, pudiendo llegar a pesar hasta 2.5 kilogramos. Se compone por un exocarpo fibroso de 4-5 cm de espesor con una cáscara externa amarillenta adherida fuertemente a la nuez, un mesocarpo con fibras más finas y un endocarpo duro que posee 3 orificios próximos, en disposición triangular, situados en el ápice, dos cerrados y el tercero frente a la raicilla del embrión, siendo este último vulnerable a una pequeña presión, por lo que podría derramarse el agua (endospermo líquido) antes de romper la cáscara del fruto. Por su parte, la nuez llega a medir de 15 a 20 cm de diámetro y de 25 a 30 cm de largo (Woodroof 1979; Phillips 1994). Al interior de la nuez se localiza el endospermo sólido, que es una pulpa blanca comestible, que a su vez contiene en su cavidad central al endospermo líquido, conocido como agua de coco. Los frutos tardan en madurar hasta 13 meses.

El sistema radicular es fasciculado. Las raíces primarias son encargadas de la fijación de la planta y de la absorción de agua. Las raíces terciarias derivan de las secundarias y son las verdaderas extractoras de nutrientes. Las raíces activas se localizan en un radio de dos metros del tronco, a una profundidad de entre 0.2 a 0.8 metros, dependiendo de la profundidad efectiva.

Para su germinación, los cocos frescos de la planta se encierran hasta la mitad con las cascara en un suelo húmedo. Si se mantiene una humedad constante estos comienzan a brotar en dos o tres meses, siendo al principio su crecimiento bastante lento hasta después de la maduración de la palma.

1.3 Hábito y distribución

La palma de coco crece a lo largo de las costas arenosas y en la mayoría de las regiones subtropicales que se caracterizan por climas tropicales cálidos y muy húmedos, con una temperatura anual promedio de entre 27 y 35°C y poca variación diurna, una precipitación anual que varía entre los 1000 y 5000 mm aunque un rango entre 1200 y los 2300 mm es recomendable para las plantaciones productivas ya que si bien esta especie es capaz de tolerar precipitaciones de hasta 5000mm y temporadas secas de hasta 5-6 meses, la producción de fruta se podría ver afectada por dichas condiciones, incluso varios años después (Parrotta 1993).

En consecuencia, la palma de coco presenta una distribución pantropical (Figura 1.2), en otras palabras, puede ser encontrada a lo largo de la costa de casi todos los países ubicados en la franja comprendida entre los Trópicos de Cáncer y de Capricornio (Ohler 1999).

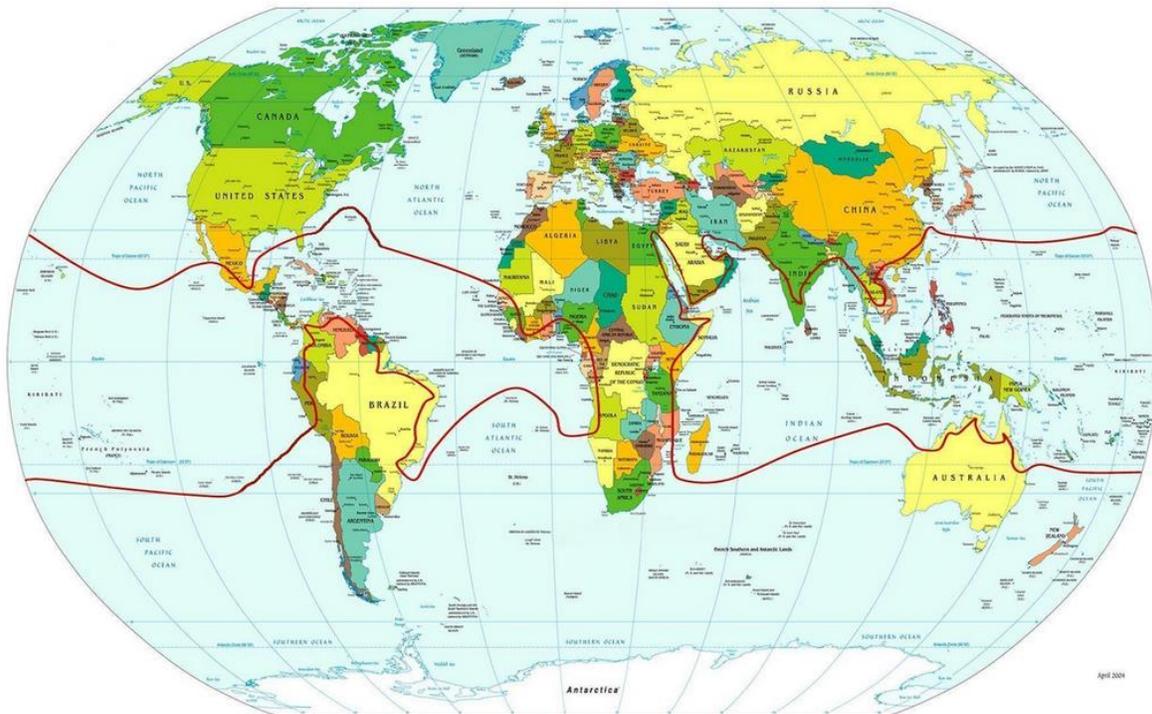


Figura 1.2. Mapa de distribución de Cocotero (Tomado de www.reddit.com, 2018).

1.4 Importancia económica del cocotero

El cocotero es de relevancia económica en aproximadamente 90 países que cultivan más de 12 millones de hectáreas con esta especie (Solís-Ramos *et al.*, 2012), entre los cuales podemos encontrar a México como el 8° productor de nuez de coco a nivel mundial (Figura 1.3).

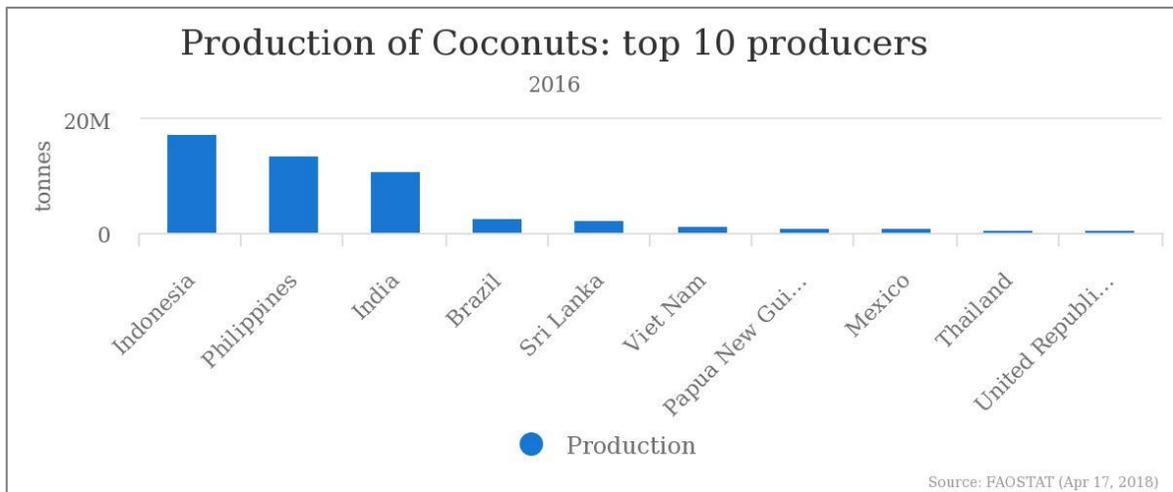


Figura 1.3. Estadística anual de los 10 países con mayor producción de nuez de coco en 2016.

Además, en el mercado internacional, la nuez de coco se comercializa de manera por demás importante, siendo China el principal importador, mientras que Indonesia y Viet Nam son los mayores exportadores (Figura 1.4).

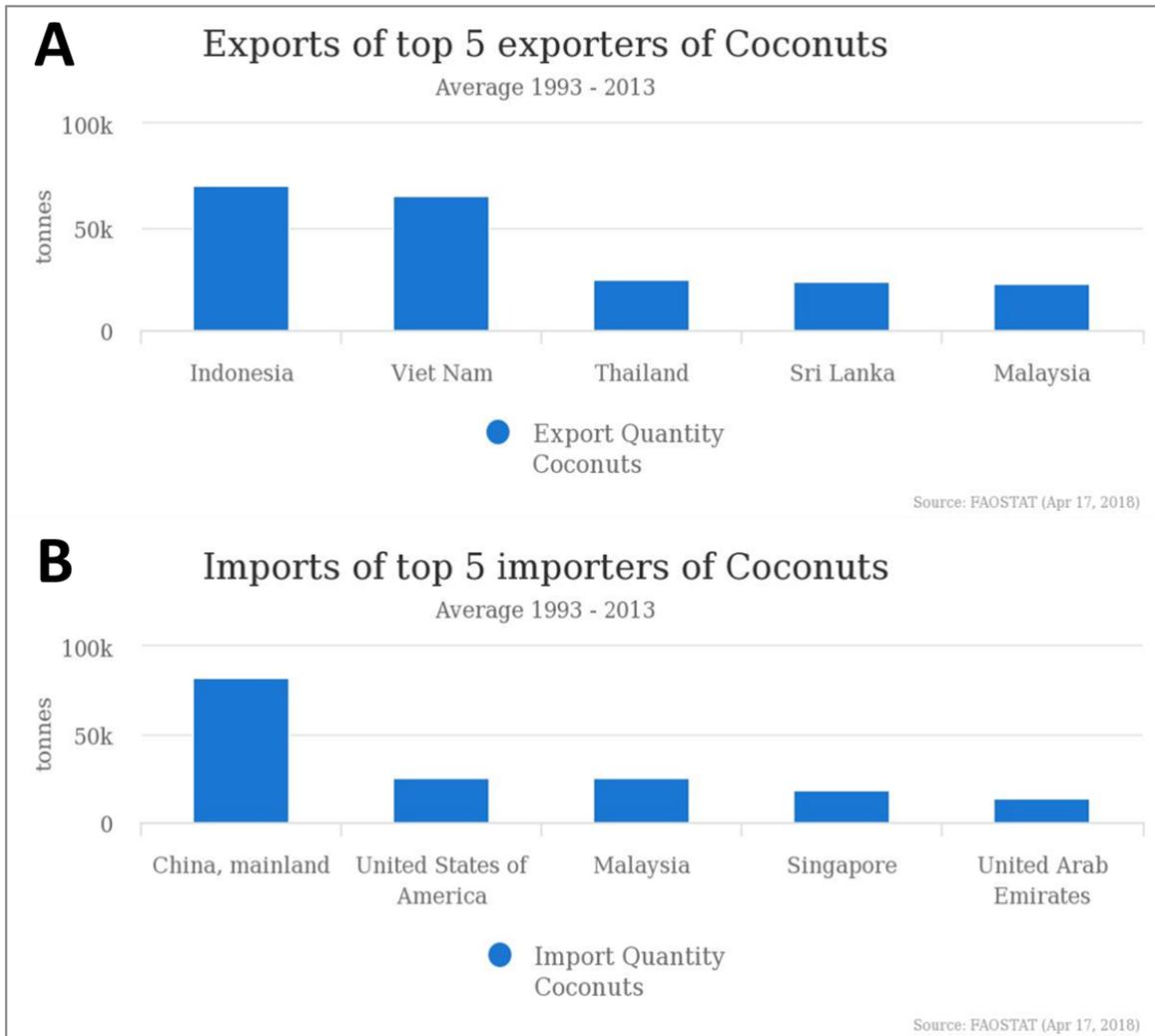


Figura 1.4. Principales países exportadores (A) e importadores (B) de nuez de coco a nivel mundial durante el 2016.

Por su parte México ha sido históricamente un país exportador de nuez de coco y para el año 2013 se exportaron cerca de 15,000 toneladas (Figura 1.5).

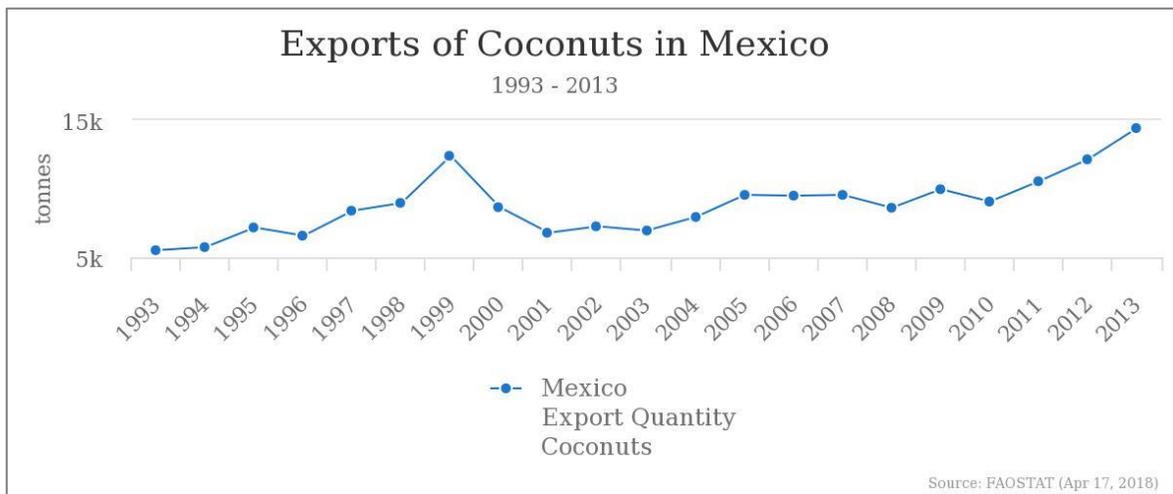


Figura 1.5. Participación histórica (1993-2013) de México en el mercado internacional como productor de nuez de coco.

1.5 Propiedades y aprovechamiento

El cocotero es la fuente de más de 100 productos, entre los que podemos enlistar aceites alimenticios e industriales, alimentos, bebidas, golosinas, fibras textiles, azúcar, materiales de construcción, abrasivos, combustibles, absorbentes de gases y de otros productos que utilizan millones de personas. Además de subproductos como la pasta resultante tras la extracción del aceite, que constituye un importante producto para la alimentación de ganado bovino y porcino (Sistema Producto Palma de Coco 2012).

Siendo los de mayor relevancia en el mercado internacional: la copra, el aceite de coco, la fibra de coco, el carbón virgen y activado, la harina y la leche de coco (CONACOCO 2008).

Además, el cocotero es una planta de importancia en la medicina tradicional y se ha reportado una variedad de propiedades que han sido aprovechadas por diferentes culturas como se enlista en el

Cuadro 1.1:

INTRODUCCIÓN

Cuadro 1.1. Usos del cocotero en la medicina tradicional alrededor del mundo (modificado de Ross, 2005).

Padecimiento	Parte de la Palma	Preparación	País
Diarrea	Raíz	Masticable	Papúa Nueva Guinea
Diarrea	Hojas jóvenes	Masticable	Papúa Nueva Guinea
	Fibra	Decocción	Brasil
	Leche de coco	Bebible	Ghana
Artritis	Fibra	Decocción	Brasil
Fracturas y esguinces	Endospermo rallado	Extracto acuoso	Australia
Infección ótica	Aceite	Ungüento	Australia
Filariasis	Partes secas de palma	Extracto acuoso	Australia
Laxante	Endospermo fresco	Crema ingerible	Australia
Esterilidad	Endospermo fresco	Infusión	Ecuador
Alopecia	Aceite	Ungüento	Fiji
Dolor de oído	Aceite	Ungüento	Fiji
Problemas de riñón	Agua	Bebible	Fiji
Fiebre	Extracto de fruto seco	Bebible	Guatemala
Fiebre	Infusión de raíz	Bebible	Indonesia
Inflamación renal	Extracto de fruto seco	Bebible	Guatemala
Lesiones cutáneas	Extracto de fruto seco	Aplicación externa	Guatemala

INTRODUCCIÓN

Lesiones cutáneas	Aceite de coco	Ungüento	Indonesia
Amenorrea	Decocción del pericarpio seco	Bebible	Haití
Amenorrea	Infusión de inflorescencia	Bebible	India
	Infusión de raíz	Bebible	Trinidad y Tobago
Quemaduras	Aceite	Ungüento	Haití
Asma	Extracto acuoso del fruto	Bebible	Hawaii
Impotencia sexual	Fruto	Ingerible	India, Mozambique
Envenenamiento	Leche de coco	Bebible	Indonesia
Anticonceptivo	Leche de coco	Bebible	Indonesia
Gonorrea	Flores frescas maceradas	Oral	Indonesia
Diabetes	Infusión de concha seca	Oral	Jamaica
Desorden menstrual	Jugo de fruto	Oral	Polinesia Francesa
Riesgo de aborto	Leche de coco con clara de huevo	Oral	México
Tumores (alivio)	Fruto	Ingerible	Mozambique
Dolor de estómago	Raíz fresca	Oral	Papúa Nueva Guinea
Blenorragia	Fruto fresco	Oral	Perú
Asma	Fruto fresco	Oral	Perú
Retención de	Fruto fresco	Oral	Perú

líquidos

Cardiotónico	Fruto fresco	Oral	Tailandia
Neurotónico	Fruto fresco	Oral	Tailandia
Coágulos uterinos postparto	Infusión de copra	Oral	Tonga
Fatiga postparto	Jugo de raíz	Oral	Vanuatu

1.6 Cultivo del cocotero

A nivel mundial, el cocotero es el cultivo frutal al cual se destina la mayor extensión de tierra para su cultivo (Cuadro 1.2 A) con 12,168,804 hectáreas, sin embargo, cuando se registra la producción anual del cultivo, este cae de la posición 19 hasta la 25 (Cuadro 1.2 B), lo cual se explica por el relativamente bajo rendimiento (posición 76) que se obtiene actualmente del cultivo (Cuadro 1.2 B) . Es importante señalar que los tres mayores productores de coco (Indonesia, Filipinas y la India) acumulan el 72.1% de dicho territorio, superando de manera avasalladora al resto de los países productores (Cuadro 1.3).

Cuadro 1.2. Listado mundial de los principales cultivos de acuerdo al área cosechada(A), su producción (B) y rendimiento (C).

A #	Cultivo	Área cosechada (Ha)	B #	Cultivo	Producción (Ton)	C #	Cultivo	Rendimiento (Ton/Ha)
1	Trigo	220,107,551	1	Caña de azúcar	1,890,661,751	1	Champiñon	392.5141
2	Maíz	187,959,116	2	Maíz	1,060,107,470	2	Caña de azúcar	70.6148
3	Arroz	159,807,722	3	Trigo	749,460,077	3	Betabel	60.7314
4	Soya	121,532,432	4	Arroz	740,961,445	4	Pepino	37.5893
5	Cebada	46,923,218	5	Papa	376,826,967	5	Tomate	37.0168
6	Sorgo	44,771,056	6	Soya	334,894,085	6	Zanahoria	36.5455
7	Canola	33,708,547	7	Palma aceitera	300,252,193	7	Melón	33.366
8	Mijo	31,705,489	8	Betabel	277,230,790	8	Achicoria	32.9205
9	Algodón	30,206,843	9	Mandioca	277,102,564	9	Menta	31.3447
10	Frijol	29,392,817	10	Tomate	177,042,359	10	Papaya	29.529
11	Cacahuete	27,660,802	11	Cebada	141,277,993	11	Espinaca	28.9498
12	Caña de azúcar	26,774,304	12	Melón	117,022,560	12	Repollo	28.8117
13	Semilla de Girasol	26,205,337	13	Plátano	113,280,302	13	Berenjena	28.5891
14	Mandioca	23,482,052	14	Papa dulce	105,190,501	14	Toronja	25.2957
15	Palma aceitera	21,087,444	15	Cebolla	93,168,548	15	Piña	24.6528
16	Papas	19,246,462	16	Manzana	89,329,179	16	Fresa	22.6902
17	Chícharos	12,650,078	17	Pepino	80,616,692	17	Cebolla	22.57
18	Guisantes	12,316,878	18	Uvas	77,438,929	18	Lechuga	21.8893
19	Nuez de coco	12,168,804	19	Naranja	73,187,570	19	Plátano	20.6189
20	Caucho	11,447,872	20	Repollo	71,259,199	20	Papaya	19.579
21	Café	10,975,184	21	Canola	68,855,446	21	Coliflor	18.7847
22	Oliva	10,650,068	22	Batata	65,937,599	22	Naranja	18.4572
23	Ajonjolí	10,576,563	23	Algodón	65,391,535	23	Ajo	18.0915
24	Cacao	10,196,725	24	Sorgo	63,930,558			
25	Avena	9,433,141	25	Nuez de coco	59,010,635	76	Nuez de coco	4.8493

(FAO 2016)

Cuadro 1.3. Área asignada al cultivo de cocotero en los diez mayores países productores de nuez de coco.¹

País	Área mundial cosechada (Ha)	% del área cosechada	
Filipinas	3,565,059	29.3	
Indonesia	3,105,259	25.5	72.5
India	2,155,749	17.7	
Tanzania	732,189	6	
Sri Lanka	408,918	3.4	
Brasil	234,012	1.9	
Paúa Nueva Guinea	207,679	1.7	
México	183,637	1.5	
Tailandia	177,063	1.5	
Viet Nam	146,835	1.2	
Total mundial	12,168,799	100	

¹Tomado de la referencia FAO, 2016

Como se puede inferir a partir de los datos presentados en la Cuadro 1.3, la mayor parte de la producción se obtiene en la región sur de Asia y en las Islas del Pacífico, sin embargo, también existe una importante superficie cultivada en América y en menor medida en África, tal como se presenta a continuación en la Figura 1.6:

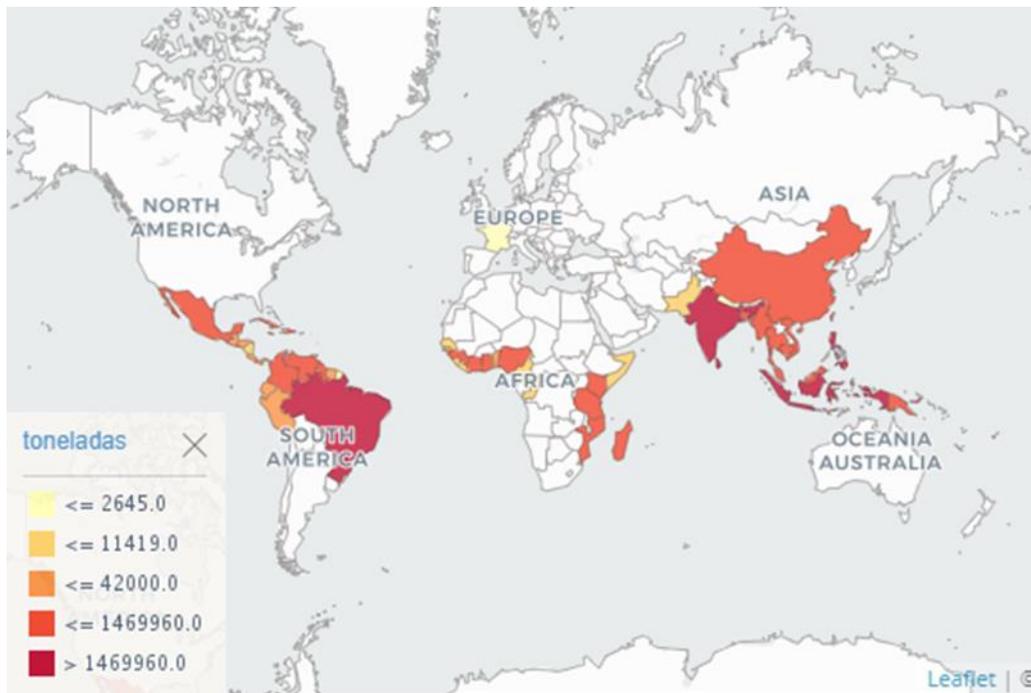


Figura 1.6. Distribución mundial de la producción de nuez de coco (FAO 2016).

Si bien, resulta evidente que los países que destinan mayor cantidad de terreno al cultivo de cocotero lideran también la producción de nuez de coco, es importante resaltar que Brasil compite a la par, en términos de producción, con Indonesia, Filipinas o India. Lo cual puede ser explicado por una mejor productividad obtenida en Brasil como se ve reflejado en los datos proporcionados por FAO (Figura 1.7).

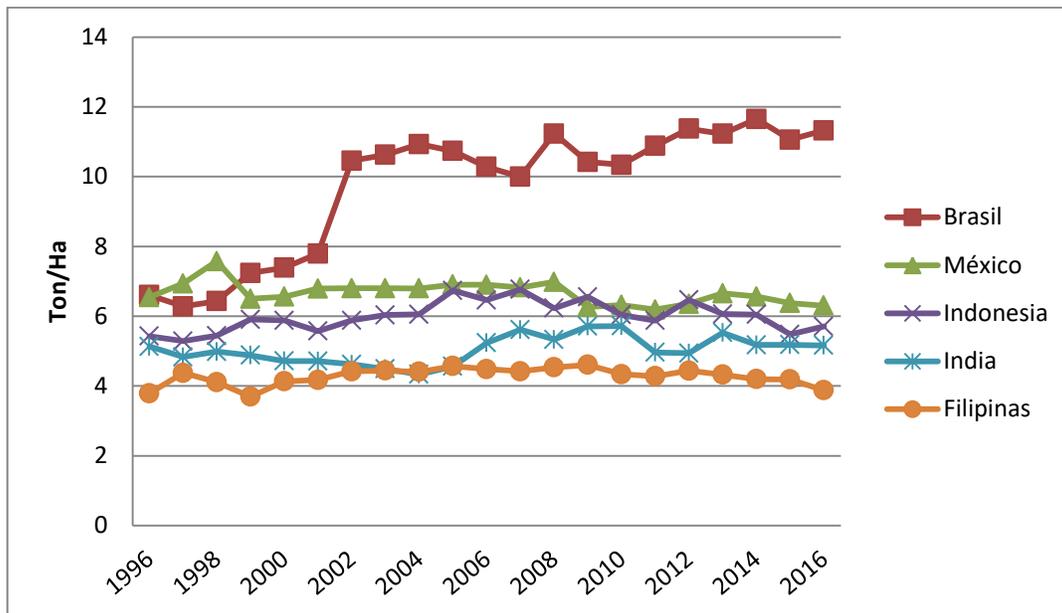


Figura 1.7. Comparación histórica del rendimiento obtenido en los tres principales productores de nuez de coco, contra la de Brasil y México (FAO, 2016).

1.7 Industria del coco

El mercado del coco se basa en un aprovechamiento integral que resulta muy rentable, y que aún a pesar de la crisis económica mundial desatada en 2008, ha exhibido un comportamiento estable y creciente. Para el 25 de abril de 2018, los precios (Cuadro 1.4) de algunos de los principales productos provenientes del cocotero (el valor del aceite de palma se presenta únicamente como referencia), según la Comunidad del Coco de Asia y el Pacífico, fueron los siguientes:

Cuadro 1.4. Valor en el mercado internacional de algunos de los productos obtenidos a partir de *C. nucifera*. Datos publicados en línea por APCC, 2018 (25 de abril de 2018).

Producto	Valor (USD)/Tonelada	
	Min	Máx
*Aceite de palma	623.00	2,401.00
Aceite de coco	1,107.00	3,035.00
Carbón	497.00	667.00
Coco deshidratado	1,452.00	3,680.00
Copra	610.82	1,990.26
Fibra de coco	207.00	1,274.00
Nuez de coco	174.00	613.00

*Producto obtenido de palma aceitera (IndexMundi, 2018; MPOC, 2018).

De manera particular, México cuenta con 145,456.59 hectáreas de cocotales (SIAP 2012) de las cuales aproximadamente 80,000 son productivas y se ubican en dos grandes regiones productoras de **coco (Figura 1.8)**: La del Golfo y el Caribe que incluye a los Estados de Tabasco, Veracruz, Campeche, Yucatán y Quintana Roo y la del Pacífico que incluye a los Estados de Guerrero, Colima, Oaxaca, Michoacán, Sinaloa, Jalisco y Chiapas. Para 2013, se reportaron \$3,200,000,000.00 MXN como el valor de la producción anual (CONACOCO 2015).



Figura 1.8. Estados de la República Mexicana que aportan a la producción de coco (Modificado de CONACOCO, 2012).

Sin embargo, de las 80,000 hectáreas productivas, solamente el 30% (24,000 hectáreas) se destinan a la producción de fruto, que es de donde se pueden obtener las mejores oportunidades de retorno económico y se estima que el valor de la producción nacional para el año 2006 alcanzó los \$1,150,000,000.00, con un crecimiento hasta los \$1,300,000,000.00 en 2007 (CONACOCO 2008), con un nuevo incremento para el 2011, alcanzando los \$1,501,763,830.00, aunque para el 2012 se reportó un valor de \$1,483,397,400.00 (Cuadro 1.5) (SIAP 2012).

Cuadro 1.5. Situación de las plantaciones de cocotero en México (SIAP 2012).

Producto	Superficie Cultivada (Has)	Producción (Ton)	Rendimiento (Ton/Has)	Precio medio rural (\$/Ton)	Valor de la producción (millones de \$)
Fruto	1,478.50	165,723.44	11.77	1,832.72	303,725.39
Copra	129,650.84	206,991.50	1.62	5,699.13	1,179,672.01
Σ	144,329.34	---	---	---	1,483,397.40

1.8 Productos con valor agregado

En años recientes se ha previsto que el agua de coco, debido a su contenido de hidratos de carbono, así como de iones de calcio, fósforo, sodio, potasio y magnesio (Cuadro 1. 6) podría competir en el mercado de las bebidas deportivas, el cual genera anualmente ganancias de 10,000 millones de dólares en los Estados Unidos de América. En consecuencia, las dos empresas que dominan el mercado mundial de las bebidas embotelladas han realizado inversiones en este producto: En el año 2007, PepsiCo ha comprado la empresa brasileña Amacoco y sus populares marcas Kero Coco y Trop Coco, que controlan la mayor parte de las ventas de agua de coco embotellada en Brasil; en consecuencia, el 1ero de septiembre de 2009, Coca-Cola Co. Adquirió el 20% de las acciones de la empresa embotelladora de agua de coco ZICO, por aproximadamente 15 millones de dólares.

Cuadro 1. 6. Comparación de la información nutrimental de dos presentaciones de agua de coco embotellada contra una bebida deportiva comercial.

Nutriente	Agua de coco* (ZICO, 2011)	Bebida deportiva* (Gatorade, 2011)	Mezcla de aguas de coco* (ZICO, 2011)
Energía	18 Kcal	25 Kcal	18 Kcal
Proteínas	0.3 g	0.0 g	0.0 g
Carbohidratos	4.54 g	6.25 g	3.93 g
Lípidos	0.0 g	0.0 g	0.0 g
Sodio	18.18 mg	45.83 mg	48.48 mg
Potasio	203 mg	13.33 mg	172,42 mg
Calcio	12.12 mg	--	8.18 mg
Fósforo	5.15 mg	--	9.09 mg
Magnesio	7.57 mg	--	10.60 mg

*Los valores proporcionados corresponden a una porción de 100 ml.

Por otra parte, se ha sugerido que la ingesta de ácido láurico (que es el precursor de la monolaurina y representa el 50% del contenido del aceite de coco y algunos otros productos derivados del cocotero), podría incrementar la producción endógena de monolaurina, la cual posee efectos bactericidas, antifúngicos y virucidas, incluso contra el VIH (Dayrit 2000; Lieberman *et al.*, 2006).

Además los productos derivados de cocotero e industrializados para incrementar su valor, han logrado apoderarse de nichos específicos en el mercado (Figura 1.9), entre los que podemos enlistar, además del agua embotellada y al aceite de coco, a productos a base

de leche de coco, azúcar de coco, coco-diesel, autopartes manufacturadas con fibra de coco, entre otros.

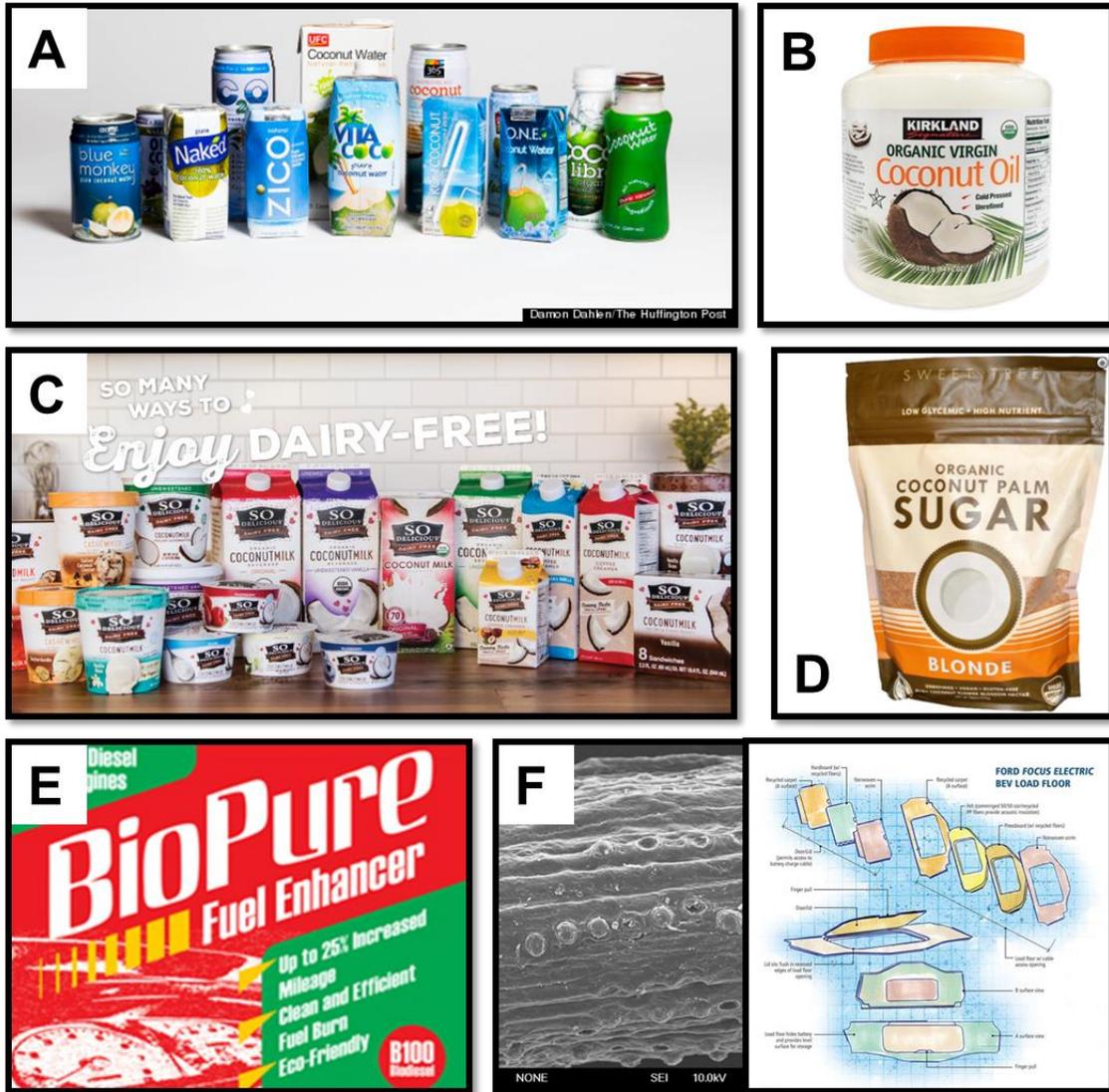


Figura 1.9. Productos derivados del cocotero que se han logrado colocar de manera exitosa en el mercado. (A) agua de coco embotellada, (B) aceite extravirgen de coco, (C) productos preparados con leche de coco, (D) azúcar de coco, (E) aditivos para motores diesel, (F) autopartes manufacturadas con fibra de coco.

1.9 Problemas fitosanitarios

Las plantaciones de cocotero enfrentan una compleja problemática ya que promedian una edad avanzada y además son afectadas por un conjunto de problemas fitosanitarios como el picudo del cocotero, el anillo rojo y el amarillamiento letal. Esta situación ha derivado en una reducción de la productividad (aproximadamente al 50%) y además aminora su potencial de propagación.

El picudo del cocotero (*Rhynchophorus palmarum*) es un coleóptero que durante su etapa larval excava túneles en las palmas de coco para alimentarse, causando un daño mecánico directo. Sin embargo, el daño más grave lo provoca de manera indirecta al fungir como vector del nemátodo *Rhadinaphelenchus cocophilus*, causante de la enfermedad del anillo rojo, la cual provoca en primera instancia, la caída prematura de los frutos y el amarillamiento de las hojas inferiores, las cuales posteriormente se tornan de un color café-marrón, iniciando en las puntas de las hojas viejas y en algunos casos, la corona de las hojas se desprende; sin embargo el síntoma característico de esta enfermedad, es la aparición de un anillo color anaranjado-rojizo de aproximadamente 3-5 cm de ancho, localizado a 4-6 cm de la periferia del tronco. En algunos casos, la decoloración se observa en los pecíolos de las hojas (Hagley 1963; Salas 1980; Oehlschlager *et al.*, 2002).

Sin embargo, el amarillamiento letal del cocotero (ALC) es la más importante de las enfermedades que atacan a *Cocotero* y es causado por el fitoplasma Sr16-IV, que se encuentra exclusivamente en el floema de varias especies de palmas, entre las que se incluye a la palma datilera (*Phoenix dactylifera*) y al cocotero (*Cocotero*), es transmitida utilizando como agente vector al homóptero *Haplaxius crudus* (previamente incluido en el género *Myndus*) y es capaz de causar la muerte de la planta infectada en un periodo de 3 a 6 meses. Los síntomas del ALC (Figura 1.10) se presentan como una serie de eventos progresivos que incluyen la caída prematura de frutos y su necrosis, la decoloración del follaje y la muerte del meristemo apical. La distribución actual (Figura 1.11) comprende las islas del Mar Caribe (Cuba, Jamaica, Haití, República Dominicana), en la costa caribeña de América Central y la Península de Yucatán, a lo largo del Golfo de México, desde Yucatán hasta Veracruz, en Florida y en la costa mexicana del Atlántico (Oropeza,

Datos no publicados) y es la principal causa, aunada al envejecimiento de las poblaciones, de la pérdida de más del 50% del área cultivada en México entre 1993 y 2008 (CONACOCO 2008). Se estima que el ALC ha acabado con cerca de 20,000 hectáreas de cocotero en México, puntualmente en la península de Yucatán y en la costa del Golfo de México, así como también en otros países de América Central y el Caribe (McCoy *et al.*, 1983; Maust *et al.*, 2003; Harrison and Elliott 2005).

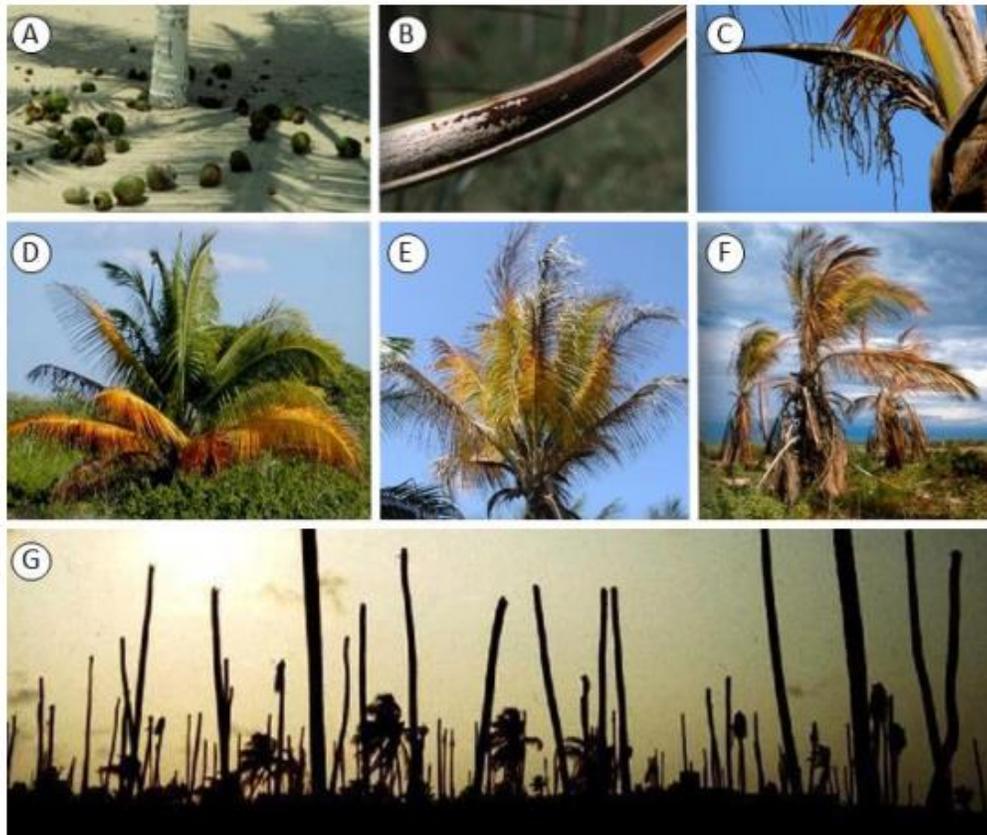


Figura 1.10. Sintomatología asociada al ALC. (A) caída prematura de los frutos; (B) necrosis de las inflorescencias; (C) muerte de flores y ausencia de nuevos frutos; (D) amarillamiento de las hojas más viejas; (E) Amarillamiento progresivo hacia las hojas más jóvenes; (F) Secamiento y pudrición de las hojas afectadas; (G) Troncos "desnudos" como remanentes de las palmas muertas por ALC. Figura diseñada por el Dr. Carlos Mariano Oropeza Salín.

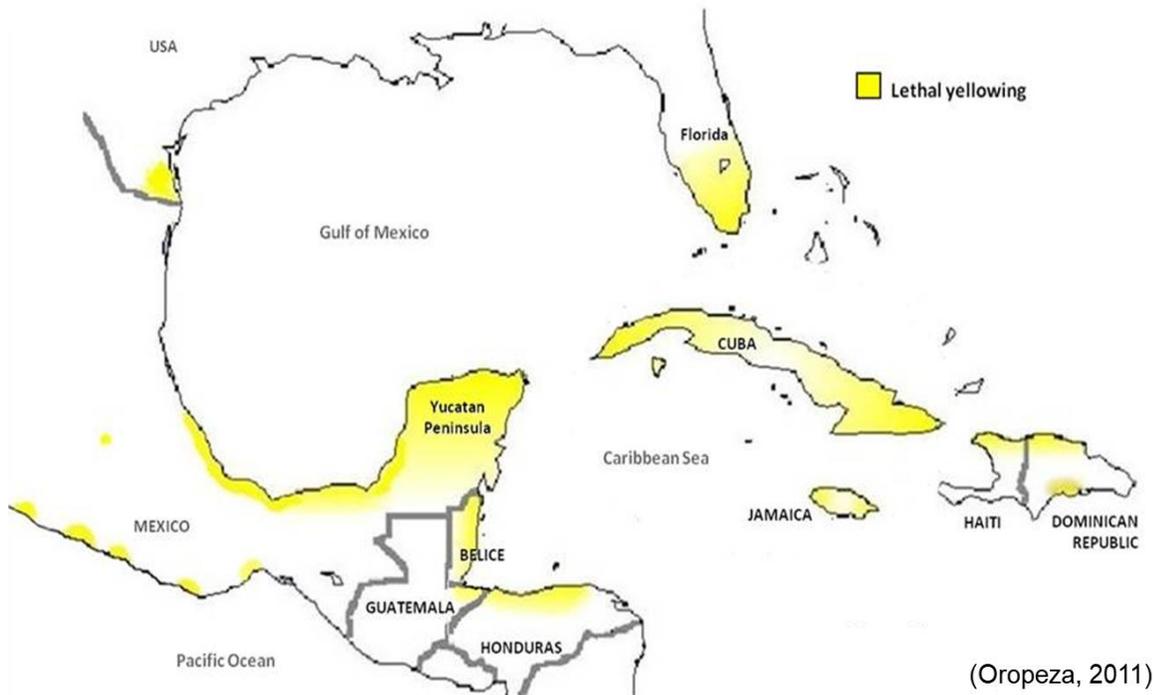


Figura 1.11. Mapa de la distribución del ALC en el continente americano.

1.10 Necesidades y oportunidades

Ante la situación descrita previamente, se ha identificado la necesidad de replantar los cultivos con individuos sobresalientes en términos de tolerancia y/o resistencia a enfermedades, así como también en términos de precocidad y productividad elevada y estable. Ya que Cocotero no se puede propagar a la velocidad requerida por medio de semilla, en la actualidad se considera que la micropropagación es la mejor alternativa para recuperar y establecer nuevas plantaciones, debido a que ofrece la posibilidad de obtener una multiplicación clonal de individuos con características deseables y además al ser compatible con la simplificación y automatización de procesos, es posible reducir de manera significativamente los costos de producción. Hasta el momento, la técnica más eficiente para la multiplicación *in vitro* de Cocotero es la embriogénesis somática, con lo cual existe la posibilidad, al menos teórica, de producir un número ilimitado de copias de

individuos élite en un periodo de tiempo corto y con poca mano de obra (Berthouly and Etienne 2005).

1.11 La situación actual y el impacto deseado

Actualmente, un productor mexicano promedio de coco, que cuenta con 3 hectáreas de cultivo, obtiene un margen de ganancia cercano a los \$3,500.00 al mes, lo cual resulta insuficiente para acumular el capital necesario para mejorar las condiciones de su plantación, por lo que bajo dichas circunstancias se genera un círculo vicioso que resulta importante abatir.

En el mercado actual se están abriendo paso los productos derivados de coco (principalmente agua y aceite de coco), siendo aquellos con mayor valor agregado los que representan las mejores oportunidades de negocio (p. ej.: agua de coco embotellada, aceite extra-virgen, sustitutos de lácteos a partir de coco, etc.), sin embargo, el grueso de la oferta de dichos productos se basa en importaciones.

En consecuencia, es necesario crear las condiciones en las que un productor nacional pueda volverse cada vez más competitivo para poder participar en el mercado y entre las medidas que se deben tomar para crear dicho escenario se pueden mencionar:

- a) Incrementar la densidad del cultivo, completando la cantidad de plantas contenidas por parcela.
- b) Renovar los individuos incluidos en las plantaciones ya que en su mayoría promedian edades avanzadas, lo que conlleva una caída en la productividad.
- c) Tecnificar las plantaciones, instalando sistemas de riego y establecer programas de fertilización adecuados.
- d) Incrementar el área de cultivo destinada a la producción de coco.

Para satisfacer las necesidades enumeradas con anterioridad, es necesario realizar una fuerte inversión económica, además de contar con la disponibilidad de millones de plantas ($\approx 8,000,000$ solamente para recuperar las plantaciones que se han perdido en

México a causa del ALC), lo cual no se puede lograr a la velocidad requerida por medio de la propagación por semilla. Sin embargo, la micropropagación puede jugar un papel determinante para el éxito de la producción de tal magnitud de plantas ya que permite la multiplicación masiva de individuos previamente seleccionados por caracteres de interés agronómico y/o ecológico en un periodo de tiempo relativamente breve.

La importancia de este cultivo, las oportunidades que ofrece el mercado actual y las proyecciones que se han trazado para el futuro próximo no han pasado desapercibidas y actualmente se está gestando una iniciativa en la que participan distintos sectores de la sociedad, incluyendo al Gobierno (SAGARPA y Diputados Federales a través de la Comisión Especial para Impulsar la Agroindustria del Coco y Productos Derivados), la Academia (INIFAP y CICY) y el sector productivo, la cual ha dado sus primeros grandes pasos a través de la construcción de una biofábrica de plántulas de cocotero producidas *in vitro*, ubicada en el Parque Científico Tecnológico de Yucatán, con una extensión de 600 m² y que tendrá una capacidad inicial para producir aproximadamente 200,000 plantas al año.

Es importante señalar que el establecimiento de la biofábrica tiene el potencial de impactar a nivel internacional en el mediano plazo puesto que países líderes en la producción de coco (Filipinas, India y Brasil) han mostrado interés por adquirir plántulas micropropagadas o licencias para explotar la tecnología desarrollada por el CICY.

Sin embargo, no se puede perder de vista la existencia de un riesgo potencial para el éxito de esta compleja iniciativa. La incidencia del AL en el continente africano se debe a la presencia de un grupo de fitoplasmas (Sr16-XXII) distinto a la que causa el AL en el continente americano (Sr16-IV) y los estudios hasta la fecha han revelado que los genotipos que se comportan como resistentes al ALC americano son susceptibles al ALC africano. Es por ello que se han empezado a realizar introducciones de híbridos africanos que han exhibido resistencia al AL en Costa de Marfil para poder lidiar con la posible llegada del fitoplasma Sr16-XXIII (Gurr *et al.*, 2016).

Finalmente, si las metas trazadas por esta iniciativa se alcanzaran con éxito, podrían acarrear beneficios importantes para los productores hasta triplicar (\approx \$10,500.00) sus ingresos por cada 3 hectáreas de cultivo, así como para el consumidor que podría contar

con productos nacionales compitiendo en el mercado, probablemente a mejor precio que los de importación.

2. ANTECEDENTES GENERALES

2.1 La embriogénesis somática

En 1958, como resultado de trabajos independientes, (Reinert 1958; Steward and Mears 1958) se describió, de manera simultánea, por primera vez el fenómeno de la embriogénesis somática y actualmente puede ser definida como el proceso biológico a través del cual células no sexuales dan lugar a una estructura bipolar que se asemeja (Figura 1.12) estructuralmente a un embrión cigótico (Von-Arnold *et al.*, 2002).

Si bien, los embriones somáticos han sido utilizados como un sistema modelo para realizar estudios embriológicos, éstos también presentan una aplicación práctica de gran importancia para la propagación vegetativa a gran escala y ofrece ventajas particulares sobre la organogénesis para establecer bancos de germoplasma o realizar modificaciones genéticas, es por ello que con el paso del tiempo se ha reportado la inducción de la embriogénesis somática en un gran número de especies de interés comercial, entre las cuales se incluye al cocotero (Chan *et al.*, 1998).

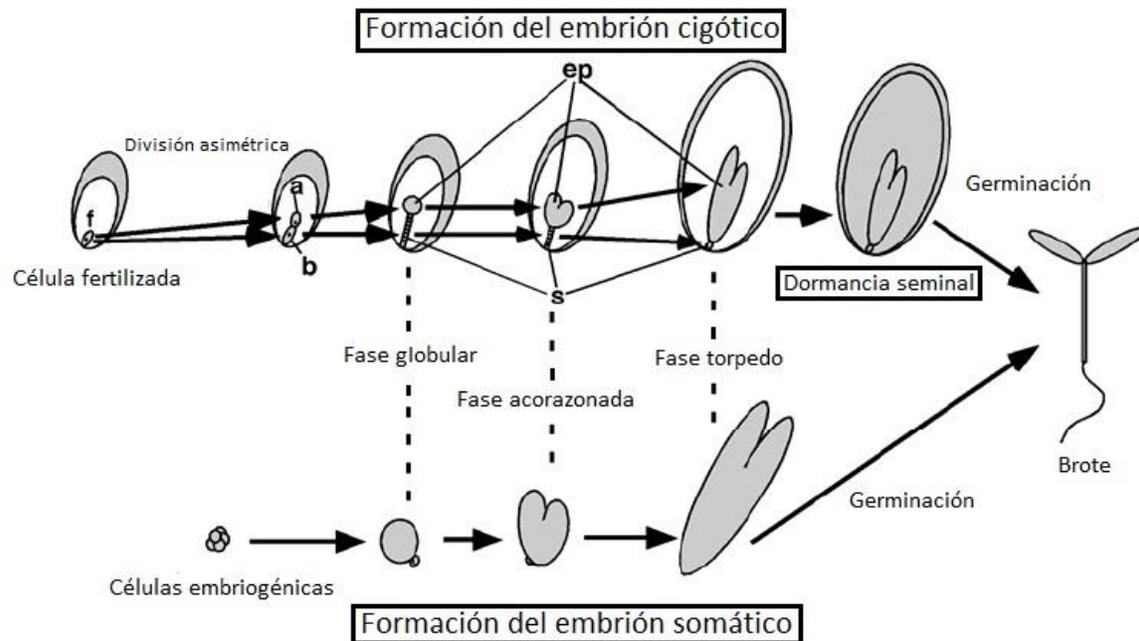


Figura 1.12. Representación esquemática del proceso de formación del embrión somático en comparación con la formación del embrión cigótico.

2.2 El rol de las auxinas en la embriogénesis somática

Las auxinas son un grupo de fitohormonas que actúan como reguladoras del crecimiento vegetal y ejercen una fuerte influencia sobre procesos como el crecimiento celular, acidificación de la pared celular, inicio de la división celular, organización de meristemos para dar lugar a tejido desorganizado (callo) u órganos definidos y promueve la diferenciación vascular (Gaspar *et al.*, 1996). Se sintetizan en las regiones meristemáticas del ápice de los tallos y se desplazan desde allí hacia otras zonas de la planta, principalmente hacia la base, estableciéndose así un gradiente de concentración.

Tal como ocurre con otros procesos ontogénicos, la distribución diferencial de la auxina como molécula señal es necesaria para el inicio de la embriogénesis. Los niveles máximos y los gradientes de auxina se modifican como resultado de la biosíntesis local y principalmente por el transporte direccional de la auxina entre las células, que es regulado por la auxina misma, cabe mencionar que este tipo de transporte no ha sido reportado para ninguna otra molécula de señalización (Petrásêk and Friml 2009).

Con base en estudios de expresión y localización de proteínas transportadoras de auxina, se ha establecido que las mismas son absolutamente necesarias para la generación y el mantenimiento de niveles máximos y gradientes de auxina.

2.2.1. Transportadores de entrada

A la fecha se ha identificado como responsables del ingreso de auxinas a la familia de proteínas transmembranales AUX1/LAX, las cuales son similares a permeasas de aminoácidos, un grupo de transportadores dependientes de gradientes de protones (Bennet *et al.*, 1996; Swarup and Péret 2012).

2.2.2. Transportadores de salida

Hasta el momento se han aislado e identificado ocho proteínas miembros de la familia PIN en *Arabidopsis*, las cuales se caracterizan por poseer dos dominios transmembranales separados por un anillo hidrofílico y son convencionalmente denominados desde PIN1 hasta PIN8. Dentro de la familia PIN se han establecido dos subgrupos por su función. PIN5, PIN6 y PIN8 tienen un anillo hidrofílico medio pequeño y es probable que regulen el intercambio de auxina entre el retículo endoplásmico y el citosol; por otro lado, las proteínas PIN1, PIN2, PIN3, PIN4 y PIN7 se han localizado en la membrana plasmática, donde actúan como transportadores de salida de auxina. Otras proteínas que juegan un rol en el flujo salida de auxina son los transportadores tipo ABCB (ATP-binding cassette subfamily B) (Petrásêk and Friml 2009).

2.2.3. Regulación del transporte de auxinas

Como hemos mencionado previamente, la evidencia señala a la auxina misma como el principal regulador de su propio transporte (Sachs 1981). Se ha reportado que el incremento de la concentración de auxina local desencadena una cascada de señalización en la cual la auxina se une al receptor TIR1 (Transport Inhibitor Response 1), que forma parte del complejo proteico SCF-E3-ligasa (Noh *et al.*, 2001; Geisler *et al.*, 2005; Terasaka *et al.*, 2005; Vanneste *et al.*, 2005; Vieten *et al.*, 2005). Esta interacción deriva en la ubiquitinación y la degradación específica de los represores transcripcionales de auxina Aux/IAA. Subsecuentemente, los factores de respuesta a auxina (ARFs) son dejan de ser reprimidos y activan la expresión de genes inducibles por auxina. Todos los transportadores de auxina conocidos son regulados por este mecanismo de retroalimentación (Figura 1.13).

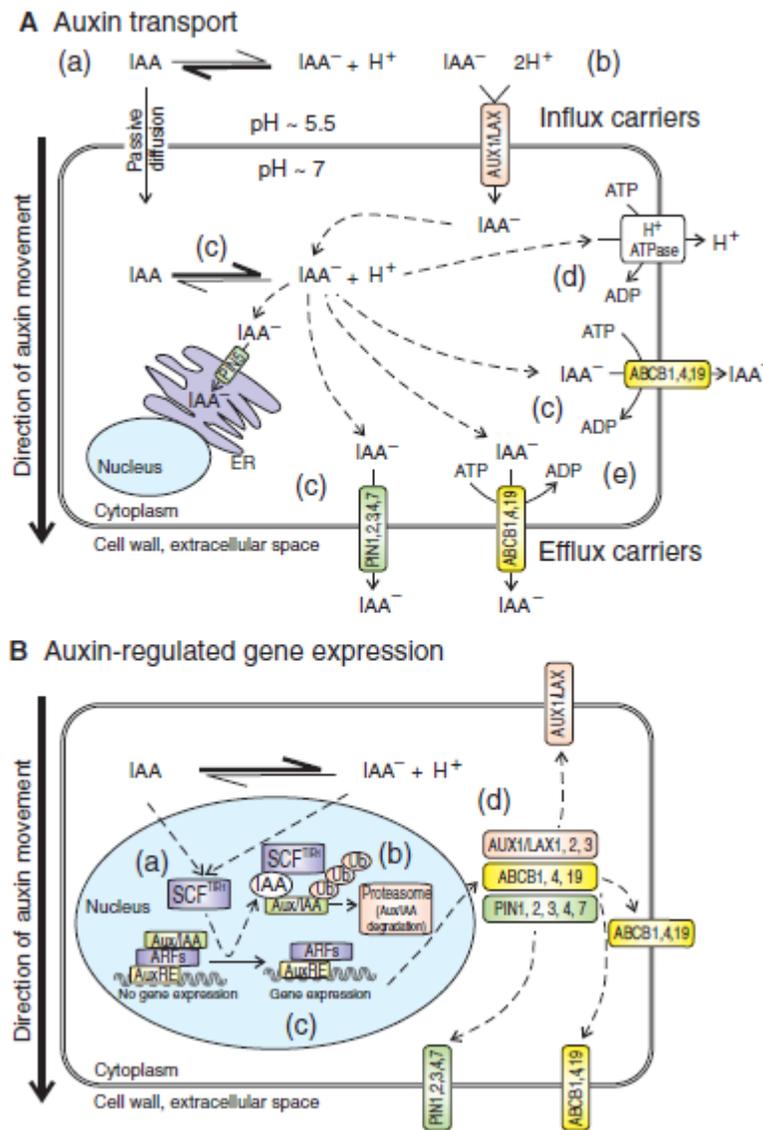


Figura 1.13. Patrones del transporte de auxinas a través de la membrana plasmática (A) y la expresión génica regulada por las auxinas (B) (Petrásěk and Friml 2009).

2.2.4. Rutas de transporte de auxinas durante la embriogénesis

La auxina y su transporte son importantes desde las etapas más tempranas del desarrollo vegetal. Se ha demostrado que la distribución diferencial de la auxina regula pasos

importantes, tales como la especificación del eje longitudinal y la formación de primordios foliares, durante la embriogénesis.

Durante la embriogénesis temprana, la acción concertada de PIN1, PIN4 y PIN7 es necesaria para dar lugar a una estructura polar durante los inicios de la embriogénesis (Friml *et al.*, 2002, 2003). En este proceso también participan, aunque en menor medida, los transportadores ABCB y AUX1/LAX.

Poco después de la primera división anticlinal del cigoto, se pueden detectar altos niveles de auxina en la célula apical. Esta distribución diferencial es resultado de la actividad de PIN7 que se localiza en el extremo apical de las células del suspensor. En esta etapa, es posible que PIN1 sea el responsable de homogeneizar la distribución de auxina entre las células del proembrión en formación. De manera simultánea ABCB1 y ABCB19 contribuyen con el transporte de auxina durante las etapas tempranas de la formación del proembrión y se pueden localizar ABCB1 en todas las células del suspensor y del proembrión, mientras que la localización de ABCB19 está restringida a las células del suspensor, sin embargo ninguna de estas dos proteínas presenta una polaridad evidente (Mravec *et al.*, 2008).

Durante la fase globular, PIN1 modifica su localización gradualmente hacia la porción basal de la membrana plasmática de las células embrionarias (Kleine-Vehn *et al.*, 2008). De manera simultánea, la polaridad de PIN7 cambia hacia el extremo basal en las células del suspensor. Estos rearrreglos coordinados de las proteínas PIN permiten un flujo basipetal de la auxina y la acumulación de la misma en la hipófisis. Durante esta etapa, la distribución y la respuesta de la auxina son cruciales para la especificación de la hipófisis como el precursor del meristemo radicular.

Posteriormente, durante el desarrollo de la etapa acorazonada del embrión de *Arabidopsis*, se forman nuevos centros de acumulación máxima de auxina en las posiciones correspondientes a dos primordios cotiledonares, principalmente por la acumulación de PIN1 (Benková *et al.*, 2003). En esta etapa, la expresión de ABCB19 es complementaria a la de PIN1 y exhibe su mayor expresión en tejidos de la endodermis y la corteza (Mravec *et al.*, 2008).

En la Figura 1.14 se presenta de manera esquemática el flujo auxina y la participación de los diferentes transportadores conocidos durante la embriogénesis.

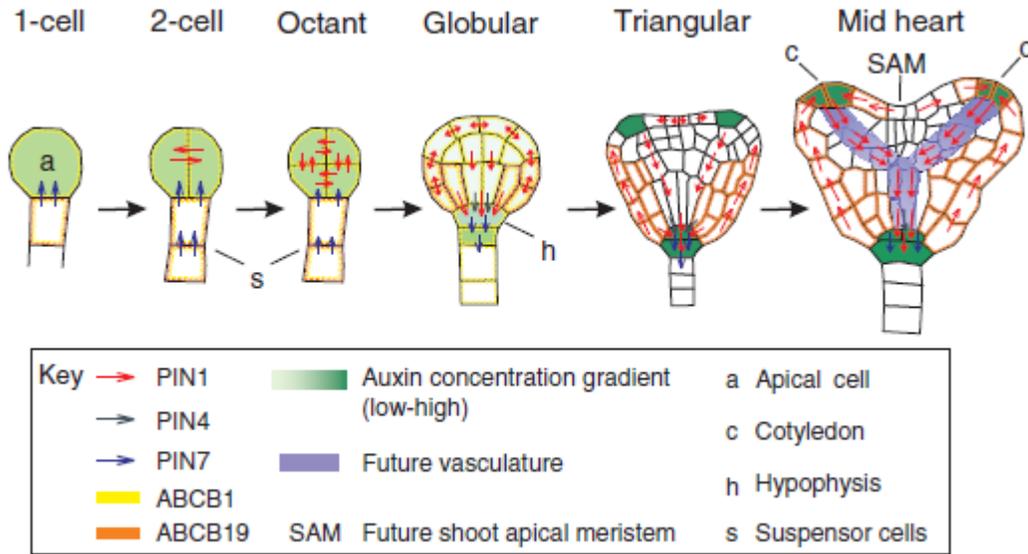


Figura 1.14. Gradientes de la concentración de auxina y sus transportadores durante la embriogénesis (Petrásêk and Friml 2009).

2.2.5. Calcio y su interacción con las auxinas

Las plantas, ante un ambiente cambiante han tenido que desarrollar una gran flexibilidad fenotípica y ontogénica que les permita sobrevivir. Actualmente existe evidencia de la participación de las auxinas en casi cada aspecto del desarrollo de la planta, incluyendo la embriogénesis y múltiples pasos del proceso organogénico, desarrollo foliar, vascularización, gravitropismo, hidrotropismo, fototropismo, formación de pelos radiculares, control estomático, desarrollo del pólen, senescencia, desarrollo del fruto, abscisión foliar, respuesta a estrés biótico y abiótico, así como a nivel celular, en el control de la diferenciación celular, regulación del ciclo celular, morfogénesis y transporte a través de membrana (Vanneste and Friml 2013).

Es precisamente, debido a la variedad de procesos en los que participan las auxinas, que las plantas han elaborado mecanismos para regular los niveles de auxina en las célula, y van desde la regulación de la biosíntesis, conjugación, compartimentalización subcelular, degradación y transporte activo para prevenir actividades no deseadas de las auxinas en momentos determinados (Ljung 2013; Sauer *et al.*, 2013).

De manera adicional, las plantas logran un control más preciso de la acción de las auxinas a través de la modulación de las rutas de transducción de señales (Chapman and Estelle 2009; Lokerse and Weijers 2009).

2.2.6. El Ca^{2+} en la embriogénesis somática

El catión Ca^{2+} es una señal muy versátil y juega un rol como segundo mensajero en muchos procesos celulares como parte de una respuesta inmediata ante una variedad de señales tanto endógenas como ambientales, como pueden ser niveles hormonales, luz, estrés por sequía, etc. Como segundo mensajero, es uno de los más ampliamente distribuidos en la naturaleza, que es capaz de transmitir una señal primaria desde el medio extracelular hacia objetivos intracelulares. Debido al pleiotropismo y a la posibilidad de regular la señalización por Ca^{2+} a tantos niveles, no es improbable que una sola señal primaria pueda dar como resultado múltiples respuestas (Vanneste and Friml 2013).

2.2.7. Firmas de calcio

Las modificaciones de la $[Ca^{2+}]$ citosólica, que bajo condiciones de reposo se ubica entre 80-200nM (Bush 1993) son conocidas como firmas de calcio ya que son diferencialmente decodificadas por la célula (Figura 1.15), dependiendo de factores como el estatus fisiológico, la localización del estímulo, de cuantos y cuales canales se activan, así como la cinética y la magnitud de la perturbación (Geydan and Spinel 2007). De esta manera, cada estímulo se manifiesta con características distintivas y la célula responde de manera repetible ante ellos.

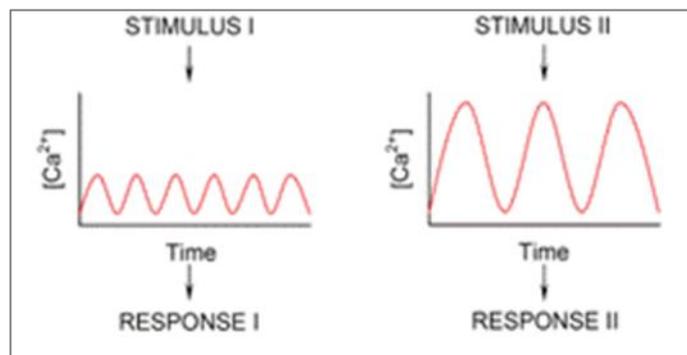


Figura 1.15. Representación de comportamiento teórico de las firmas de calcio (Tomado de www.lancaster.ac.uk).

2.2.8. El efecto de Ca^{2+} sobre la embriogénesis somática

Desde 1990 se sabe que calcio incrementa la frecuencia de la embriogénesis en zanahoria (Jansen *et al.*, 1990) y más recientemente se ha reportado que la adición del ionóforo A23187 al medio de cultivo incrementa de manera considerable la frecuencia de la embriogénesis en cultivos de café (Ramakrishna *et al.*, 2011) y de trigo (Mahalakshmi *et al.*, 2007). Además, se ha demostrado que la adición de agentes quelantes impide el ingreso de calcio exógeno a la matriz intracelular, que trunca el desarrollo de los embriones e inhibe la acumulación de proteínas cinasas dependientes de calcio (Anil and

Rao 2000). Todo lo anterior sugiere que el calcio juega un papel importante como segundo mensajero durante la embriogénesis somática.

2.3 La micropropagación de cocotero

La investigación para el desarrollo de protocolos de micropropagación de plantas de cocotero, inició en la década de los años 70 (Eeuwens 1976, 1978; Eeuwens and Blake 1977). Los estudios posteriores sobre dicho tema, han utilizado mayormente explantes de inflorescencia, obteniendo bajas tasas de reproducibilidad y eficiencia

Cuadro 1.7

Cuadro 1.7).

A finales de la década de los 90, se desarrolló un protocolo para la regeneración de cocotero, utilizando plúmulas de embriones cigóticos maduros como explantes y con la adición de reguladores sintéticos del crecimiento como el ácido 2,4-D y la 6-BAP. Los rendimientos obtenidos, fueron el doble de callos y más de diez veces el número de callos embriogénicos, que los descritos previamente con inflorescencias como explantes (Chan *et al.*, 1998). Posteriormente, se logró una mejora importante en la eficiencia de dicho protocolo que consistió en la inclusión de la multiplicación de callo embriogénico y la embriogénesis somática secundaria (Figura 1.16), es decir, los callos somáticos obtenidos a partir de plúmula se utilizaron como explantes para formar tanto nuevos callos embriogénicos como nuevos embriones somáticos. Se demostró que los callos embriogénicos obtenidos después de tres ciclos de multiplicación son capaces de producir embriones somáticos, con lo cual la productividad total fue calculada en 98,00 embriones somáticas por cada explante de plúmula introducido al sistema; comparando este dato con la productividad del protocolo original, representa un incremento de 27,000 a 50,000 veces más embriones por plúmula (Pérez-Núñez *et al.*, 2006), Además, la tasa de conversión embrión-planta, se mantiene en 20% (Oropeza, datos no publicados).

Cuadro 1.7. Resumen histórico de los avances alcanzados para el cultivo *in vitro* de cocotero.

Referencia	Explante	Resultado
Eeuwens, 1976	Inflorescencia	
Eeuwens and Blake, 1977	Hoja	Requerimientos para la formación de callo embriogénico.
Eeuwens, 1978	Meristemo apical	
Branton and Blake, 1983	Inflorescencia	Nódulos semejantes a embriones.
Verdeil <i>et al.</i> , 1992	Inflorescencia	Embriogénesis somática (baja frecuencia).
Verdeil, 1993	Inflorescencia	Callo blanco globular.
Chan <i>et al.</i> , 1998	Plúmula	Embriogénesis somática indirecta y regeneración de plantas.
Perera <i>et al.</i> , 2007	Ovario	Embriogénesis somática con anormalidades.
Perera <i>et al.</i> , 2009	Antera	Mayor frecuencia de embriogénesis con citocininas.
Vidhanaarachchi <i>et al.</i> , 2013	Ovario	Respuesta diferencial por explante.
Sandoval-Cancino <i>et al.</i> , 2016	Raquilla	Estructuras embrionarias.



Figura 1.16. Representación esquemática del protocolo actualmente utilizado para la micropropagación vía embriogénesis somática indirecta de Cocotero en el CICY.

Si bien, la utilización de explantes de plúmula ha demostrado incrementar la reproducibilidad y la eficiencia de la micropropagación *in vitro*, también se considera que un protocolo basado en la utilización de este tipo de explantes no se puede utilizar para la micropropagación de genotipos de élite, debido a la posible existencia de heterogeneidad genética (Chan *et al.*, 1998; Sáenz *et al.*, 2006). Sin embargo, se reconoce que la utilización de explantes de plúmula es potencialmente útil cuando se obtienen de padres seleccionados con un desempeño sobresaliente y que las mejoras hechas en este sistema, pueden ser aplicables a tejidos con diferentes orígenes (Chan *et al.*, 1998).

2.3.1. Detrás de la embriogénesis somática en cocotero

La embriogénesis somática indirecta en cocotero se ha venido estudiando de manera sistemática en el laboratorio de cocotero del Centro de Investigación Científica de Yucatán y actualmente se cuenta con la caracterización morfo-histológica de la formación de callo embriogénico y de embriones somáticos (Sáenz *et al.*, 2006) así como con los perfiles de expresión de algunos genes involucrados en la embriogénesis (Sáenz-Carbonell *et al.*, 2013). Como parte de la caracterización morfo-histológica, se encontró que hacia los 45 días de cultivo *in vitro*, se observa la formación de una zona meristemática en la periferia del tejido y hacia los 60 días se pueden observar centros meristemáticos perfectamente definidos, mas sin embargo, no todos los centros meristemáticos dan lugar a estructuras embriogénicas (Figura 1.17).

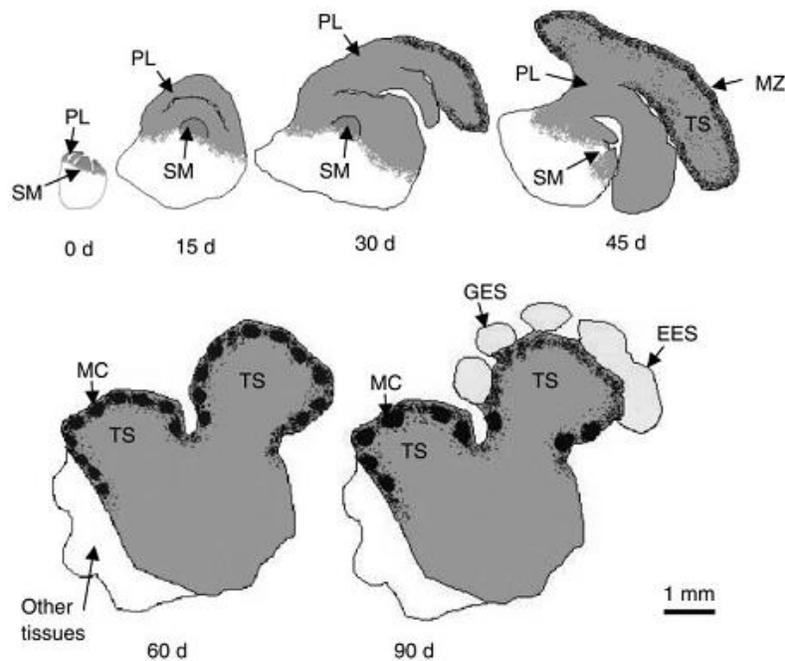


Figura 1.17. Representación esquemática de los cambios que ocurren durante la formación de callo embriogénico de *Cocos nucifera* L. (Sáenz *et al.*, 2006).

En el año 2000 (Islas-Flores *et al.*), reportó el incremento de la actividad de enzimas cinasas de tirosina, que habían sido previamente señaladas como indicadores de potencial morfogénico o embriogénico en otras especies como tabaco y toloache (Böcher *et al.*, 1985), secuoya roja (Kuo *et al.*, 1995), arroz (Komatsu *et al.*, 1996) y zanahoria (Schmidt *et al.*, 1997), justo al inicio de la inducción de la embriogénesis somática de cocotero a partir de explantes de plúmula.

Como parte de la caracterización molecular, actualmente se cuenta con los patrones de expresión de CnCDKA (Cyclin-depedent kinase A) que es un gen relacionado a la proliferación celular y el mantenimiento de la capacidad de división celular; durante la embriogénesis somática de cocotero, su expresión incrementa constantemente durante la formación de callo embriogénico, fase en la que se adquiere la competencia embriogénica, alcanzando un pico máximo hacia los 90 días de cultivo, posteriormente la expresión decrece progresivamente hasta alcanzar un punto mínimo cuando los embriones somáticos han germinado (Montero-Cortés *et al.*, 2010a).

También ha caracterizado la expresión de CnKNOX1, la cual fue detectada a lo largo de todo el proceso embriogénico, excepto en embriones en la fase pre-globular y alcanzando un pico máximo e embriones en etapa precoleoptilar. Por su parte, la expresión de CnKNOX2 se observa en todas las etapas alcanzando su pico máximo durante la etapa globular (Montero-Cortés *et al.*, 2010b).

Finalmente, también se ha caracterizado la expresión de CnSERK (Figura 1.18) y se observa que puede ser detectado en tejido embriogénico, aún antes de que el desarrollo embrionario sea observable, mientras que no es observable en tejido no embriogénico, lo que sugiere que la expresión de CnSERK está asociada con la inducción de la embriogénesis somática y por lo tanto puede ser utilizado como un marcador de células competentes para formar embriones somáticos en tejidos *in vitro* de cocotero (Pérez-Núñez *et al.*, 2009).

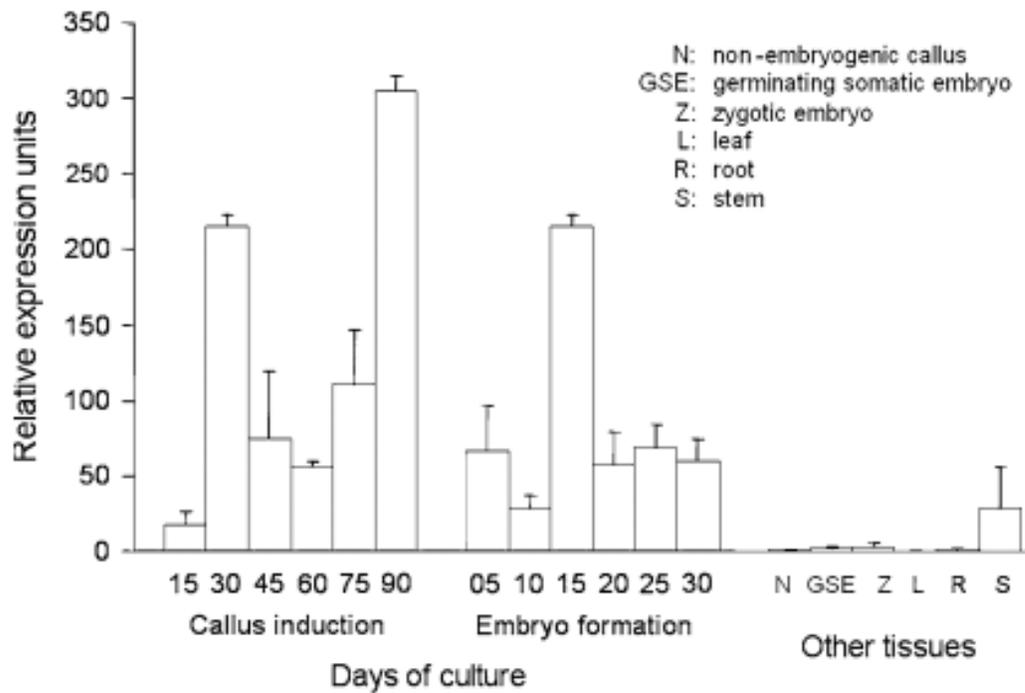


Figura 1.18. Expresión relativa de CnSERK en diferentes tejidos de cocotero *in vitro* (Pérez-Núñez *et al.*, 2009).

Con base en lo abordado anteriormente, se han realizado esfuerzos por incrementar la eficiencia del protocolo para la micropropagación de cocotero (Cuadro 1.8) y además, en la literatura científica, se pueden encontrar reportes de diferentes estrategias que se han utilizado para incrementar de manera sustancial la eficiencia de protocolos de micropropagación de diversas especies, entre los que destacan la adición del ionóforo de calcio A23187 al medio de cultivo (Mahalakshmi *et al.*, 2007; Ramakrishna *et al.*, 2011) y la adición de floroglucinol al medio de cultivo (Teixeira da Silva *et al.*, 2013). Además, observaciones previas realizadas en el laboratorio de Propagación Clonal del Centro de Investigación Científica de Yucatán, sugieren que la exposición de callos embriogénicos a un medio que contiene la mitad de la concentración de auxina requerida para la formación de callos embriogénicos (0.635 mM) mejora la calidad de los callos embriogénicos sometidos a esta condición (Rodríguez-Martínez, comunicación personal).

Cuadro 1.8. Resumen histórico de las estrategias evaluadas para incrementar la eficiencia de la embriogénesis somática en *Cocotero* y otros cultivos de interés comercial.

Referencia	Tratamiento	Cultivo	Mejora
Azpeitia <i>et al.</i> , 2003	Brasinoesteroides	<i>Cocos nucifera</i>	Mayor número de embriones/callos.
Pérez-Núñez <i>et al.</i> , 2006	Multiplicación de callos embriogénicos	<i>Cocos nucifera</i>	Mayor número de embriones/explante.
Sáenz <i>et al.</i> , 2010	Carbón activado	<i>Cocos nucifera</i>	Menor tasa de oxidación.
CICY, N. P.*	Reducción de [2,4-D] por 1 mes	<i>Cocos nucifera</i>	Mayor número de estructuras embriogénicas
Mahalakshmi <i>et al.</i> , 2007	Ionóforo A23187	<i>Triticum aestivum</i>	Incremento en la frecuencia de la embriogénesis somática.
Ramakrishna <i>et al.</i> , 2011		<i>Coffea canephora</i>	
Ponsamuel <i>et al.</i> , 1996		<i>Camellia sinensis</i>	Conversión callos - embrión somático
Murali <i>et al.</i> , 1996	Floroglucinol	<i>Rosa hybrida</i>	Maduración de embriones.
Find <i>et al.</i> , 2002		<i>Abies nordmanniana</i>	Proliferación de embriones sin madurar.
Reis <i>et al.</i> , 2008		<i>Feijoa sellowiana</i>	Inducción de la embriogénesis.
Vidican and Cachita-Cosma, 2010	Luz (longitud de onda)	<i>Echinopsis chamaecereus</i>	Incremento de la generación de callos embriogénicos.

*N.P. = Datos no publicados.

HIPÓTESIS

- I. La resiembra de callos embriogénicos en un medio de cultivo modificado con la mitad de la concentración de 2,4-D, tendrá un efecto positivo sobre la formación de callo embriogénico y de embriones somáticos, así como sobre su germinación.
- II. La exposición de estructuras embriogénicas, utilizadas como explantes para la formación de callo embriogénico, a combinaciones de Ca^{2+} /ionóforo A23187, tendrá un efecto positivo sobre la formación de callos embriogénicos y de embriones somáticos, así como sobre su germinación.
- III. Un cambio en la formulación del medio de cultivo empleado para inducir la formación de callo embriogénico, que incluya la adición de floroglucinol, tendrá un efecto positivo sobre la formación de callos embriogénicos y de embriones somáticos, así como sobre su germinación.
- IV. Ya que CnSERK se ha reportado previamente como un marcador temprano del potencial embriogénico en *C. nucifera*, es de esperarse que aquellos tratamientos que tengan un efecto sobre la embriogénesis somática de cocotero, modifiquen sus niveles de expresión.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la efectividad de diferentes estrategias, para incrementar la eficiencia del protocolo de micropropagación de *Cocos nucifera* L., en términos de generación callos embriogénicos, embriones somáticos y formación de brotes.

OBJETIVOS PARTICULARES

- I. Evaluar el efecto que tendrá la resiembra de callos embriogénicos hacia un medio fresco con la mitad de la concentración de 2,4-D sobre la generación de callos embriogénicos y embriones somáticos de *Cocotero* L.
- II. Evaluar el efecto de diferentes combinaciones de Ca^{2+} /ionóforo A23187 sobre la generación de callos embriogénicos y embriones somáticos de *Cocotero*.
- III. Evaluar el efecto del floroglucinol sobre la generación de callos embriogénicos y embriones somáticos de *Cocotero*.
- IV. Evaluar el efecto de los tratamientos que muestren potencial para incrementar la eficiencia del protocolo de micropropagación de cocotero sobre los niveles de expresión de CnSERK.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Para evaluar el efecto de diferentes factores que podrían contribuir para mejorar la eficiencia de la embriogénesis somática de *Cocos nucifera*, se propone la siguiente estrategia experimental (Figura 1.19):

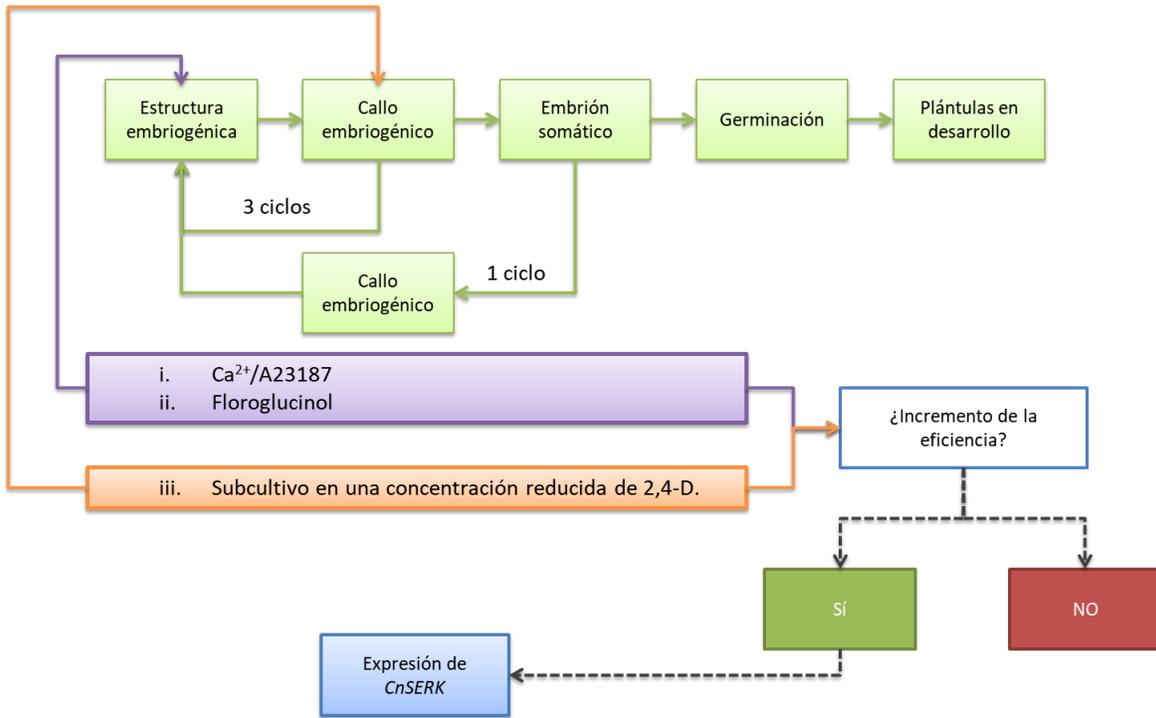


Figura 1.19. Estrategia experimental propuesta para el desarrollo de este trabajo.

CAPÍTULO I

EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL FLOROGLUCINOL SOBRE LA FRECUENCIA DE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA DE *Cocos nucifera* L.**1. INTRODUCCIÓN**

En 1984 (Hanower and Hanower), fue reportado la frecuencia de la embriogénesis somática era incrementada 3.5 veces, por la adición de floroglucinol, en cultivos de palma aceitera.

El floroglucinol, también conocido como 1,3,5-trihidroxibenceno o 1,3,4-bencenotriol, es un compuesto fenólico que contiene un patrón simétrico de sustitución Arene único de un benceno trisustituible que le confiere una gran polifuncionalidad como intermediario. A continuación (Figura 20) se puede observar su estructura.

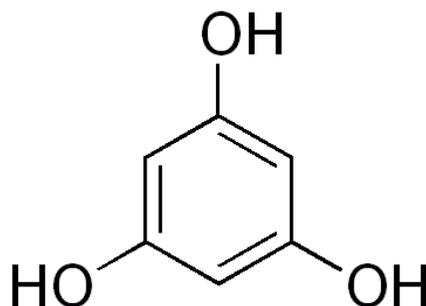


Figura 20. Estructura química del 1,3,5-trihidroxibenceno (floroglucinol).

Además, el floroglucinol, en su forma dihidratada, posee un punto de fusión de 116-117°C, mientras que su forma anhídrida se funde solamente a 218-220°C, por lo tanto, el floroglucinol se puede esterilizar en autoclave y no existe la necesidad de filtrarlo, y de esta manera se simplifica su utilización en sistemas *in vitro*.

Este es un producto de la degradación de la floridzina y posee propiedades promotoras del crecimiento similares a las de las auxinas. En estudios anteriores, se han reportado incrementos en la embriogénesis somática y la emisión de brotes en diferentes cultivos de importancia. Por ejemplo, el número de embriones somáticos producidos a partir de callo embriogénico de palma aceitera fue incrementado añadiendo floridzina o floroglucinol al medio de cultivo. Además, en el caso *Rosa hybrida* L. "Arizona", se incrementó la tasa de germinación de embriones somáticos maduros al agregar floroglucinol al medio (Teixeira da Silva *et al.*, 2013).

La degradación de la auxina más abundante en las células vegetales (ácido indolacético, AIA) se da por una oxidación la cual puede ser descarboxilativa (a través de la IAA oxidasa) o no descarboxilativa dando lugar a un ácido 3-oxindol acético el cual se conjuga con aminoácidos y pierde su actividad como auxina (Ver Figura 21) (Buchanan *et al.*, 2000).

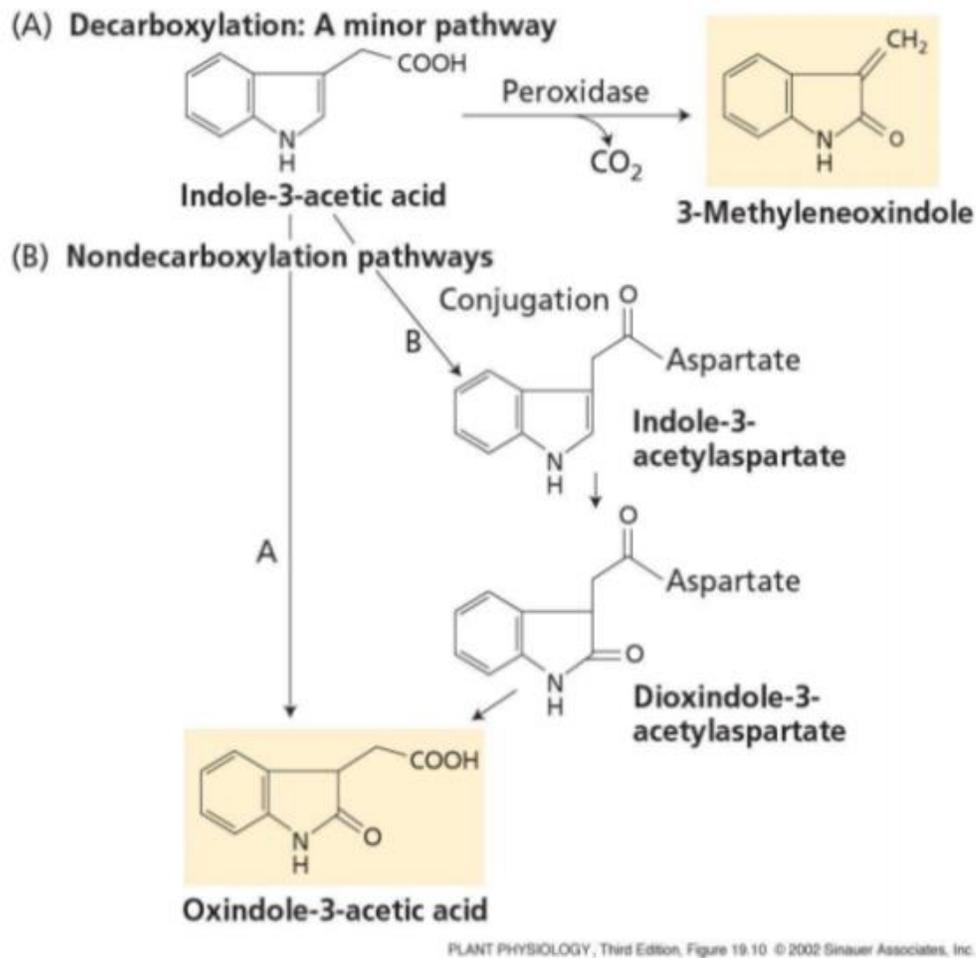


Figura 21. Rutas metabólicas para la degradación del ácido indol acético (AIA), (Buchanan *et al.*, 2000).

Por su parte, la ruta de degradación del 2,4-D, se inicia por la oxidación la auxina mediada por la 2,4-D/alfa-cetoglutarato dioxigenasa dando lugar a 2,4-diclorofenol (Young and Turnbull 2017). La ruta de degradación se puede ver en la Figura 22.

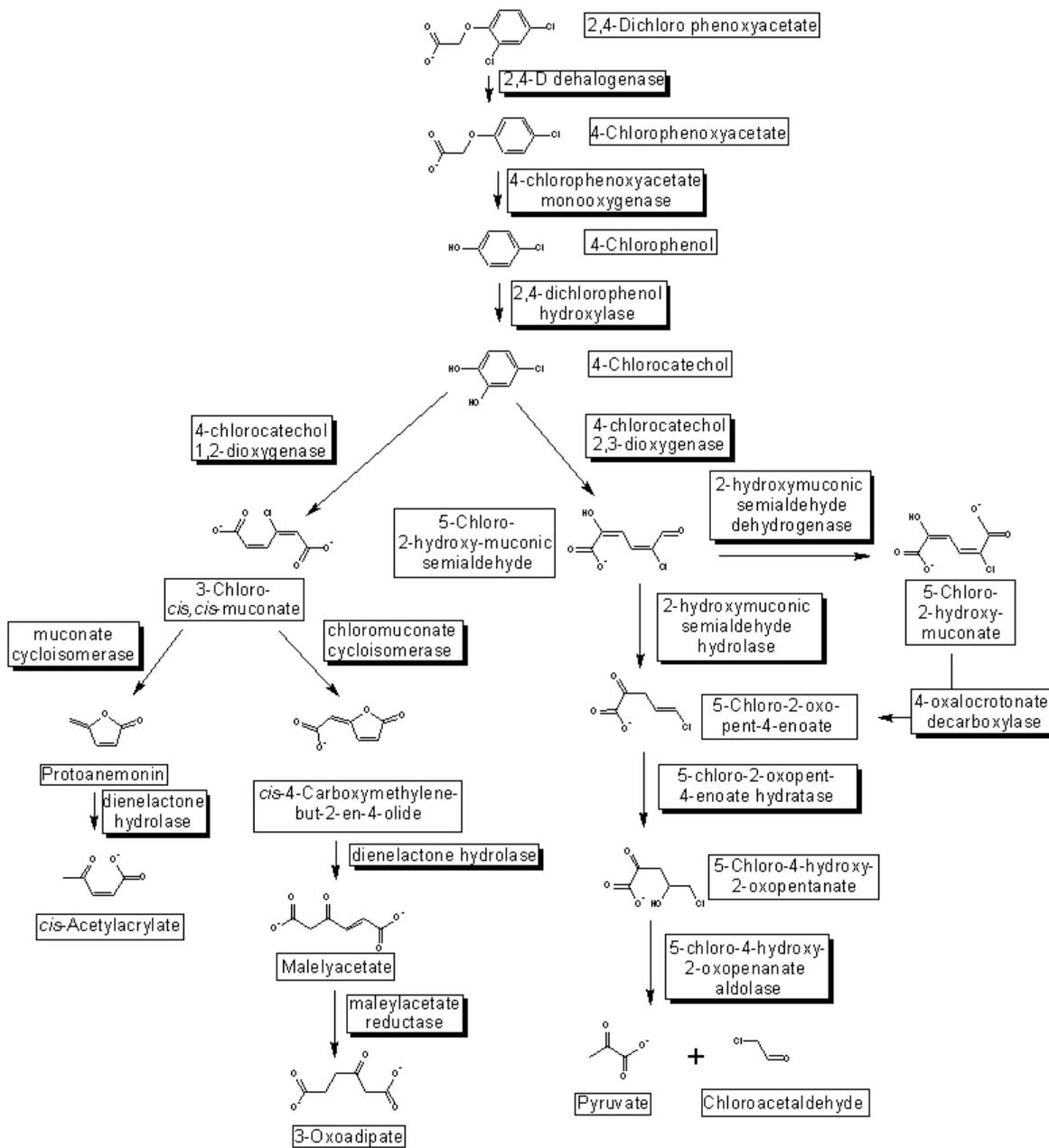


Figura 22. Ruta metabólica para la degradación de 2,4-D (Young and Turnbull, 2017).

Si bien, el conocimiento sobre la función biológica del floroglucinol es limitado, en la literatura es posible encontrar antecedentes que señalan que podría tener un efecto

sinérgico con las auxinas o un efecto como protector de las mismas (Teixeira da Silva *et al.*, 2013) y se han propuesto hipótesis sobre su actividad (George *et al.*, 2008):

1. Cuando es añadido exógenamente, podría actuar como un sustrato alternativo para las enzimas oxidativas, protegiendo a la auxina de la degradación.
2. La actividad morfogénica podría ser promovida por los productos formados cuando el floroglucinol es oxidado.

Con base a lo anteriormente descrito, en este capítulo se pretende evaluar el efecto del floroglucinol sobre la frecuencia de la embriogénesis somática en *Cocos nucifera* L. para determinar si puede ser útil como estrategia para mejorar la eficiencia del protocolo que actualmente se utiliza para inducir la embriogénesis somática de cocotero.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Obtención de material biológico

El material biológico utilizado para este trabajo es parte de la colección mantenida en el laboratorio de micropropagación clonal del CICY. Este material fue obtenido de acuerdo a la metodología reportada por Pérez-Núñez *et al.* (2006).

Para obtener los explantes requeridos, se colectaron frutos, los cuales fueron cortados transversalmente con un machete, exponiendo así, los embriones rodeados por endospermo sólido. Los embriones fueron extraídos de las nueces abiertas utilizando un saca-bocados (1.6 cm de diámetro) y colocados en agua destilada. A continuación se realizó una limpieza en campo, sumergiendo el material en etanol al 70% por 3 minutos y enjuagando 3 veces con agua destilada estéril, el material se colocó por 20 minutos en una solución de NaClO al 6% y fue enjuagado 3 veces con agua destilada estéril. Una vez finalizado este proceso, el material fue almacenado en frío para ser trasladado al laboratorio.

Posteriormente, bajo condiciones asépticas, el endospermo que rodea al embrión fue lavado en etanol al 70% por 3 minutos y enjuagado 3 veces con agua destilada estéril, lavado por 20 minutos en una solución de NaClO al 6% y enjuagado 3 veces con agua destilada estéril. A continuación, los embriones fueron separados del endospermo y lavados en una solución de NaClO al 0.6% por un periodo de 10 minutos y fueron enjuagados 3 veces con agua destilada estéril. Finalmente, los explantes de plúmulas fueron extraídos de estos embriones bajo un microscopio estereoscópico y colocados directamente en medio nutritivo Y3 (Eeuwens 1976).

2.2 Medio y condiciones de cultivo

Para inducir la formación de callo, cada explante es cultivado en viales de 35 mL, que contienen 10 mL de medio Y3, al cual se le añaden 3 g/L de gelrite y 2.5 g/L de carbón activado. Además, las concentraciones de reguladores de crecimiento utilizadas son 0.1 mM de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) para el medio I y 1 mM 2,4-D y 50 mM 6-bencilaminopurina (6-BAP) para el medio II. El pH del medio es ajustado a 5.75 antes de esterilizar en autoclave por 20 minutos a 120°C. Los cultivos son incubados en medio bajo condiciones de oscuridad durante 6 meses a $27 \pm 2^\circ\text{C}$ sin ser subcultivados y posteriormente son transferidos a medio II bajo condiciones de fotoperiodo ($45\text{-}60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PPF) a $27 \pm 2^\circ\text{C}$, realizando subcultivos cada 3 meses.

2.3 Condiciones experimentales

Debido a que el floriglucinol es una sustancia termoestable, éste se ha podido agregar directamente al medio de cultivo antes de iniciar el proceso de esterilización. Las concentraciones evaluadas fueron: 0 μM , 10 μM , 100 μM y 200 μM , por lo que se preparó una solución 10 mM y se agregaron 0 μL , 10 μL , 100 μL y 200 μL respectivamente en frascos viales conteniendo 10 mL de medio de cultivo.

A continuación se realizó la multiplicación de callo embriogénico y la siembra de los explantes en el medio preparado.

3. RESULTADOS

Con los tratamientos probados, (10 μ M, 100 μ M, 200 μ M) se observó una importante disminución de potencial embriogénico, en comparación con el grupo control. Esta disminución fue acompañada por marcada tendencia hacia la oxidación del tejido (Cuadro 2.1).

Cuadro 2.1. Resumen de la respuesta exhibida por el material sometido a las condiciones experimentales para evaluar el efecto del floroglucinol después de 60 días.

Floroglucinol (μ M)	Callo	C. Embriogénico	Embriones (por callo)	Oxidación	Esponjoso	Necrosis
0	27.0 %	60.0 %	0.67	0.0 %	6.0 %	0.0 %
10	13.3 %	20.0 %	0	26.6 %	40.0 %	0.0 %
100	13.3 %	13.3 %	0.133	60.0 %	13.3 %	0.0 %
200	6.0 %	6.0 %	0	53.3 %	33.3 %	0.0 %

Con los datos obtenidos durante los experimentos con floroglucinol, se condujo una prueba ANOVA para evaluar si existe un efecto sobre la frecuencia de la formación de callo embriogénico (%CE) partiendo de explantes sometidos a las condiciones experimentales. Como resultado del análisis no se encontraron diferencias significativas entre aquellos tratados de la manera habitual y callos cultivados con diferentes concentraciones de floroglucinol (10 μ M, 100 μ M, 200 μ M). Sin embargo, el valor numérico observado en todos los tratamientos revela una marcada tendencia hacia la pérdida de potencial embriogénico, acompañado de un importante incremento en el coeficiente de variación (Cuadro 9).

Cuadro 9. Efecto de la concentración de floroglucinol (90 días) sobre la formación de callo embriogénico y la oxidación observada en el tejido.

Floroglucinol (μM)	Formación de callo embriogénico (%)	Oxidación (%)
0	60.00 a	0.00 d'
10	20.00 a	26.67 c'
100	14.00 a	60.00 a'
200	6.67 a	53.33 b'
C.V.=86.15		C.V.= 5.83
R ² =0.57		R ² = 0.99

*Valores marcados con letras distintas presentan diferencias estadísticamente significativas de acuerdo a ANOVA ($p \leq 0.05$).

Por otro lado, cuando se evalúa el efecto de la adición de floroglucinol sobre la tasa de oxidación (Cuadro 9) del material vegetal, la prueba ANOVA revela que existen diferencias significativas entre cada uno de los pares de tratamientos, sugiriendo que la adición de floroglucinol al medio de cultivo favorece la oxidación.

4. DISCUSIÓN

Debido a los resultados exitosos reportados en la literatura, particularmente con lo reportado en una especie cercana (*Elaeis guineensis*) en 1984 (Hanower and Hanower), se esperaba que la adición de floriglucinol al medio de cultivo de nuestro sistema pudiera tener un efecto positivo sobre la embriogénesis somática. Sin embargo, los resultados obtenidos con los tratamientos con floriglucinol probados (10 μM ; 100 μM ; 200 μM) no han generado un incremento en la frecuencia de la embriogénesis en cocotero.

Nuestros resultados contrastan con algunos resultados exitosos que se han obtenido en otros sistemas como el de *Camelia sinensis*, caso en el que la adición de floriglucinol (10 μM) al medio de cultivo resultaba en una mayor generación de embriones somáticos y posteriormente en una mayor producción de raíces laterales difusas (Ponsamuel *et al.*, 1996); el de *Abies nordmanniana* (Find *et al.*, 2002), caso en que se reporta que el floriglucinol (39.65 μM) incrementa la formación de embriones somáticos, aunque en este caso se reportan también dificultades para su maduración; así como el caso de *Feijoa sellowiana*, en el que se ha señalado que el floriglucinol (197.5 μM) incrementa significativamente la formación de embriones en un 10.5%, y en el mismo trabajo, se reporta que la tasa de germinación incrementa 19.5% (Reis *et al.*, 2008).

Sin embargo, también existe un reporte (Murali *et al.*, 1996), utilizando *Rosa hybrida* como sistema de estudio en el cual el floriglucinol no mejora la respuesta embriogénica del cultivo, sin embargo se reporta un efecto positivo en etapas posteriores del desarrollo como la maduración de embriones y el desarrollo de plantas y en 2008 (Reis *et al.*), también reportan que con concentraciones más altas que 197.5 μM de floriglucinol, la respuesta embriogénica se ve inhibida.

Aunque existen los reportes mencionados, también es necesario señalar que estos son reportes aislados y como ha sido señalado en una revisión anterior (Teixeira da Silva *et al.*, 2013) aún se requieren estudios para comprender la función biológica del floriglucinol y poder aprovechar de manera eficiente las bondades que ha mostrado para el cultivo de tejidos.

Es importante considerar que en nuestro sistema de estudio se utiliza carbón activado para disminuir los efectos negativos de compuestos que inhiben la embriogénesis somática, como es el caso del exceso de compuestos fenólicos (Sáenz *et al.*, 2010). Además, se ha propuesto que el balance correcto de compuestos fenólicos en condiciones *in vitro* es necesario para lograr la embriogénesis somática (Reis *et al.*, 2008). Por lo que podría ser importante considerar nuevos experimentos en los que se considere modificar el balance entre el floriglucinol y el carbón activado en el medio.

Además, durante la interacción entre auxina y floriglucinol, el segundo funciona como un protector de la función de la auxina (George *et al.*, 2008; Teixeira da Silva *et al.*, 2013) bajo condiciones de alta disponibilidad de agua. En consecuencia, para evaluar el efecto de este compuesto, también podría ser un factor clave contar con un sistema de cultivo en medio líquido.

Finalmente, a pesar de los resultados obtenidos durante el desarrollo de este trabajo, y considerando lo reportado previamente (Murali *et al.*, 1996; Ponsamuel *et al.*, 1996; Reis *et al.*, 2008), se podría evaluar el efecto que tendría el floriglucinol en otras etapas del desarrollo como la maduración de embriones, la generación de brotes y el enraizamiento de vitroplantas.

CAPÍTULO II

EVALUACIÓN DEL EFECTO DE UN PRETRATAMIENTO CON 2,4-D (300 μ M) SOBRE LA MULTIPLICACIÓN DE CALLO EMBRIOGÉNICO DE *Cocos nucifera* L.**1. INTRODUCCIÓN**

El término “auxina” fue acuñado con base en el griego “auxein” (alargar o crecer) y es utilizado para denominar a una de las clases de reguladores de crecimiento reconocidas y promueven (en combinación con citocininas), el crecimiento de callos, suspensiones celulares y órganos; de igual manera regulan la dirección de la morfogénesis (George *et al.*, 2008).

A nivel celular, las auxinas controlan procesos básicos como el inicio de la división celular y la elongación celular, además de que ejercen una fuerte influencia sobre la acidificación de la pared celular. Ya que son capaces de dar inicio a la división celular, están involucradas en la formación de meristemos, dando lugar a tejidos, ya sean organizados o no. En tejidos desorganizados, son responsables de la adquisición y mantenimiento de la polaridad, mientras que en tejidos organizados, las auxinas son un elemento clave en el mantenimiento de la dominancia apical, abscisión, la regulación de los tropismos y el crecimiento radicular (Gaspar *et al.*, 1996; George *et al.*, 2008).

En términos generales, los trabajos orientados a la inducción de la embriogénesis somática indirecta se basan en una estrategia claramente definida por (Halperin and Wetherell 1964) para iniciar la embriogénesis somática en cultivos de zanahoria. Dicha estrategia consiste a grandes rasgos en el manejo de las concentraciones de auxina añadida al medio de cultivo a lo largo del tiempo transcurrido durante el cultivo:

- Inicialmente se aplican altas concentraciones de auxina para la inducción de callo embriogénico.
- Posteriormente se reduce la concentración de auxina para generar embriones somáticos viables.

- Finalmente, se elimina la auxina del medio para la germinación de embriones somáticos.

Esta estrategia ha ido exitosa en cultivos como algodón (Voo *et al.*, 1991), rosa (Kim *et al.*, 2003) caña de azúcar (Mariani *et al.*, 2014) y es también la estrategia que ha funcionado de manera confiable en *Cocotero* (Chan *et al.*, 1998).

La multiplicación de callo embriogénico es una estrategia que consiste en la utilización de estructuras embriogénicas como explantes para incrementar la biomasa de los cultivos *in vitro* y ha sido utilizada exitosamente en diversos cultivos como la *Phoenix dactylifera* (Al-Khayri 2011), *Tulipa gesneriana* (Ptak and Bach 2007) , y *Cocos nucifera* (Pérez-Núñez *et al.*, 2006)

En el caso de *Cocotero*, se ha logrado exitosamente incluir la multiplicación de callo embriogénico y la embriogénesis somática secundaria para incrementar la eficiencia del protocolo y se ha reportado que este proceso se puede repetir un número teóricamente ilimitado de veces (Pérez-Núñez *et al.*, 2006).

Casi 4 décadas después de los primeros trabajos para inducir *in vitro* la formación de callos de cocotero (Eeuwens 1976) se ha generado una buena cantidad de información sobre la embriogénesis somática indirecta en cocotero y actualmente se cuenta con la caracterización morfo-histológica de la formación de callo embriogénico y de embriones somáticos (Sáenz *et al.*, 2006) así como con los perfiles de expresión de algunos genes involucrados en la embriogénesis (Sáenz-Carbonell *et al.*, 2013). Como parte de la caracterización morfo-histológica, se encontró que hacia los 45 días de cultivo *in vitro*, se observa la formación de una zona meristemática en la periferia del tejido y hacia los 60 días se pueden observar centros meristemáticos perfectamente definidos, sin embargo, no todos los centros meristemáticos dan lugar a estructuras embriogénicas (Figura 23).

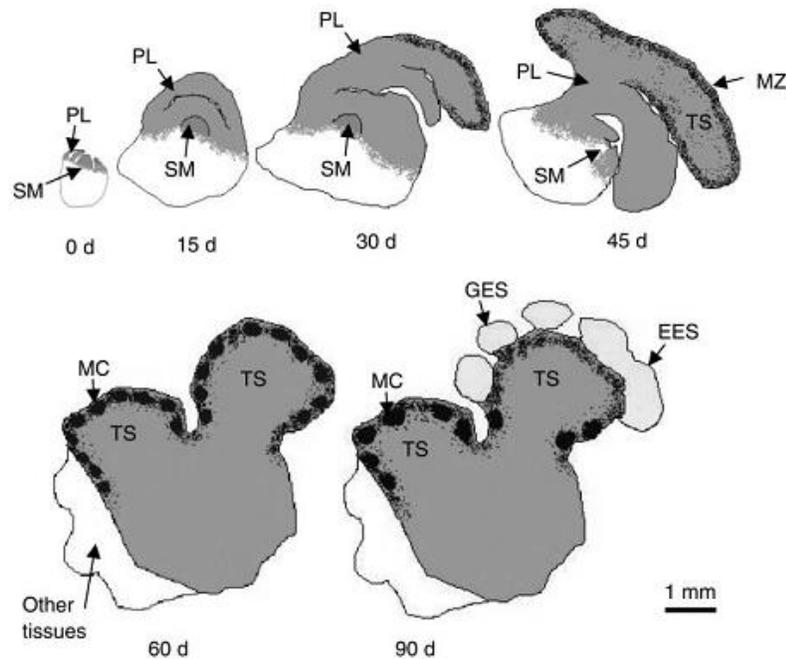


Figura 23. Representación esquemática de los cambios que ocurren durante la formación de callo embriónico de *Cocos nucifera* L. (Sáenz *et al.*, 2006).

Además, en el Laboratorio de Cocotero del CICY, rutinariamente se induce la formación de embriones somáticos al cumplirse los 3 meses desde la multiplicación y en este proceso, además de la aparición de embriones somáticos, también se ha observado la aparición de un mayor número de estructuras embriónicas, en comparación con aquellos callos que son cultivados en medio de multiplicación de callo embriónico de manera repetitiva (Rodríguez-Martínez, comunicación personal).

Es por ello que durante este trabajo se realizó un experimento para evaluar el efecto transferir CE del medio de cultivo I (0.6 mM de 2,4-D) a un medio de cultivo I modificado (I*) con la mitad de la concentración de 2,4-D (0.3 mM de 2,4-D) y cultivarlos durante 30 días para determinar si hay cambios en el número de estructuras embriónicas que se forman.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Obtención de material biológico:

El material biológico utilizado para este trabajo es parte de la colección mantenida en el laboratorio de micropropagación clonal del CICY. Este material fue obtenido de acuerdo a la metodología reportada por Pérez-Núñez *et al.* (2006).

Los explantes requeridos fueron obtenidos siguiendo el método descrito en la sección Materiales y Métodos del Capítulo II.

Medio y condiciones de cultivo

Todas las condiciones de cultivo fueron acordes a lo reportado por Pérez-Núñez *et al.*, (2006). Como medio basal se utilizó la formulación de medio Y3, al cual se le añadió gelrite (3g/L), sacarosa (5%) y carbón activado (2.5g/L). El medio para la inducción de callo embriogénico (medio 1) fue medio basal con 2,4-D (0.6mM). El medio para la inducción de la formación de embriones somáticos (medio 2) fue medio basal con 2,4-D (0.3 mM). El medio para la germinación de embriones somáticos (medio 3) fue medio basal con 2,4-D (0.006 mM) y 6-BAP (0.3 mM) y GA³ (0.0028 mM). El medio utilizado para la formación de plántulas (medio 4) fue medio basal con 2,4-D (0.006 mM) y 6-BAP (300mM). En todos los casos, el pH fue ajustado a 5.75 antes de esterilizar en autoclave (120° C durante 20 minutos). Todos los reactivos utilizados fueron Sigma-Aldrich, USA.

La formación de callo embriogénica fue obtenida a partir de estructuras embriogénicas utilizadas como explantes y cultivadas en medio 1 (10 mL en frascos viales de 45 mL) durante 3 meses bajo condiciones de oscuridad. Al finalizar este periodo, el proceso se repitió.

La formación de embriones somáticos fue obtenida tras cultivar callos embriogénicos en medio 2 (25 ml en frascos de 150 ml) durante un mes bajo condiciones de oscuridad.

La germinación de los embriones somáticos obtenidos fue lograda al cultivar dichos callos en medio 3 (25 mL en frascos de 150 ml) durante 3 meses bajo condiciones de fotoperiodo

con 16 horas de luz (PPFD = 45–60 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) brindadas por lámparas fluorescentes TriPhosphor (F32T8, 6500 K, 32 W, MAGGMR, México). El desarrollo de los brotes fue obtenido tras cultivar callos embriogénicos con embriones somáticos germinados en medio 4 (25 ml en frascos de 150 ml) durante 2 meses con el mismo régimen de fotoperiodo. Los cultivos obtenidos fueron subcultivados 3 veces en medio 4 fresco. Durante el período de crecimiento, los brotes obtenidos han sido separados del callo y cultivados como brotes aislados para continuar su desarrollo. Todos los cultivos mencionados fueron mantenidos a una temperatura de 27 ± 2 °C.

2.2 Condiciones experimentales:

Para evaluar el efecto del subcultivo en un medio fresco con la mitad de la concentración de auxina sobre la frecuencia de la embriogénesis, callos embriogénicos que habían completado su ciclo (3 meses) en medio I para la generación de callo embriogénico (2,4-D 0.6 mM), fueron transferidos durante un mes a un medio I modificado (0.3 mM) y una vez que se cumplió dicho periodo se realizó la multiplicación de callo embriogénico y la siembra se realizó nuevamente en medio de multiplicación, durante este último proceso se registró la cantidad de explantes promedio obtenidos durante la multiplicación.

En el segundo experimento, se evaluó el efecto de reducir el tiempo transcurrido entre la siembra de explantes de estructura embriogénica en medio I (2,4-D 0.6 mM) para la generación de callo embriogénico (de 3 a 2 meses) y su transferencia a un medio I modificado (2,4-D 0.3 mM). Después de un mes, se realizó la multiplicación de callo embriogénico y se registraron los resultados obtenidos.

Histología

El análisis histológico se llevó a cabo de acuerdo a la metodología reportada por Buffard-Morel *et al.*, (1992) y modificada posteriormente por Sáenz *et al.*, (2006) y por Montero-Cortés *et al.*, (2010a). Las muestras de tejido fueron colectadas y sumergidas en una solución de buffer de fosfato (pH 7.2) con paraformaldehído (4%) durante 24 horas. Posteriormente, las muestras fueron deshidratadas colocándolas en una serie de

soluciones acuosas de etanol con incrementos del 10% en un rango del 30% hasta 100% durante 7 horas. Una vez deshidratadas, las muestras fueron embebidas en resina polimérica JB-4R (Polyscience, Warrington, PA) y a partir de ellas se obtuvieron cortes de 5 μm de espesor, empleando un micrótomo HM 325 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). Finalmente, los cortes fueron teñidos con el reactivo ácido periódico-Schiff (PAS) y la tinción Naphtol Blue-Black específica para proteínas (Fisher, 1968).

Documentación fotográfica

Tanto los callos embriogénicos como los cortes histológicos fueron observados en un microscopio estereoscópico SMZ-168 TLED y fotografiados con una documentadora Motican 580 (Motic, British Columbia, Canada). Debido a que los callos embriogénicos ni los cortes histológicos se ajustaron al campo de visión obtenidos con la Motican 580, se utilizaron series de fotografías (aproximadamente 60) para obtener imágenes compuestas con el software Image Composite Editor 2.0 (Microsoft Research, 2017)

Análisis estadístico

Un diseño completamente aleatorio fue utilizado para este experimento. Los datos presentados corresponden a promedios y cada explante fue tratado como una unidad experimental y como una réplica. Cada grupo experimental constó de 63 individuos ($n = 63$). Los datos obtenidos fueron evaluados con un análisis de varianza (ANOVA) y el un procedimiento para comparación de medias (Prueba de Tukey, $p < 0.05$) apoyándonos en el paquete estadístico SAS University Edition.

PCR tiempo real

Una sonda TaqMan fue diseñada tomando en consideración la región menos conservada de la secuencia del gen CnSERK (No. de accesión AY791293.2) reportada por (Pérez-Núñez *et al.*, 2009). Dicha sonda fue utilizada en el análisis de expresión de CnSERK durante la formación de callos embriogénicos bajo todos los tratamientos.

Las muestras fueron colectadas por triplicado para su análisis cada 15 días durante los 90 días que dura un ciclo de cultivo. Para la extracción de RNA

se colectó de 100 mg de tejido de cultivo de cada etapa de desarrollo utilizando TRIZOL™ (Invitrogen, Cat. No. 15596026). Para eliminar la posible contaminación de ADN de la muestra de ARN resultante, se utilizó un kit Turbo DNA-free™ (Thermo Fisher Scientific, Cat. No. AM1907). La cuantificación de las muestras de ARN se realizó con un Nanodrop 1000 (Thermo Scientific, EE.UU.). La primera cadena de ADNc se amplificó por PCR de transcriptasa inversa a partir de 1 µg de ARN total usando cebadores aleatorios (Thermo Fisher Scientific, Cat. No. 48190011) y la Transcriptasa inversa SuperScript™ III (Thermo Fisher Scientific, Cat. No. 18080093) de acuerdo a las instrucciones del proveedor. Para verificar la calidad del ADNc, se amplificó un fragmento de 187 pb empleando la sonda del gen 18S (ARNr de Euk18S) (Applied Biosystems, Cat. No. 4333760T).

3. RESULTADOS

Formación de callo embriogénico

Un porcentaje de los explantes (EE) sometidos a los tratamientos evaluados en este experimento (Testigo; 3 meses de cultivo en Medio I + 1 mes en Medio I*; 2 meses de cultivo en Medio I + 1 mes en Medio I*), mostraron la formación de callo embriogénico, tal como fue previamente definido por (Sáenz *et al.*, 2006). Dicho proceso inicia con un explante de estructura somática que después de 45 días forma un callo que inicia a desarrollar estructuras translúcidas. Hacia el día 60, el callo ha incrementado su talla y posee un mayor número de estructuras translúcidas con subestructuras aún más pequeñas de tono blanco aperlado, reconocidas como estructuras embriogénicas (Figura 24 A).

Posteriormente, después de haber transcurrido 90 días de cultivo (Figura 24 B), las estructuras embriogénicas son más abundantes y en esta etapa del desarrollo, se obtiene un callo embriogénico. Esta etapa del desarrollo fue alcanzada en todos los tratamientos.

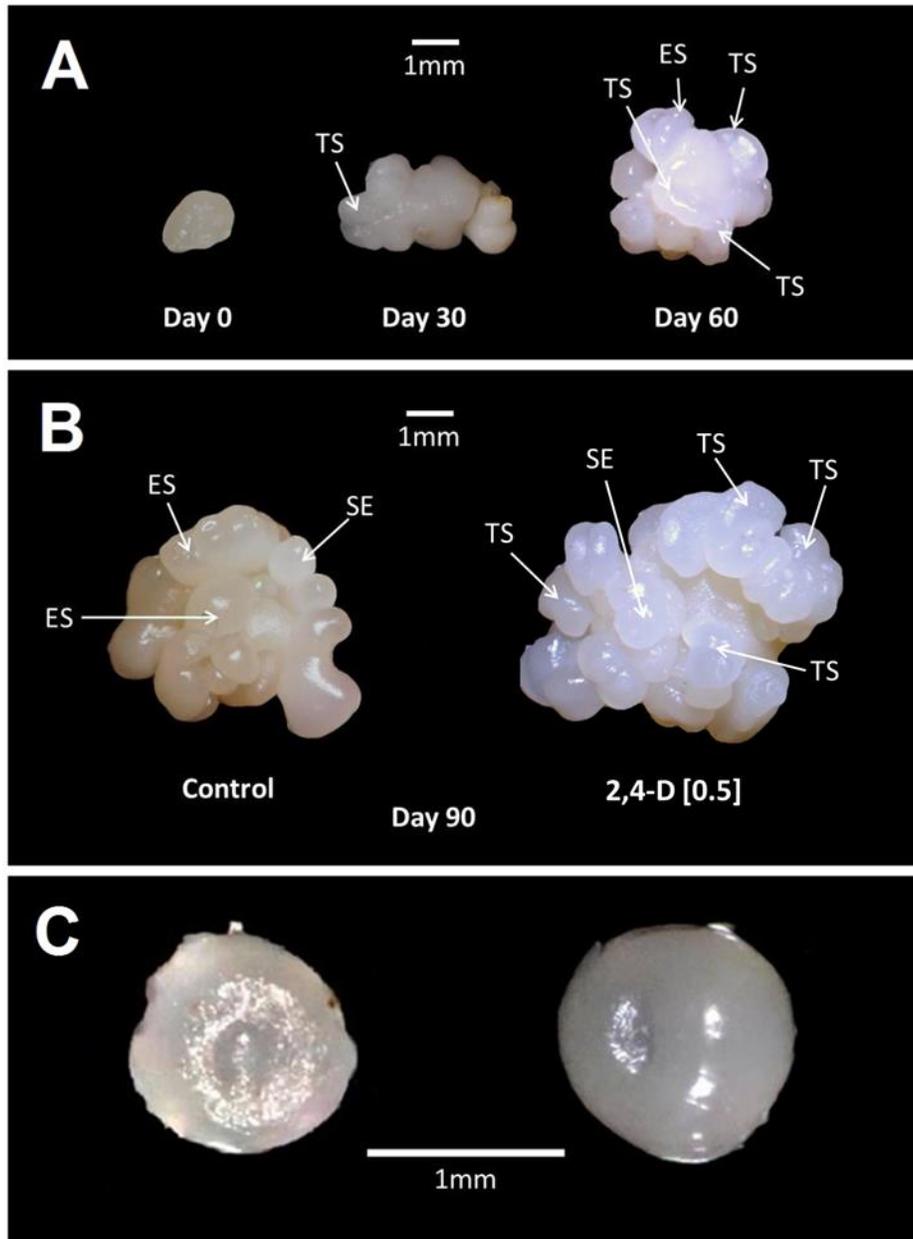


Figura 24. (A) Diferentes etapas de desarrollo durante la formación de callos embriogénicos derivados de explantes de estructuras embriogénicas, a los 0, 30 y 60 días de cultivo; (B) después de 90 días comparando los dos tratamientos; (C) comparación de los embriones globulares obtenidos (modificado de Rivera-Solís *et al.*, 2018?).

Los resultados obtenidos revelan un efecto positivo sobre el la formación de callos embriogénicos sometidos al tratamiento con subcultivo en un medio fresco con la mitad de la concentración del 2,4-D. Durante el primer experimento (3 meses en medio I + 1 mes en medio I modificado) se obtuvo un 60.3% de formación de callo embriogénico en el grupo testigo, mientras que en el grupo experimental se alcanzó el 76.0% de formación de callo embriogénico (Cuadro 10). Durante el segundo experimento (2 meses en medio 1 + 1 mes en medio 1 modificado), se logró incrementar de 58.3% a 67.1% durante el primer ciclo y de 47.9% a 65.1% durante el segundo ciclo (Cuadro 11).

Formación de estructuras embriogénicas

Además, los resultados también han revelado un incremento en el número de estructuras formadas sobre cada callo al incrementar de 5.3 a 25.8 durante el primer ciclo de multiplicación y de 5.3 a 25.53 durante el segundo ciclo de multiplicación (Cuadro 11).

El análisis histológico de los callos expuestos a ambos tratamientos, muestra que se presenta una acumulación de células densamente teñidas en la periferia de las estructuras embriogénicas (Figura 25 A, B), las cuales se localizan junto a una capa de células sin teñir que forman el protodermo (Figura 25 C, D).

Cuadro 10. Efecto del subcultivo de callos embriogénicos en un medio fresco con la mitad de la concentración de 2,4-D del medio inicial, sobre la frecuencia de formación de callo embriogénico y el número de estructuras embriogénicas formadas sobre cada callo.

Ciclo	Tratamiento [2,4-D]	Callo embriogénico (%)	Estructuras embriogénicas por callo
1	0.6 mM	60.3 b	8.2 b'
	0.3 mM (3 meses + 1)	76.0 a	20.7 a'
		C.V.= 0.131 R ² = 0.922	C.V.= 0.482 R ² = 0.970

Letras distintas denotan diferencias significativas (ANOVA, $p \leq 0.05$).

Cuadro 11. Efecto del subcultivo de callos embriogénicos en un medio fresco con la mitad de la concentración de 2,4-D del medio inicial, sobre la frecuencia de formación de callo embriogénico y el número de estructuras embriogénicas formadas sobre cada callo.

Ciclo	Tratamiento [2,4-D]	Callo embriogénico (%)	Estructuras embriogénicas por callo
1	0.6 mM	58.3 b	5.3 b'
	0.3 mM (2 meses + 1)	67.1 a	25.8 a'
		C.V.= 0.091 R ² = 0.661	C.V.= 0.728 R ² = 0.980
2	0.6 mM	47.9 b	5.3 b'
	0.3 mM (2 meses + 1)	65.1 a	25.53 a'
		C.V.= 0.178 R ² = 0.881	C.V.= 0.719 R ² = 0.994

Letras distintas denotan diferencias significativas (ANOVA, $p \leq 0.05$).

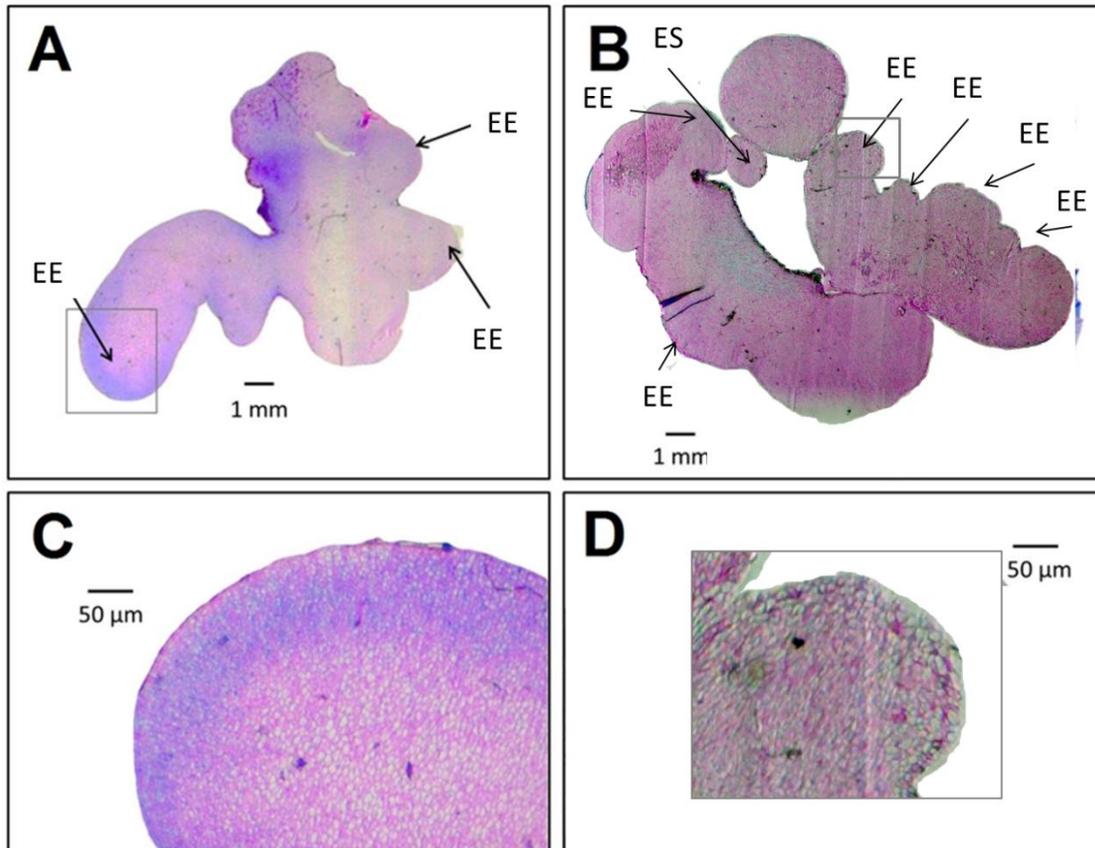


Figura 25. Cortes histológicos de callos embriogénicos obtenidos después de 90 días en cultivo sin (A) y con subcultivo en medio fresco con la mitad de la concentración de 2,4-D (B); la amplificación correspondiente (40X), de las áreas señaladas en recuadros son mostradas en (C) y (D); EE: Estructuras embriogénicas, ES: Embrión somático.

Formación de embriones somáticos y regeneración de plántulas

Estas dos variables solo fueron medidas durante el último ciclo del trabajo puesto que en los ciclos anteriores, el material obtenido fue requerido para la multiplicación del callo embriogénico. Durante este proceso, los embriones somáticos globulares se empiezan a formar incluso antes de los 90 días de cultivo en el medio I, sin embargo, su aparición fue promovida cuando los callos embriogénicos fueron transferidos al medio I modificado.

Durante el primer experimento se obtuvo la formación de 8.7 embriones somáticos por callo en el grupo control, mientras que con la aplicación del tratamiento experimental, esta cifra aumentó a 12.5 embriones somáticos por callo embriogénico (Cuadro 12)

Cuadro 12 Efecto del subcultivo en 2,4-D [0.5] sobre el número de embriones somáticos generados por callo.

Tratamiento [2,4-D]	Embriones por callo
0.6 mM	8.7 a
0.3 mM (3 meses + 1)	12.5 a
	C.V. = 0.237
	R ² = 0.694

Letras distintas denotan diferencias significativas (ANOVA , $p \leq 0.05$).

Durante el segundo experimento, los embriones somáticos obtenidos por callo embriogénico alcanzaron las cifras de 8.8 embriones en el grupo testigo y 13.6 embriones en el grupo experimental (Cuadro 13). En este punto, los callos embriogénicos fueron transferidos al medio 3 para la germinación de los embriones. Después de 3 meses, los embriones en ambos tratamientos germinaron y empezaron a desarrollar brotes (Figura 26 A, B). Posteriormente, los callos fueron transferidos a medio 4 por 2 meses y en el testigo se habían obtenido 4 plántulas en desarrollo por cada callo, mientras que en grupo experimental se habían obtenido 6.8 plántulas en desarrollo por cada callo (Cuadro 13).

Cuadro 13. Efecto del subcultivo en 2,4-D [0.5] sobre el número de embriones somáticos generados por callo y el número de brotes obtenidos por callo. Los callos fueron cultivados por 2 meses en medio para la formación de embriones y posteriormente en medio para el desarrollo de brotes durante 2 meses.

Tratamiento [2,4-D]	Embriones por callo	No. de callos cultivados	Plántulas en desarrollo por callo
0.6 mM	8.8 a	21	4.2
0.3 mM (2m + 1)	13.6 a	35	6.8
	C.V. = 0.257		
	R ² = 0.836		

Letras distintas denotan diferencias significativas (ANOVA , $p \leq 0.05$).

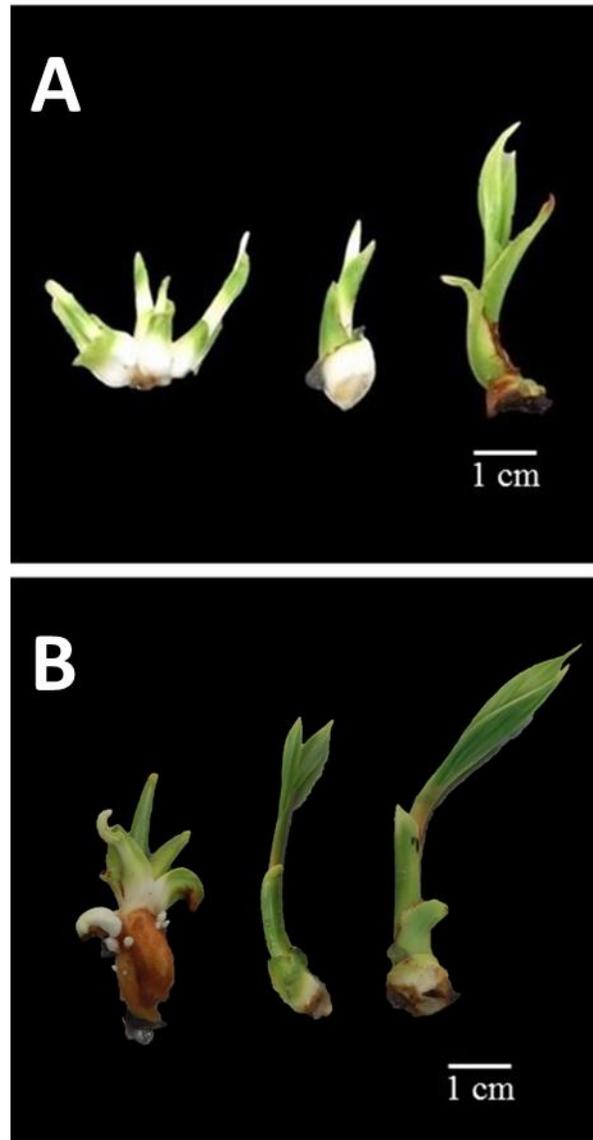


Figura 26. Imagen comparativa de desarrollo posterior a la germinación entre el grupo testigo (A) y el tratamiento con subcultivo en 2,4-D [0.5].

Expresión de CnSERK

La expresión de CnSERK fue evaluada durante la formación de callo embriogénico. La expresión relativa (

Figura 27) en el grupo control incrementa de 1.36 unidades en el día 15 hasta 7.34 unidades en el día 45, con un aumento hasta las 25.12 unidades para el día 60, posteriormente se observa una caída hasta las 2.05 unidades en el día 75 que se reduce, aunque sin diferencia significativa, hasta las 0.29 unidades en el día 90. En el caso del grupo experimental, se observa un comportamiento igual al testigo hasta el día 45 pasando de 1.26 unidades en el día 15 a 7.94 unidades para el día 45, hacia el día 60 se observa una disminución hasta las 0.71 unidades y un incremento hasta las 31.86 unidades para el día 75 que se sostiene en las 24.77 para el día 90.

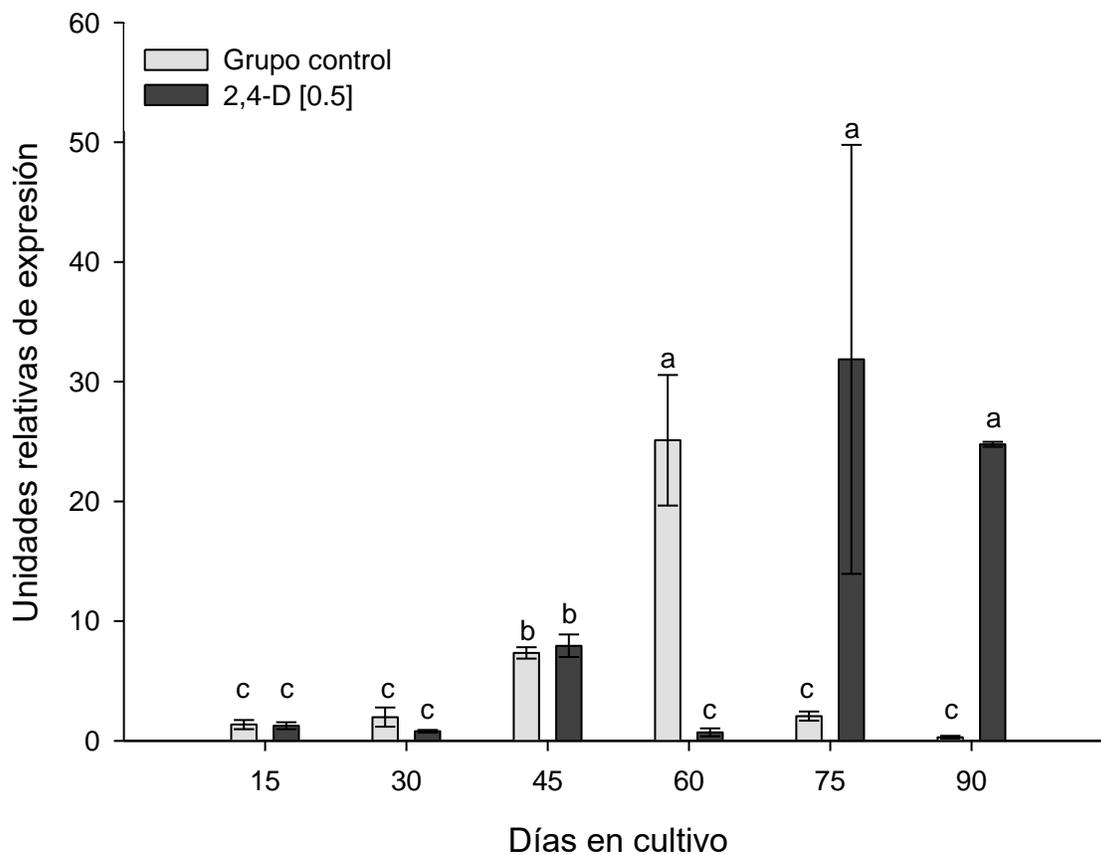


Figura 27. Perfiles de expresión relativa de CnSERK durante el desarrollo de callo embriogénico, a partir de estructuras embriogénicas de Cocos nucifera, con y sin subcutivo en medio fresco con la mitad de la concentración inicial de 2,4-D. Los datos presentados son el promedio de 3 muestras empleadas por triplicado ($n = 9$) y fueron analizados con una ANOVA $p \leq 0.05$. Las barras marcadas con letras distintas son estadísticamente significativas de acuerdo a la prueba de Tukey.

4. DISCUSIÓN

Se ha descrito con anterioridad la relevancia del 2,4-D como componente imperativo para la inducción de la embriogénesis somática de cocotero. (Chan *et al.*, 1998; Pérez-Núñez *et al.*, 2006), Es por ello que en este trabajo se evaluó la posibilidad de incrementar gradualmente la disponibilidad de 2,4-D en el medio de cultivo, valiéndonos de un subcultivo como un segundo pulso de auxina.

Los resultados obtenidos pueden explicarse parcialmente con base en reportes previos que señalan que dando por hecho que las células somáticas de una planta contienen toda la información genética necesaria para crear una planta completa y funcional, la inducción de la embriogénesis somática debe depender de la terminación del patrón de expresión génica vigente en el explante y su sustitución por un programa embriogénico de expresión genética.

En este sentido, se han propuesto dos modos de regulación: Previamente se ha propuesto que la metilación del ADN, que es influenciada por auxinas, es la responsable de esta regulación (LoSchiavo *et al.*, 1989). Mientras que por otro se ha considerado que los reguladores del crecimiento vegetal en conjunto con condiciones estresantes juegan un papel fundamental como mediadores de la cascada de transducción de señales. Sin embargo, independientemente de la manera en que ocurra la regulación, se cree que esta diferencia está dictada por la sensibilidad celular a la auxina o a la presencia de diferentes receptores de auxina de los cuales uno es responsable de la división celular y otro de la división asimétrica necesaria para iniciar el proceso embriogénico (LoSchiavo 1994) y el resultado puede generar una serie de divisiones celulares que inducen el crecimiento de un callo desorganizado o el de uno polarizado que será capaz de dar lugar a un embrión (Dudits *et al.*, 1995).

Por lo tanto, es importante considerar que los cambios en la concentración de 2,4-D pueden cumplir con los requisitos para ambas propuestas y que además es posible que se presente una acumulación de 2,4-D en el tejido tras varios ciclos de multiplicación, con lo cual se atenuaría el estrés al que se someten los explantes, de manera que al colocar los

callos embriogénicos en un medio reducido en auxina se incrementa la magnitud de la diferencia

Los resultados obtenidos muestran que la estrategia propuesta tiene el potencial para incrementar la eficiencia del protocolo que actualmente se sigue rutinariamente para propagar *Cocotero* en el laboratorio de cocotero del CICY, así como en la biofábrica de la misma institución, instalada en el Parque Científico y Tecnológico de Yucatán.

Con base en los datos generados, es posible calcular la eficiencia teórica (Cuadro 14) del protocolo en su estado actual y con la aplicación de los tratamientos evaluados en este trabajo. Partiendo de dichos cálculos es posible establecer que la magnitud del incremento alcanzable es de hasta 320.94 veces el potencial actual del protocolo.

Cuadro 14. Cálculo teórico del potencial para incrementar la eficiencia del protocolo de micropropagación de cocotero cuando se incluye un subcultivo en medio I modificado.

Partiendo de 1,000 callos embriogénicos, después de 1 año:

	Testigo	3 meses + 1	2 meses + 1
<i>Formación de C.E. (%)</i>	60.00	76.00	65.00
<i>E.E./ C.E.</i>	8.20	20.70	25.80
<i>E.S/ C.E.</i>	8.80	13.60	13.60
<i>Ciclos/año</i>	4.00	3.00	4.00
<i># de explantes</i>	976,583.00	5,123,163.56	187,204,583.80
<i># de C.E.</i>	585,949.80	3,893,604.30	121,682,979.50
<i># de E.S.</i>	5,156,358.25	52,953,018.52	1,654,888,521.07
<i># de brotes</i>	1,031,271.65	10,590,603.70	330,977,704.21
<i>Factor de multiplicación (Brotes)</i>	1	10.27	320.94

Si bien, los resultados obtenidos han sido positivos, resulta particularmente importante monitorear los efectos de la aplicación del tratamiento propuesto en el mediano y largo plazo, ya sea para evitar posibles complicaciones como la variación somaclonal o incluso para optimizar las condiciones y seguir incrementando la eficiencia del protocolo.

CAPÍTULO III

ADDITION OF IONOPHORE A23187 INCREASES THE EFFICIENCY OF *Cocos nucifera* SOMATIC EMBRYOGENESIS

Authors

Gustavo Rivera-Solís, Luis Sáenz-Carbonell, María Narváez, Guillermo Rodríguez and Carlos Oropeza^{1*}

Journal: 3Biotech

Status: Under Review

DESCRIPCIÓN DEL CAPÍTULO

La importancia del cocotero está creciendo y la replantación es urgente en todo el mundo y la propagación de semillas no es lo suficientemente eficiente como para hacer frente a esta tarea. La micropropagación vía embriogénesis somática es una alternativa y ya se han logrado avances importantes, sin embargo, es necesario mejorar aún más la eficiencia. En este capítulo, se reporta el efecto del tratamiento de explantes de estructura embriogénica de coco (derivados de callos embriogénicos) con el ionóforo de calcio A23187 (0, 1, 5, 10 μM) para promover la embriogénesis somática en condiciones *in vitro*. Los resultados no mostraron un aumento en el porcentaje de explantes que formaban callos embriogénicos, pero con ionóforo (1 μM) se observaron incrementos en la formación de estructuras embriogénicas por cada callo (2.8 veces), de embriones somáticos por callo (1.5 veces) y de plántulas en desarrollo por callo (1.5 veces). El tratamiento con ionóforo también promovió un cambio de patrón de la expresión del gen CnSERK durante la formación del callo embriogénico. Se propone que si el uso del tratamiento con ionóforo A23187 se combina con un proceso de multiplicación de callos embriogénicos podría haber un aumento potencialmente mayor en la eficacia de la formación de embriones somáticos y plántulas de coco.

1. ABSTRACT

Coconut importance is growing and replanting is urgent worldwide and seed propagation is not efficient enough to deal with this task. Micropropagation by somatic embryogenesis is an alternative and important advances have been achieved already but it is necessary further improvement in efficiency. The present study reports the effect of treatment of coconut embryogenic structure explants (derived from embryogenic callus) with the calcium ionophore A23187 (0, 1, 5, 10 μM) to promote somatic embryogenesis under *in vitro* conditions. The results showed no increase in the percentage of explants forming embryogenic callus, but with 1 μM ionophore there were increases in the formation of embryogenic structures per callus (2.8 fold), of somatic embryos per callus (1.5 fold) and of developing plantlets per callus (1.5 fold). The ionophore treatment also promoted a change of pattern of the expression of the *CnSERK* gene during embryogenic callus formation. It is proposed that if the use of ionophore A23187 treatment is coupled with an embryogenic callus multiplication process there could be a potentially greater increase in the efficiency of the formation of somatic embryos and plantlets of coconut.

Key words Coconut; somatic embryogenesis; calcium ionophore A23187; *CnSERK*

2. INTRODUCTION

Cocos nucifera L., commonly known as coconut palm, is one of the most valued tropical species because of its undisputed importance as an ornamental component of the landscaping of beach touristic destinations. But more importantly, the integral use of the coconut palm is the basis of its social and economic relevance, since it is the source of a wide range of ecological, cultural and commercial benefits for about 90 countries that cultivate it in approximately 11 million hectares around the world (FAO 2016), consequently it has been called the “tree of life”. Over the last decade, coconut-derived products, such as bottled coconut water, have gained an increasing attention because of

their exponentially growing sales in Brazil, USA and Europe (Roolant 2014). Unfortunately, the high incidence of devastating phytoplasma diseases affecting coconut and other palm species (Ntushelo and Harrison 2013); (Gurr *et al.*, 2016) and the lack of renovation of old age of most coconut plantations are significantly diminishing the areas dedicated to its cultivation and their productivity (Batugal *et al.*, 2005). Hence, there is an urgent need for replanting with coconut palms selected for disease resistance and productivity. Traditional replanting based on seed propagation is not going to be fast enough to accomplish the huge task required, a different approach has to be used and micropropagation through somatic embryogenesis appears to be the most reliable alternative (Oropeza *et al.*, 2005).

There are several studies reporting *in vitro* somatic embryogenesis protocols for different plant species and also that their performance can be influenced by different factors, including genotype (Lu *et al.*, 1983; Moon *et al.*, 2013; Jiao *et al.*, 2018), the kind and maturity of donor tissue (Moon *et al.*, 2013), the choice of growth regulators (Lazzeri *et al.*, 1987), the carbon source (Lu *et al.*, 1983; Von-Arnold 1987; Moon *et al.*, 2013), the nitrogen source (Von-Arnold 1987; Hita *et al.*, 2003), polyamines (Jiao *et al.*, 2018), the basal medium strength (Von-Arnold 1987), the gelling agent, density of the culture (Moon *et al.*, 2013), the subculture frequency (Lazzeri *et al.*, 1987) and the wavelength of the light the cultures are exposed to (Vidican and Cachita-Cosma 2010).

In the case of coconut several laboratories have worked on the development of somatic embryogenesis protocols (Nguyen *et al.*, 2015; Sáenz *et al.*, 2016). Different media formulations have been tested using different sources of explant and the best responses have been obtained using inflorescence (Hornung and Verdeil 1999) and plumule (Sáenz *et al.*, 1999) explants. And a very important requirement in the media formulation to obtain responses, is the presence of an auxin, commonly 2,4-D (Sáenz *et al.*, 1999). Our laboratory reported in 1998 (Chan *et al.*, 1998) a direct somatic embryogenesis and plant regeneration protocol using plumule that was reproducible and relatively efficient. Over the following years, improvement of the performance of this protocol has been achieved with two main direct approaches. One is the modification of the media formulation, such as the addition of different growth regulators as brassinosteroids (Azpeitia *et al.*, 2003);

gibberellic acid, (Montero-Cortés *et al.*, 2010b); cytokinins, (Montero-Cortés *et al.*, 2011b) and the choice of the type of activated charcoal (Sáenz *et al.*, 2010). The other approach is the modification of the conditions and configuration of the process, with changes such as the incorporation of the embryogenic callus multiplication and secondary somatic embryogenesis (Pérez-Núñez *et al.*, 2006). The second approach in particular has allowed the potential to produce tens of thousands of somatic embryos with high rates of conversion into plantlets starting from a few explants. A process derived from the two approaches is currently under scaling-up in Mexico (Oropeza *et al.*, 2016). However, regardless of the progress achieved there is a constant need to further improve coconut micropropagation in order to deal with the massive production of palms required for the urgent renewal of coconut plantations.

In addition to the direct approaches for improving the performance of coconut micropropagation, efforts have been made to gain basic knowledge to understand processes underlying the control of coconut somatic embryogenesis. As mentioned above, it is acknowledge that the auxin 2,4-D plays an essential role for the induction of somatic embryogenesis of coconut whether from plumule explants (Rajesh *et al.*, 2016) or rachilla explants (Sandoval-Cancino *et al.*, 2016), and this could be mediated by the regulation of gene expression (Nguyen *et al.*, 2015; Rajesh *et al.*, 2016; Sáenz *et al.*, 2016). A particular gene of interest is *CnSERK*, a *SERK*-like gene that was reported in coconut as showing a differential pattern of expression during coconut embryogenic callus formation, and it was proposed as a marker for cells competent for the formation of somatic embryos in coconut tissue cultures (Pérez-Núñez *et al.*, 2009), as it is considered for other plant species (Somleva *et al.*, 2000; Hecht *et al.*, 2001). In wheat cultures it has been reported that 2,4-D induction of somatic embryogenesis is mediated by the regulation of gene expression by calcium calmodulin complex (Mahalakshmi *et al.*, 2007). Accordingly, treatment with A23187 ionophore, that facilitates the transport of calcium across the plasma membrane (Dedkova *et al.*, 2000) promotes somatic embryogenesis in cultures of wheat (Mahalakshmi *et al.*, 2007) and coffee (Ramakrishna *et al.*, 2011). Therefore, the present study reports the effect of treatment with ionophore A23187 on the formation of embryogenic callus, embryogenic structures and somatic embryos, and also on the expression of *CnSERK* during the formation of embryogenic callus.

3. METHODS

3.1 Plant material

Explants used were embryogenic structures from embryogenic calli that were obtained from the coconut *in vitro* collection at the Clonal Micropropagation Laboratory, Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY), Mexico. These calli were originally produced from plumule explants of the Mexican Pacific Tall (MXPT) ecotype according to the protocol previously reported (Pérez-Núñez *et al.*, 2006).

3.2 Culture media and culture conditions

All media and culture conditions were according to Pérez-Núñez *et al.*, (2006). A basal medium was prepared with Y3 formulation added with gel-rite (3 g/l), sucrose (5%) and activated charcoal (2.5 g/l). The medium for the induction of embryogenic callus (medium 1) was basal medium with 0.6 mM 2,4-dichlorofenoxiacetic acid (2,4-D). The medium for the induction of somatic embryo formation (medium 2) was basal medium with 0.3 mM 2,4-D. The medium for the somatic embryo germination (medium 3) was basal medium with 0.006 mM 2,4-D and 0.3 mM 6-benzylaminopurine (BAP) and 0.0028 mM gibberellic acid (GA₃). The medium for plantlet formation (medium 4) was basal medium with 0.006 mM 2,4-D and 6 BAP (300 mM). Media pH was adjusted to 5.75 before autoclaving (120° C for 20 minutes). All chemical used are from Sigma-Aldrich, USA.

Embryogenic callus formation was obtained from embryogenic structure explants cultured on medium 1 (10 ml in a 45 ml flask) for 3 months under dark conditions. At the end of this period the process was repeated. Somatic embryo formation was obtained on embryogenic calli cultured on medium 2 (25 ml in a 150 ml flask) for 1 month under dark conditions. Germination of the somatic embryos formed on embryogenic callus was

obtained by culturing these callus in medium 3 (25 ml in a 150 ml flask) for 3 months under 16-h photoperiod ($45\text{--}60 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ photosynthetic photon flux density, PPF) provided by TriPhosphor daylight tubes (F32T8, 6500 K, 32 W, MAGGMR, Mexico). Shoot development was obtained by culturing calli with germinated somatic embryos on medium 4 (25 ml in a 150 ml flask) for 2 months under 16-h photoperiod. Then cultures were subcultured 3 times into fresh medium 4. During this 8 month period, as shoots grew they were separated from the callus and cultured as isolated shoots for further development. All cultures were kept at $27 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$.

3.3 Ionophore A23187 trials

Embryogenic structure explants were treated with ionophore A23187 (Sigma-Aldrich, USA) and calcium ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, Fermont, Mexico) to evaluate their effect on the formation of embryogenic callus in three trials.

In the first trial 21 treatments were tested. Each treatment consisted of placing three explants on medium 1 with calcium at different concentrations (0, 0.5, 1, 3 or 4 mM) and combined with an application of 10 μL of a solution of ionophore A23187 at different concentrations (50, 100, 200 or 400 μM) deposited with a micropipette on each explant evaluated. The different combinations tested are shown in Table 1.

For the second trial 5 treatments were tested in which calcium was not added to the medium, because of results obtained in the first trial (see Results section). Each treatment consisted of placing three explants on medium and applying 10 μL of a solution of ionophore A23187 (0, 1, 5 or 10 μM) deposited with a micropipette on each explant evaluated. For the third trial the embryogenic structures used as explants were obtained from the calli formed during the second trial with the treatment producing the best results, hence three explants were placed on medium 1 applying 10 μL of ionophore A23187 (1

μM) deposited with a micropipette on each explant evaluated. For each of the three trials explants were cultured during three months in dark conditions at 27 ± 2 °C.

The embryogenic calli obtained from the third trial were used to evaluate the formation of somatic embryos, their germination and postgerminative development. Media and culture conditions used were as described above in “Culture media and culture conditions”.

3.4 Histology

The histological analysis was according to Buffard-Morel *et al.*, (1992) as modified by Sáenz *et al.*, (2006) and Montero-Cortés *et al.*, (2010a). Tissue samples were immersed in a solution of phosphate buffer (pH 7.2) with 4% (w/v) paraformaldehyde during 24 hours. The samples were then dehydrated by placing them in a water solution of ethanol with stepwise increases in ethanol from 30% to 100% during 7 hours. Then samples were imbibed with the polymeric resin JB-4R (Polyscience, Warrington, PA) and then produced 5 μm thick sections using a HM 325 microtome (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA), finally the sections were dyed with periodic acid-Schiff (PAS) reagent and protein-specific Naphtol Blue-Black (Fisher 1968).

3.5 Photographic documentation

Embryogenic calli and histological sections were observed under a stereoscope SMZ-168 TLED and photographs were captured with a Moticam 580 (Motic, British Columbia, Canada). Since embryogenic calli or histological sections did not fit into the vision field provided of Moticam 580, a series of photographs (≈ 60) were captured to obtain composite images with Image Composite Editor 2.0 (Microsoft Research 2017).

3.6 Statistical Analysis

A completely randomized design was employed for this experiment. Data presented corresponds to averages and each explant was treated as an experimental unit and as a repetition. Each experimental group has a $n = 63$ as it is indicated in each corresponding figure or table. Data obtained was tested in a variance analysis (ANOVA) and the procedure for average comparisons (Tukey test, $P < 0.05$) was obtained with the SAS University Edition statistical software.

3.7 TaqMan/Real-Time PCR assay

A TaqMan probe was designed considering the less conserved region (Figure 28) of the sequence gen *CnSERK* (acc. Number AY791293.2) reported by (Pérez-Núñez *et al.*, 2009). This TaqMan probe was used in the expression analysis of *CnSERK* during embryogenic callus formation from embryogenic structure explants for 90 days initiating with or without the application of ionophore A23187 (1 μ M) on the explants.

EgSERK1	552	-TTACTTGTAATAATGACAAATAGTGTTCATTAGAG-----	584	---TTGATCTTGAA
PdPredSERK2X1	556	TTACTTGTAAATAATGACAAATAGTGTTCATTAGAG-----	588	---TTGATCTTGAAA
PdPartSERK2	118	ATT----TGCT--TTAAA-----	129	---TTGAAA---TCTTTCCTCTGAGGAAG
PdSERK1	224	ATGACAAATAGTGTATTAGAG-----	244	---TTGATCTTGAAAATGCACAATT---
EgPredSERK2	606	---TTACTTGTAAATAATGACAAATAGTGTATTAGAG-----	638	---TTGATCTTGG
CnSERK	206	ATGACAAATAGTGTATTAGAG-----	226	---TTGATCTTGGAAAATGCACAAGTT---
PdPredSERK2X2	116	CAATACTGTCATTAGAGTCTATGT	139	GCATTGCTTTGGAAAATGCACAGTT-----
PdPseudoSERK	206	ATGACAAATAGTGTTCATTAGAG-----	226	---TTGATCTTGAAAATGCACAAGTT---
EgPredSERK1	574	---TTACTTGTAAATAATGACAAATAGTGTTCATTAGAG-----	606	---TTGATCTTGGAA
PdPredSERK2	604	---TTACTTGTAAATAATGACAAATAGTGTTCATTAGAG-----	636	---TTGATCTTGGAA

Figure 28. Alignment of sequences reported at GenBank with the highest identity percentage to *CnSERK*. The region between the nucleotides on position 230 and 241 was used to design the corresponding TaqMan probe for *CnSERK*. The red marked sequence corresponds to *Cocos nucifera* SERK gene and it is aligned to the top 9 sequences closest in homology reported at the GeneBank. Shaded letters represents highly (black) and moderately (gray) conserved nitrogenous bases; Non-shaded letters represents non-conserved bases.

The samples in triplicate were collected for analysis every 15 days within the 90 day culture period. For RNA extraction a total of 100 mg of culture tissue of each developmental stage were collected using TRIZOL™ (Invitrogen, Cat. No. 15596026). To remove possible DNA contamination from the resulting RNA sample, a Turbo DNA-free™ Kit (Thermo Fisher Scientific, Cat. No. AM1907) was used. Quantification of RNA samples were accomplished using Nanodrop 1000 (Thermo Scientific, USA). The first chain of cDNA was amplified by reverse transcriptase-PCR from 1 µg of total RNA using random primers (Thermo Fisher Scientific, Cat. No. 48190011) and the SuperScript™ III Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific, Cat. No. 18080093) according to the instructions of the supplier. To verify the quality of the cDNA a 187 bp fragment was amplified employing the 18S gene probe (Euk18S rRNA) (Applied Biosystems, Cat. No. 4333760T).

The expression levels of the *CnSERK* transcripts were determined by qRT-PCR. The mixture used for this purpose had a final volume of 20 µL and was composed by 1 µL of cDNA, 10 µL of Maxima Probe qPCR Master Mix (2X) (Thermo Fisher Scientific, Cat. No. K0261), and 1 µL of the Taq-Man *CnSERK* probe. The normalizer *Euk 18S rRNA* (Applied Biosystems, Cat. No. 4333760T) was used as internal control to normalize the expression data obtained. Each reaction was performed in triplicate in a Rotor-Gene Q (QIAGEN, Hilde, Germany) and conditions were set as follows: 2 minutes at 50°C, 10 minutes at 95°C, 20 minutes at 72°C, 10 minutes at 95°C followed by 45 cycles of 15 seconds at 95°C and 1 minute at 62°C. The resulting data were analyzed according to the $2^{-\Delta\Delta ct}$ method (Livak and Schmittgen 2001).

4. RESULTS

4.1 Embryogenic callus formation

In the three trials carried out to study the effect of ionophore A23187 on coconut somatic embryogenesis, depending on the treatment a certain percentage of explants developed embryogenic callus (as defined by Sandoval-Cancino *et al.*, 2016). In this developmental process, starting with embryogenic structures as explants (Figure 29 A) that after 45 days

formed a callus that starts developing earlike structures, refer to as translucent structures (Figure 29 A). By day 60 the callus has grown and has more translucent structures with maller pearly white structures, or embryogenic structures, growing on them (Figure 29 A).

Then after 90 days of culture the embryogenic structures became more abundant (Figure 29 B) and at this stage the callus is refer to as embryogenic callus. This developmental process for the formation of embryogenic callus occurred with explants cultured with or without ionophore A23187.

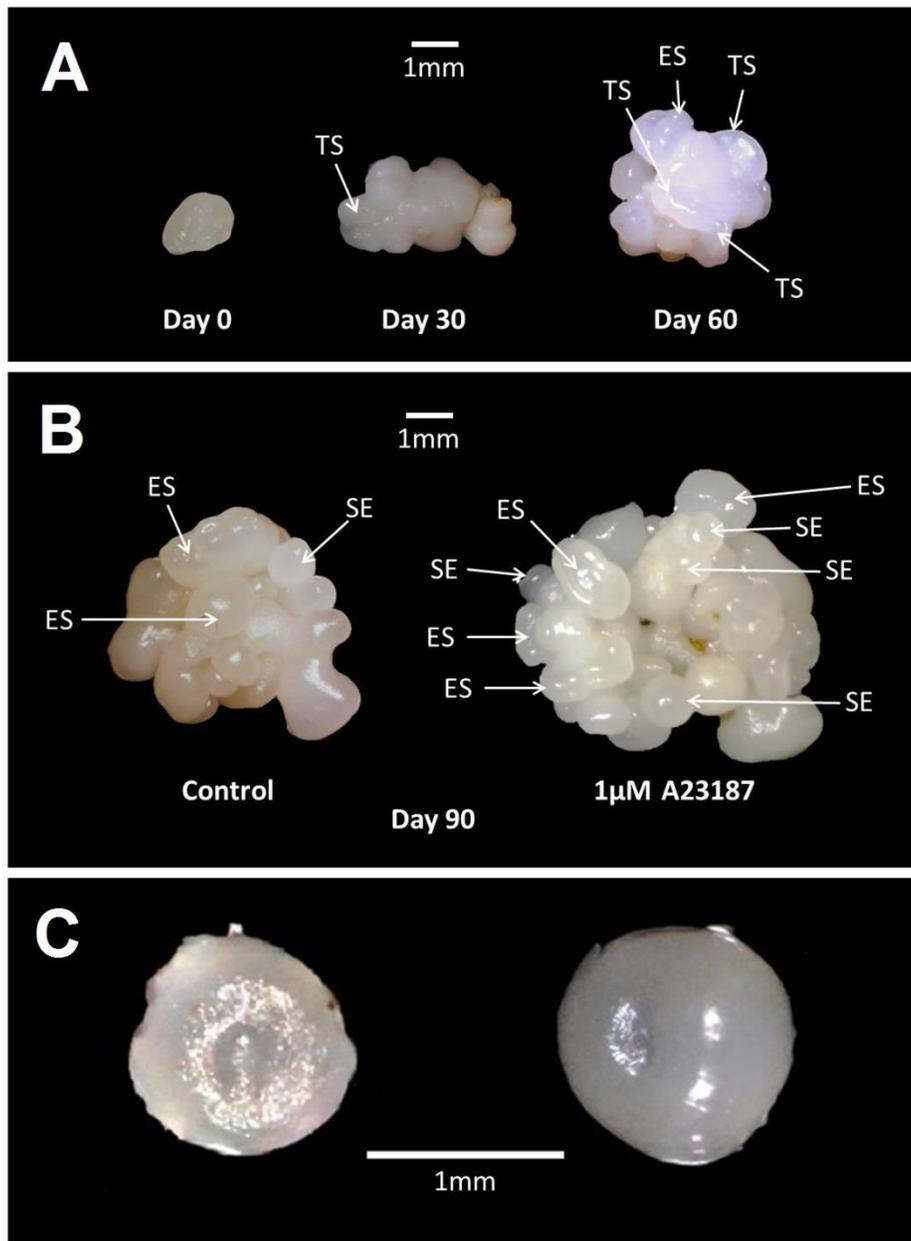


Figure 29. Developmental stages during embryogenic callus formation from embryogenic structures explants (A) after 30, 60 days; (B) fully formed embryogenic calli formed at day 90 of culture without (Control) and with 1µM ionophore A23187; and (C) corresponding globular somatic embryos. TS: translucent structures. ES: embryogenic structures. SE: somatic embryos.

In the first trial to study the effect of ionophore A23187 on embryogenic callus formation, 21 different combinations (Table 15) of concentrations of calcium (0, 0.5, 1, 3 and 5 mM) and A23187 ionophore (0, 50, 100, 200 and 400 μ M) were tested on embryogenic structure explants cultured for 90 days and after this period embryogenic calli formed from some of the explants. With the control treatment without calcium and without A23187 ionophore, the percentage of explants producing callus was 60% (Table 15). With the other 20 treatments combining different concentrations of calcium and of the ionophore A23187, the percentage of embryogenic callus obtained was lower than that of the control, ranging from 0 to 20% in most of the 20 treatments and only in one was 40% (Table 15). When considering only the treatments with calcium without the ionophore A23187, the percentage ranged from 6.5 to 20% (Table 1). Several of the explants that did not produce callus showed necrosis. In some of the treatments the percentage of explants with necrosis was as high as 93%.

Table 15. Effect of different treatments combining calcium with ionophore A23187 on the formation of embryogenic callus from embryogenic structure explants cultured for three month in medium 1.

Ca ²⁺ (mM)	A23187 (μM)	Embryogenic callus (%)	Necrosis (%)
0	0	60.0	0.0
0.5	0	6.7	53.3
	50	13.3	40.0
	100	40	26.7
	200	13.3	40.0
	400	0.0	73.3
1	0	20.0	26.7
	50	0.0	53.3
	100	0.0	40.0
	200	0.0	86.7
	400	6.7	93.3
3	0	20.0	0.0
	50	6.7	6.7
	100	20.0	26.7
	200	0.0	0.0
	400	0.0	86.7
5	0	6.7	80.0
	50	6.7	0.0
	100	0.0	0.0
	200	0.0	0.0
	400	6.7	0.0

Considering the negative effect of calcium on embryogenic callus formation in the first trial, for the second trial no calcium was included and application of ionophore A23187 was tested at lower concentrations (0, 1, 5 and 10 μM). In the control treatment with no addition of ionophore A23187 the percentage of explants forming embryogenic callus was 58% (Figure 30). When ionophore A23187 was used, with 5 and 10 μM there was no improvement in relation to the control treatment, but with 1 μM the percentage of callus formation was 65% but the difference was not significant (Figure 30).

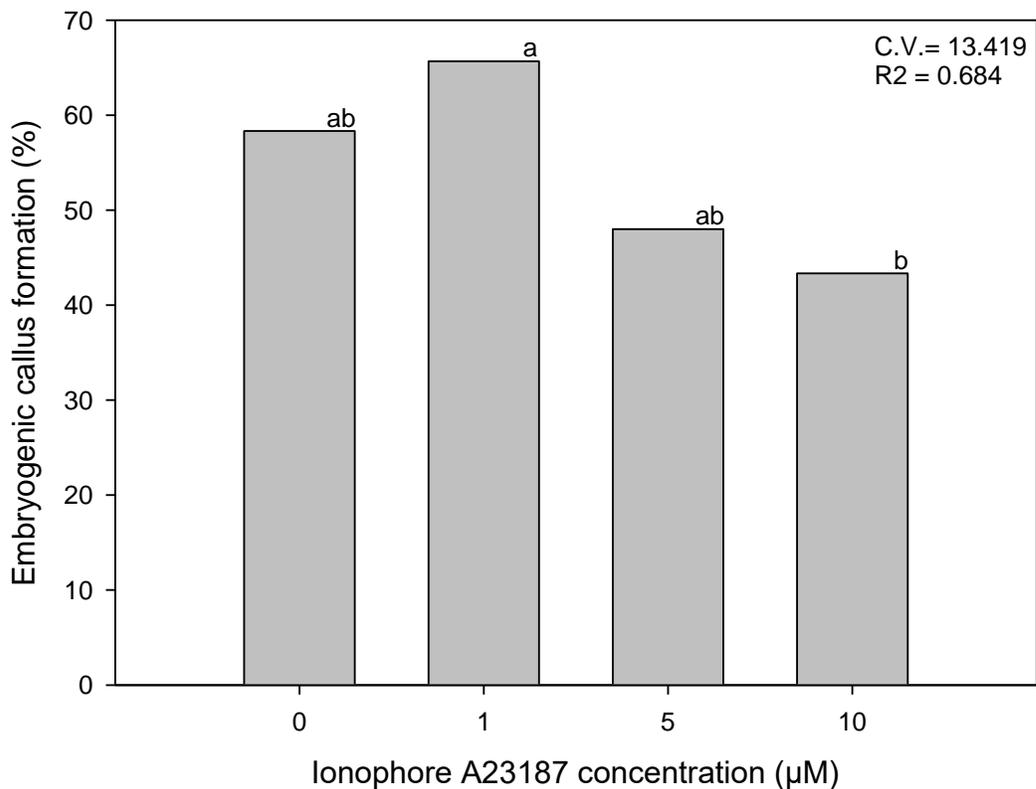


Figure 30. Effect of treatment of embryogenic structures explants with ionophore A23187 (0, 1 μM , 5 μM and 10 μM) on the rate of embryogenic callus formation. Different letters represent statistical differences among groups.

A third trial was carried out, this time only testing 1 μM ionophore A23187 with no calcium, the explants were the embryogenic structures from the calli formed in second trial. In this case in the control treatment the percentage of explants producing embryogenic callus was 47.9% and it was 61.8% for the treatment with 1 μM ionophore A23187 (Table 16) and this difference was significant ($P \leq 0.05$).

Table 16. Effect of treatment of embryogenic structure explants with ionophore A23187 on the frequency of the formation of embryogenic callus and the number of embryogenic structures formed per callus during a three month culture in medium 1.

Trial	Treatment	Embryogenic callus (%)	Embryogenic structures per callus
1	Control	58.3 a	5.3 b'
	A23187 (1 μM)	65.7 a	18.1 a'
		C.V.= 6.620 $R^2 = 0.500$	C.V.= 13.023 $R^2 = 0.963$
2	Control	47.9 b	5.3 b'
	A23187 (1 μM)	61.8 a	11.4 a'
		C.V.= 9.279 $R^2 = 0.841$	C.V.= 38.805 $R^2 = 0.488$

Different letters denote significant differences (ANOVA, $p \leq 0.05$).

4.2 Embryogenic structure formation

When looking at the amount of embryogenic structures per callus, in the second trial it was 5.3 for control treatment and 18.1 for 1 μM ionophore A23187 treatment (3.5 times increase), and in the third trial it was 5.3 for control treatment and 11.4 for 1 μM ionophore A23187 treatment (2.1 times increase) (Table 16). The differences were significant ($P \leq 0.05$). Histological analysis of the calli with both treatments showed that in the periphery of

the embryogenic structures there was accumulation of densely stained cells (Figure 31 A, B). These cells were below a layer of unstained cells forming the protoderm (Figure 31 C, D).

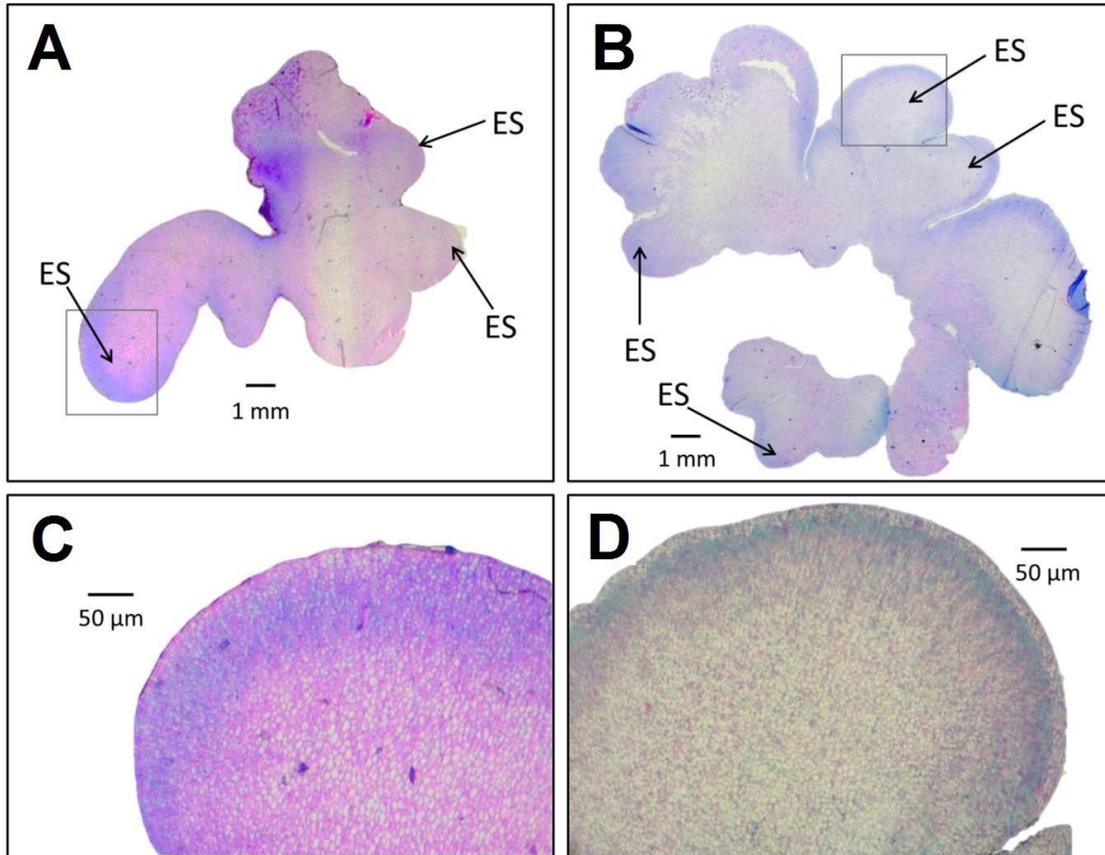


Figure 31. Histological sections of embryogenic calli obtained after 90 days of culture without (A) and with 1 μM ionophore A23187 treatment (B); and corresponding magnified areas (40x) within squares shown in (C) and (D). ES: embryogenic structures.

4.3 Formation of somatic embryos and plantlet regeneration

Formation of somatic embryos was evaluated only in calli formed in third trial. This is because in for the second and third trials the embryogenic calli formed were used as source of embryogenic structure explants to generate new embryogenic callus. Calli

started forming some globular embryos even before the end of the 90 day culture in medium 1 (Figure 29 B, C), but this was promoted when embryogenic calli were subculture in medium 2, and after 1 month, the amount of somatic embryos obtained per callus in control treatment was 8.8 and in the case of treatment with 1 μM ionophore A23187 it was 12.5, the difference was significant ($p \leq 0.05$, Table 17). Calli with somatic embryos were then subcultured to medium 3 for embryo germination. Within 3 months embryos in the two treatments started germinating and forming shoots (Figure 4.5 A, B). Then when calli were subculture to medium 4 and within 2 months there were 4 developing plantlets per callus in control treatment, whereas in the 1 μM ionophore A23187 treatment there were 6 (Table 17).

Table 17. Effect of treatment of embryogenic callus with ionophore A23187 on the number of somatic embryos per callus and the number of shoots per callus. Ionophore A23187 was included in medium 2 (for embryo formation), but not in medium 3 and 4 (for embryo germination and plantlet development, respectively).

Treatment	Embryos per callus	Number of calli cultured	Developing plantlet per callus
Control	8.8 b	21	4.2
A23187 (1 μM)	12.3 a	33	6.6
	C.V. = 29.932 R ² = 0.218		

Different letters denote significant differences (ANOVA , $p \leq 0.05$).

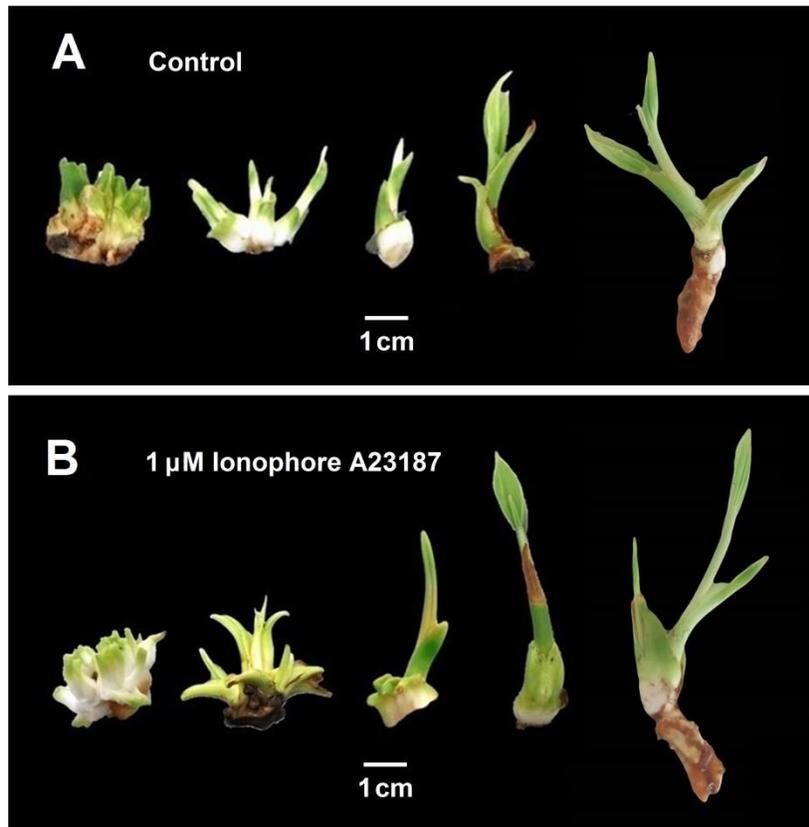


Figure 32. Post-germinative development within 2 months of culture in ionophore-free medium 4. (A) Tissues were previously cultured in ionophore-free media. (B) Tissues were previously cultured in 1 μ M ionophore A23187-containing medium 1 (calli induction) and medium 2 (embryo formation), and ionophore-free medium 3 (embryo germination).

4.4 *CnSERK* expression

The expression of *CnSERK* gen was evaluated during the formation of embryogenic callus. The relative expression (Figure 33) in the control treatment increases from 0.34 units at 15 days to 2.18 units at 45 days, exhibits a second increase to reach 6.93 units at 60 days and decreasing afterwards to 0.64 units at day 75 and remain with no statistically significant change at day 90. In the case of the 1 μ M ionophore A23187 there was also an increase of relative expression from 0.74 units at 15 days to 2.26 units at 45 days and decreases afterwards to 0.41 units at day 60, a second increase is observed reaching 1.04 units at day 75 and 8.28 units at day 90

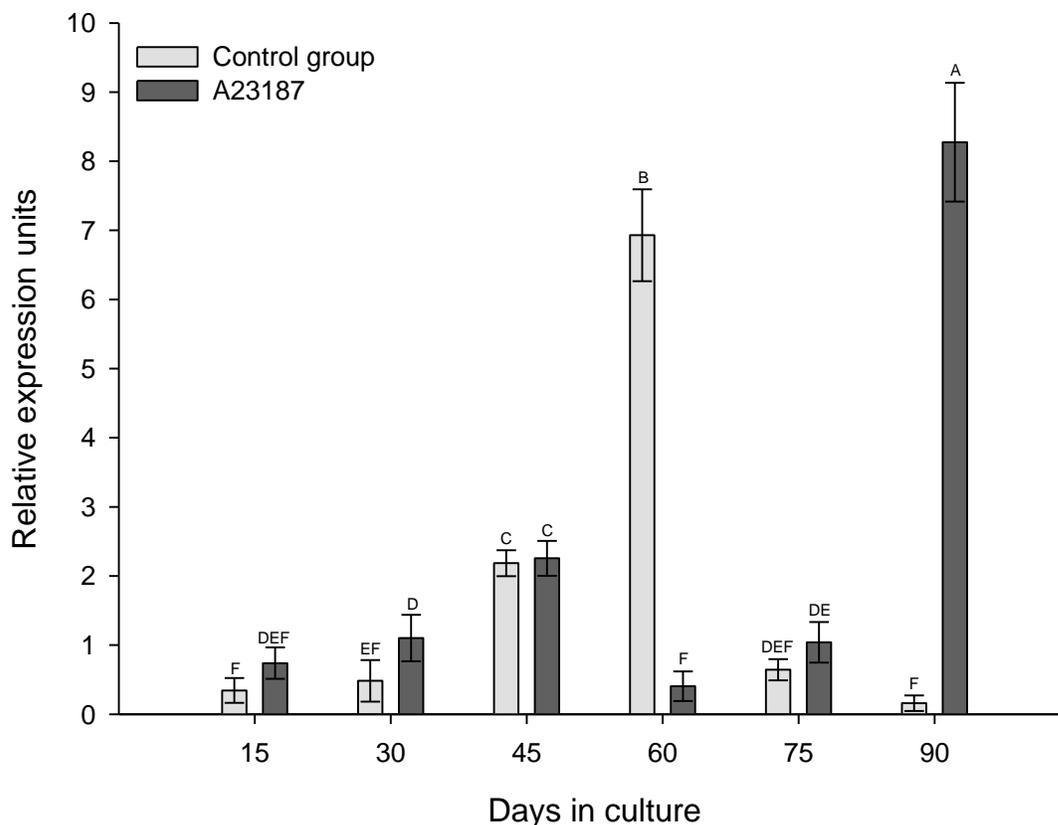


Figure 33. Relative expression profiles of *CnSERK* during embryogenic callus development from of *Cocos nucifera* embryogenic structure explants with and without 1 μ M ionophore A23187 treatment.

5. DISCUSSION

The increasing success of the coconut industry worldwide is unfortunately threaten by the decreasing coconut production due to diseases and old age of plants, therefore there is an urgent need for replanting that accounts for at least one billion plants, that is 50 percent of those currently cultivated in the world. This cannot be accomplished by traditional seed propagation. An alternative to achieved this is by *in vitro* somatic embryogenesis, as proposed Pérez-Núñez *et al.*, (2006) in a process that involves multiplication of embryogenic callus. Any changes that increase the production of callus or the embryogenic structures in the callus, that are used as explants in this process, will impact importantly the outcome.

As previously reported (Chan *et al.*, 1998; Pérez-Núñez *et al.*, 2006), the presence of the synthetic auxin 2,4-D in the culture medium, is central in the process of *in vitro* coconut somatic embryogenesis. Also, as mentioned in the introduction, it has been reported that induction of *in vitro* somatic embryogenesis in plants is mediated by the regulation of gene expression by the complex calcium-calmodulin (Mahalakshmi *et al.*, 2007) and that including a ionophore (A23187) in the culture medium promotes somatic embryogenesis in other plant species (Mahalakshmi *et al.*, 2007; Ramakrishna *et al.*, 2011). Therefore, in the present study it was evaluated whether treating embryogenic structure explants (cultured in 2,4-D containing media) with A23187 ionophore and calcium could promote the formation of embryogenic callus and somatic embryos.

In a first trial, explants were exposed to calcium (0, 0.5, 1, 3 or 4 mM) combined with an application of ionophore A23187 at a concentration range (0, 50, 100, 200 or 400 μ M) reported as successful in increasing the frequency of somatic embryogenesis in *Coffea canephora* (Ramakrishna *et al.*, 2011). In the control treatment (without calcium and ionophore A23187) the percentage of explants forming embryogenic callus was 60%, but in the other 20 treatments it was below 20% and in several of those that did not form callus became necrotic. In those explants forming embryogenic callus, with or without treatment

with calcium and ionophore A23187, the developmental process was the same. By day 30 a callus had developed that was forming earlike white structures (referred to as translucent structures by Sandoval-Cancino *et al.*, 2016), increasing in number by day 60 when pearly white round structures started forming on the translucent structures. These structures were referred to as embryogenic structures by Sandoval-Cancino *et al.*, (2016) and were more abundant by day 90 and most of them became elongated. This type of callus was defined as embryogenic callus according to Sandoval-Cancino *et al.*, (2016). The embryogenic calli formed in the different treatments were identical to those in the control treatment.

Since with treatments with calcium but without ionophore A23187, the percentage of explants forming embryogenic callus was low and that the media used already contains calcium, for further testing calcium was not included in the treatments. Also, since the concentrations of ionophore A23187 tested caused extensive necrosis, testing in the second trial was carried out with lower concentrations (1, 5 and 10 μM) according to Mahalaksmi *et al.*, (2007). In this trial, the percentage of explants treated with 5 and 10 μM ionophore A23187 that formed embryogenic callus was slightly lower than that of the control 58%, whereas with 1 μM there was a slight increase from 58% to 65%, but the difference was not significant. In the third trial, only 1 μM ionophore A23187 was tested and there was also a similar increase, in this case it was significant. The calli formed with ionophore A23187 treatment showed the same type of development as described above for the first trial.

Interestingly, with the 1 μM ionophore A23187 treatment the embryogenic calli formed an increased number of embryogenic structures per callus of 14.7 (average of second and third trial) or 2.5 times that of the control. In both trials the difference was significant. When the embryogenic calli obtained in the third trial were subcultured to medium for somatic embryo formation, the number of somatic embryos formed per callus was 12.3 that is 1.5 times larger than that obtained for the control treatment. Then treatment with 1 μM ionophore A23187 promoted somatic embryogenesis, increasing the efficiency of formation of embryogenic structures and somatic embryos per embryogenic callus. Furthermore, when calli with somatic embryos obtained with 1 μM ionophore A23187 were

subsequently transferred to media to induce germination and further development, the number of developing plantlets per callus was 6.6 or 1.5 times larger than that obtained with the control treatment. Comparative results in cultures (suspension) of other plant species have shown that treatment with ionophore A23187 increases somatic embryo formation 1.7 times in wheat (10 μ M, Mahalakshmi *et al.*, 2007), 3.2 in carrot (2.5 μ M, Takeda *et al.*, 2003) and 17 in coffee (100 μ M, Ramakrishna *et al.*, 2011).

An important observation is that the embryogenic structures formed in the calli in the first trial (control treatment) were used as explants for the second trial and formed embryogenic callus. Similarly, the embryogenic structures formed in the second trial (with control and 1 μ M ionophore A23187 treatments) were used as explants for the third trial (correspondingly for control and 1 μ M ionophore A23187 treatments), again they formed embryogenic callus. Therefore the use of ionophore A23187 does not preclude the capacity of embryogenic structures to form embryogenic callus. The increased formation of embryogenic structures per callus can have a cumulative effect when used as explants in several cycles of callus multiplication as proposed by Pérez-Núñez *et al.*, (2006). For instance if we start with 100 embryogenic structures as explants and produce embryogenic calli from them, isolate the resulting embryogenic structures and repeat the operation twice, when the procedure does not include treatment with ionophore A23187, we would potentially obtain over 540 embryogenic calli and from them over 2,000 plantlets. When this is carried out with ionophore A23187 treatment, the yield would potentially be over 4,000 embryogenic calli and over 25,000 plantlets, ten times greater than when ionophore is not included. It will be very important to test this to determine if this potential could be achieved.

The *SERK* gene expression has been associated in different species with the establishment of somatic embryogenesis in tissues in culture (Schmidt *et al.*, 1997; Somleva *et al.*, 2000; Hecht *et al.*, 2001). In the case of coconut, a previous study on the *CnSERK* expression during embryogenic callus formation showed that it increases at day 30 of culture and again at day 90 and expression is located in the periphery of the embryogenic structures, a region that histological analysis showed the occurrence of

meristematic centers located under the protoderm (Pérez-Núñez *et al.*, 2006). In the present study, histological analysis of embryogenic calli also showed the occurrence of meristematic cells accumulating under the protoderm. Similarly a comparative analysis of the expression of *CnSERK* was carried out during the development of embryogenic callus from explants cultured with or without treatment with ionophore A23187. In both cases there was an increase of the level of expression from the beginning to the middle of the culture period and then it decreased. But there were differences, expression was twice greater during the first 30 days with treatment, then by day 60 it was the opposite, it was over twenty times greater in the control. At the end of the culture period the level of expression reverts again becoming over thirty times greater with the treatment. These results may suggest that in the case of the treatment the larger *CnSERK* expression within the first 30 days may be associated with the larger number of embryogenic structures that formed on the calli and the greater expression at the end could be associated with the increased formation of somatic embryos. The pattern of the expression without treatment is different to that reported by Pérez-Núñez *et al.*,(2006), peaking at 30 days and then again at 90days, but this might be related to the use of different types of explants, plumule explants in that case and embryogenic structure explants in the present case. Important differences between plumule explants and embryogenic structure explants have been observed in their response to adding cytokinins to culture medium for the induction of embryogenic callus formation, inhibitory with plumule explants (CICY, unpublished) and no effect with embryogenic structure explants (Montero-Cortés *et al.*, 2011a).

In conclusion, the present study presents evidence that treating embryogenic structure explants with ionophore A23187 promotes somatic embryogenesis, and although no increase in the percentage of explants forming embryogenic callus was obtained, there were increases in the formation of embryogenic structures per callus, of somatic embryos per callus and of developing plantlets per callus, and also that this effect might be associated with changes on the gene expression, as in the case of *CnSERK*. Also that the quantitative changes produced by the ionophore A23187 treatment could of great practical importance, if this is coupled with a process with several steps of embryogenic callus multiplication potentially resulting in greater efficiencies for somatic embryo and plantlet formation.

CAPÍTULO IV

DISCUSIÓN GENERAL, CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

4.1 DISCUSION GENERAL

La industria del cocotero se encuentra hoy en día ante una situación compleja. Por una parte, en el mercado internacional la demanda por productos derivados de la palma de coco es cada vez mayor, entre los que destacan por su éxito comercial, el agua de coco embotellada, el aceite de coco virgen, derivados de leche de coco (como sustitutos de productos lácteos), etc.; mientras que por otro lado, este éxito se ve sumamente amenazado por la caída progresiva de la producción, principalmente por el envejecimiento de las plantaciones y por la presencia de amenazas fitosanitarias, de particular importancia el ALC. En este sentido, es sabido que el restablecimiento de las plantaciones no se podría lograr por los medios tradicionales de propagación y la alternativa más viable es la micropropagación a través de la embriogénesis somática (Oropeza et al, 2016).

Durante el desarrollo del trabajo expuesto en estas páginas se han obtenido incrementos de hasta el 17.2% en la formación de callo embriogénico, hasta 20.5 estructuras embriogénicas más por cada callo embriogénico y hasta 4.5 embriones somáticos más por cada callo embriogénicos cuando se aplica un subcultivo con la mitad de la concentración (300 μM) de 2,4-D del medio de cultivo inicial; y de hasta 13.9% en la formación de callo embriogénico, hasta 12.8 estructuras embriogénicas más por cada callo embriogénico y hasta 3.5 embriones somáticos más por cada callo embriogénico cuando el material en cultivo es expuesto al ionóforo A23187 (1 μM). Dichos resultados pueden ser de suma importancia para incrementar la eficiencia de un protocolo (Pérez-Núñez *et al.*, 2006) que ya es altamente confiable, eficiente y que al ser la base tecnológica del establecimiento de la biofábrica de vitroplantas de coco que ha establecido el Centro de Investigación Científica de Yucatán en el complejo del Parque Científico y Tecnológico de Yucatán, resulta particularmente importante mantener en mejora continua. De esta forma los presentes resultados representan una oportunidad

para incrementar la rentabilidad de la tecnología y consolidar el funcionamiento de la biofábrica.

Debido a que previamente se ha reportado que el 2,4-D es un componente necesario en el medio de cultivo para inducir la embriogénesis somática en cocotero (Chan *et al.*, 1998; Pérez-Núñez *et al.*, 2006), durante este trabajo se evaluó el efecto que tiene un segundo pulso de 2,4-D, aplicado como un subcultivo en un medio de cultivo con la mitad de la concentración (300 μM) de la que se utiliza habitualmente para inducir la formación de callo embriogénico (600 μM) sobre la formación de callos embriogénicos, estructuras embriogénicas y embriones somáticos.

Los resultados obtenidos han mostrado que el tratamiento tiene el potencial para incrementar la eficiencia del protocolo en el que se centra el estudio, hasta 320 veces, tal como se puede observar en la Cuadro 14.

La respuesta observada se podría explicar de acuerdo a dos modos de regulación de la embriogénesis somática previamente descritos en la literatura:

Por una parte, se ha propuesto que la metilación del ADN, que es influenciada por auxinas, es la responsable de esta regulación (LoSchiavo *et al.*, 1989; Us-Camas *et al.*, 2014; Kumar and Van Staden 2017). En este sentido, en el laboratorio de cocotero, actualmente se realizan investigaciones que prometen confirmar este evento (Osorio-Montalvo, datos no publicados).

Por otro se ha considerado que los reguladores del crecimiento vegetal en conjunto con condiciones estresantes juegan un papel fundamental como mediadores de la cascada de transducción de señales (Jenik and Barton 2005).

Sin embargo, independientemente de la manera en que ocurra la regulación, se cree que esta diferencia está dictada por la sensibilidad celular a la auxina o a la presencia de diferentes receptores de auxina de los cuales uno es responsable de la división celular y otro de la división asimétrica necesaria para iniciar el proceso embriogénico (LoSchiavo 1994) y el resultado puede generar una serie de divisiones celulares que inducen el crecimiento de un callo desorganizado o el de uno polarizado que será capaz de dar lugar a un embrión (Dudits *et al.*, 1995).

Por su parte, la exposición al ionóforo A23187, que ya había sido exitosa en otros cultivos de interés como trigo y café (Mahalakshmi *et al.*, 2007; Ramakrishna *et al.*, 2011) ha mostrado un gran potencial para incrementar la eficiencia del protocolo de embriogénesis somática de *Cocotero* L, cuando se aplica en bajas concentraciones (1 μM) sobre explantes de estructura embriogénica cultivados en medio para la generación de callos embriogénicos, impactando no solo sobre el porcentaje de formación de callo embriogénico sino también sobre el número de estructuras embriogénicas que se forman sobre cada callo, el número de embriones somáticos y finalmente sobre la cantidad de plántulas regeneradas. Con base en los datos obtenidos, el cálculo del potencial (

Cuadro 18) para incrementar la eficiencia del protocolo con la estrategia propuesta, alcanza hasta las 44 veces cuando se compara con el grupo control.

La respuesta observada se debe a que como ha sido señalado previamente, el ionóforo A23187 facilita la difusión de Ca^{2+} a través de la membrana plasmática (Dedkova *et al.*, 2000) y es probable que modifique una red de señalización dependiente de la interacción de Ca^{2+} y CaM (Yang and Poovaiah 2003) para finalmente modificar la respuesta embriogénica del cultivo.

Cuadro 18. Cálculo teórico del potencial para incrementar la eficiencia del protocolo de micropropagación de cocotero cuando los callos embriogénicos son expuestos al ionóforo A23187 (1 μM).

Partiendo de 1,000 callos embriogénicos, después de 1 año:

	Testigo	2 meses + 1	A23187 (1 μM)
Formación de C.E. (%)	60.00	65.00	64.00
E.E./ C.E.	8.20	25.80	15.00
E.S/ C.E.	8.80	13.60	12.30
Ciclos/año	4.00	4.00	4.00
# de explantes	976,583.00	187,204,583.80	1,240,012.80
# de C.E.	585,949.80	121,682,979.50	18,600,192.00
# de E.S.	5,156,358.25	1,654,888,521.07	228,782,361.60
# de brotes	1,031,271.65	330,977,704.21	45,756,472.32
<i>Factor de incremento para brotes</i>	1	320.94	44.37

De manera contrastante, con la adición de floroglucinol al medio de cultivo, no se ha logrado obtener los resultados deseados, al menos con las concentraciones probadas (10, 100, 200 μM). Sin embargo, la existencia de reportes de casos exitosos como el de *Rosa hybrida* (Teixeira da Silva *et al.*, 2013), invitan a probar bajo otras condiciones la adición de florogulicnol al medio de cultivo.

En este caso, es probable que la respuesta observada haya sido influida por la interacción entre el floroglucinol y el carbón activado presente en el medio de cultivo ya que en ninguno de los trabajos en los que se reportan efectos positivos del floroglucinol (Hanower and Hanower 1984; Murali *et al.*, 1996; Find *et al.*, 2002; Reis *et al.*, 2008) se reporta la adición de carbón activado al medio de cultivo, y además, en 2008 (Reis *et al.*,) señala que el balance de compuestos fenólicos es necesario para inducir la embriogénesis somática en *Feijoa sellowiana*, mientras que en cocotero, estos niveles son regulados por la adición de carbón activado (Sáenz *et al.*, 2010)

En 2016 (Sandoval-Cancino *et al.*, 2016) reportó un protocolo que partiendo de explantes de raquilla, garantiza la fidelidad genética de la progenie obtenida de cocoteros adultos seleccionados por su valor agronómico o de resistencia a enfermedades, por lo que cobra particular importancia evaluar el efecto que los tratamientos reportados en el capítulo III y IV pudieran tener sobre material embriogénico obtenido a partir de raquillas.

Finalmente, debemos señalar que los resultados obtenidos durante la realización de este trabajo han arrojado dos estrategias, que son: 1) el subcultivo en un medio con la mitad de la concentración de 2,4-D (300 μM) que la concentración del medio inicial; y 2) la exposición al ionóforo A23187 (1 μM), y que pueden ser aplicadas para incrementar en forma muy amplia la respuesta de la propagación masiva del protocolo de embriogénesis somática de cocotero y entonces, poder producir más fácilmente, la cantidad necesaria de plantas de cocotero para renovar las plantaciones viejas, reestablecer las plantaciones que se han perdido ante presiones fitosanitarias e incluso para incrementar la superficie cultivada no solamente en el país, sino en todo el mundo y permitir con ello la sostenibilidad de la floreciente industria del cocotero en todo su potencial.

4.2 CONCLUSIONES

El análisis de los resultados obtenidos durante el desarrollo del presente trabajo nos permite establecer las siguientes conclusiones generales:

- El protocolo de embriogénesis somática de cocotero que se utiliza actualmente en los laboratorios del CICY puede ser ampliamente mejorado en su eficiencia con base en la aplicación de los logros obtenidos en esta tesis.
- La implementación de un subcultivo adicional en un medio de cultivo fresco adicionado con la mitad de la concentración (300 μM) de 2,4-D incluida en el medio de cultivo para la multiplicación de callo embriogénico, es capaz de incrementar hasta 320 veces la eficiencia del protocolo.
- El uso del ionóforo A23187 (1 μM) durante la multiplicación de callo embriogénico, es capaz de incrementar hasta 44 veces la eficiencia del protocolo.
- La adición de floriglucinol, en las concentraciones probadas (0, 10, 100 y 200 μM) no favoreció la eficiencia del protocolo de micropropagación de cocotero,
- Los tratamientos evaluados que mostraron un potencial para mejorar la eficiencia del sistema, modificaron el perfil de expresión de CnSERK durante el desarrollo del callo embriogénico, lo cual suma evidencia en favor de la utilidad de CnSERK como marcador temprano del potencial embriogénico y refuerza la factibilidad con que puede ser utilizado como un blanco para manipular la respuesta embriogénica de cocotero.

4.3 PERSPECTIVAS

El trabajo descrito aquí forma parte de un esfuerzo orientado hacia la mejora del protocolo para la micropropagación de cocotero a escala comercial. Los resultados obtenidos durante el mismo, son muy alentadores no solo por el potencial de incrementar los números absolutos de producción de vitroplantas, sino por la posibilidad de eficientar el uso de espacio, medio de cultivo y mano de obra requeridos para la producción de vitroplantas de cocotero, lo cual podría acarrear importantes ahorros y por lo tanto un incremento muy importante en la rentabilidad del proceso.

Por lo que será muy importante evaluar si los dos tratamientos favorables reportados (subcultivo adicional y uso del ionóforo) pueden implementarse en un mismo protocolo que resulte en un incremento aún más amplio de la eficiencia de la micropropagación de cocotero. Dependiendo del resultado, ya sea combinados o no, probar el mejor protocolo a escala comercial.

Con base en el análisis de la situación global del mercado de cocotero, se puede prever que el éxito de la implementación de esta y otras estrategias para incrementar la eficiencia del protocolo de micropropagación, tendría el alcance suficiente para impactar en el mercado internacional de manera favorable y atenuar la crisis mundial que se ha advertido para los países productores de cocotero, pues ayudaría en forma muy importante para generar estrategias para renovar las plantaciones y hacerle frente a la posible llegada de contingencias fitosanitarias.

Es importante hacer énfasis en la importancia de seguir realizando trabajos orientados a la mejora continua de la micropropagación de cocotero, así como de explorar la respuesta que las distintas líneas embriogénicas derivadas de diferentes variedades con diferentes características para fortalecer la diversidad de productos.

REFERENCIAS

- Al-Khayri, J. M. (2011). Influence of yeast extract and casein hydrolysate on callus multiplication and somatic embryogenesis of date palm (*Phoenix Dactylifera* L.). *Scientia Horticulturae* 130, 531-535.
- Anil, V. S. y K. S. Rao (2000). Calcium-mediated signaling during sandalwood somatic embryogenesis. Role for exogenous calcium as second messenger. *Plant Physiology* 123, 1301-1312.
- APCC (2018). Prices of coconut products. April 2018. <https://www.apccsec.org/apccsec/statistic-38.html>.
- Azpeitia, A., J. L. Chan, L. Sáenz y C. Oropeza (2003). Effect of 22(S)-homobrassinolide in somatic embryogenesis in plumule explants of *Cocos nucifera* (L.) cultured *in vitro*. *The Journal of Horticultural Science & Biotechnology* 78, 591-596.
- Batugal, P., V. R. Ramanatha y J. Oliver (2005). *Coconut genetic resources. In Vitro*. Vol. 52. Serdang, Selangor DE, Malaysia: International Plant Genetic Resources Institute - Regional Office for Asia, the Pacific and Oceania (IPGRI-APO).
- Benková, E., M. Michniewicz, M. Sauer, T. Teichmann, D. Seifertová, G. Jürgens y J. Friml (2003). Local efflux-dependent auxin gradients as a common module for plant organ formation. *Cell* 115, 591-602.
- Bennet, M. J., A. Marchant, H. G. Green, S. T. May, S. P. Ward, P. A. Millner, A. R. Walker, B. Schulz y K. A. Feldmann (1996). *Arabidopsis* AUX1 gene: A permease-like regulator of root gravitropism. *Science* 273, 948-950.
- Berthouly, M. y H. Etienne (2005). Temporary immersion system: A new concept for use liquid medium in mass propagation systems for *in vitro* plant propagation. En: *Liquid culture systems for in vitro plant propagation*, edited by A K Hvoslef-Eide and W Preil, 165-195. Netherlands: Springer.
- Böcher, M., H. Erdmann, S. Heim y C. Wylegalla (1985). Protein kinase activity of *in vitro* cultured plant cells in relation to growth and starch metabolism. *Journal of Plant Physiology*, 119, 209-218.

- Branton, R. L. y J. Blake (1983). Development of organized structures in callus derived from explants of *Cocos nucifera* L. *Annals of Botany* 52, 673-678.
- Buchanan, B. B., W. Gruissem y R. L. Jones (2000). *Biochemistry and molecular biology of plants*. Edited by B B Buchanan and R L Jones. Berkeley, USA: Wiley.
- Buffard-Morel, J., J. L. Verdeil y C. Pannetier (1992). Embryogenèse somatique du cocotier (*Cocos nucifera* L.) à partir d'explants foliaires: Étude histologique. *Canadian Journal of Botany* 70, 735-741.
- Bush, D S. (1993). Regulation of cytosolic calcium in plants. *Plant Physiology* 103, 7-13.
- Chan, J. L., L. Saéñz, C. Talavera, R. Hornung, M. Robert y C. Oropeza (1998). Regeneration of coconut (*Cocos nucifera* L.) from plumule explants through somatic embryogenesis. *Plant Cell Reports* 17, 515-521.
- Chapman, E. J. y M. Estelle (2009). Mechanism of auxin-regulated gene expression in plants. *Annual Review of Genetics* 43, 265-285.
- CONACOCO (2008). La Industria de coco en México, con proyección de crecimiento del 28%. Comunicado de prensa No. 001.
- CONACOCO (2012). Plan rector sistema nacional producto palma de coco.
- CONACOCO (2015). Estudio multidimensional para el aprovechamiento del producto de la palma de coco a través del proceso de deshidratado como soporte tecnológico para los cultivos ubicados en la costa del Pacífico.
- Dayrit, C. S. (2000). Coconut oil in health and disease: Its and monolaurin's potential as cure for HIV/AIDS. In XXXVII Cocotech Meeting. Chennai, India.
- Dedkova, E. N., A. A. Sigova y V. P. Zinchenko (2000). Mechanism of action of calcium ionophores on intact cells: Ionophore-resistant cells. *Membrane & Cell Biology* 13, 357-368.
- Dudits, D., J. Györgyey, L. Bögre y L. Bakó (1995). Molecular biology of somatic embryogenesis. En: *In vitro* embryogenesis in plants. *Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture*, edited by T.A. Thorpe, 267-308. Dordrecht, Netherlands:

Springer Science + Bussines Media, B.V.

- Eeuwens, C. J. (1976). Mineral requirements for growth and callus initiation of tissue explants excised from mature coconut palms (*Cocos nucifera*) and cultured *in vitro*. *Physiologia Plantarum* 36, 23-28.
- Eeuwens, C. J. (1978). Effects of organic nutrients and hormones on growth and development of tissue explants from coconut (*Cocos nucifera*) and date (*Phoenix dactylifera*) palms cultured *in vitro*. *Physiologia Plantarum* 42, 173-178.
- Eeuwens, C. J. y J. Blake (1977). Culture of coconut and date palm tissue with a view to vegetative propagation. *Acta Horticulturae* 78, 277-286.
- FAO (2016). FAOSTAT. www.fao.org/faostat/.
- Find, J., L. Grace y P. Krogstrup (2002). Effect of anti-auxins on maturation of embryogenic tissue cultures of nordmanns fir (*Abies nordmanniana*). *Physiologia Plantarum* 116, 231-237.
- Fisher, D. B. (1968). Protein staining of ribboned epon sections for light microscopy. *Histochemie* 16, 92-96.
- Friml, J., E. Benková, I. Blilou, J. Wisniewska, T. Hamann, K. Ljung, S. Woody, *et al.* (2002). AtPIN4 mediates sink-driven auxin gradients and root patterning in *Arabidopsis*. *Cell* 108, 661-673.
- Friml, J., A. Vieten, M. Sauer, D. Weijers, H. Schwarz, T. Hamann, R. Offringa y G. Jürgens (2003). Efflux-dependent auxin gradients establish the apical-basal axis of *Arabidopsis*. *Nature* 426, 147-153.
- Gaspar, T., C. Kevers, C. Penel, H. Greppin, D. M. Reid y T. A. Thorpe (1996). Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture. *In vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 32, 272-289.
- Geisler, M., J. J. Blakeslee, R. Bouchard, O. R. Lee, V. Vincenzetti, A. Bandyopadhyay, B. Titapiwatanakun, *et al.* (2005). Cellular efflux of auxin catalyzed by the *Arabidopsis* MDR/PGP transporter AtPGP1. *The Plant Journal* 44, 179-194.

- George, E. F., M. A. Hall y G. De Klerk, eds. (2008). *Plant propagation by tissue culture. Vol. 1. The background*. 3rd ed. Dordrecht, Netherlands: Springer.
- Geydan, T. D. y C. Spinel (2007). The calcium wave of vegetable cells. *Acta Biologica Colombiana* 12, 115-119.
- Gurr, G. M., A. C. Johnson, G. J. Ash, B. A. L. Wilson, M. M. Ero, C. A. Pilotti, C. F. Dewhurst y M. S. You (2016). Coconut lethal yellowing diseases: A phytoplasma threat to palms of global economic and social significance. *Frontiers in Plant Science* 7, 1-21.
- Hagley, E. A. C. (1963). The role of the palm weevil, *Rhynchophorus palmarum*, as a vector of red ring disease of coconuts. Results of preliminary investigations. *Journal of Economic Entomology* 56, 375-380.
- Halperin, W. y D. F. Wetherell (1964). Adventive embryony in tissue cultures of the wild carrot, *Daucus carota*. *American Journal of Botany* 51, 274-283.
- Hanower, J. y P. Hanower (1984). Inhibition et stimulation, en culture *in vitro*, de l'embryogenèse des souches issues d'explants foliaires de palmier à huile. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences, Paris* 298, 45-48.
- Harrison, N. y M. Elliott (2005). Lethal Yellowing (LY) of Palm. PP-222.
- Hecht, V., J. P. Vielle-Calzada, M. V. Hartog, E. D. L. Schmidt, K. Boutilier, U. Grossniklaus y S. C. De Vries (2001). The *Arabidopsis* SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASE 1 gene is expressed in developing ovules and embryos and enhances embryogenic competence in culture. *Plant Physiology* 127, 803-816.
- Hita, O., P. Gallego, N. Villalobos, I. Lanas, A. Blazquez, J. P. Martin, J. Fernandez, L. Martin y H. Guerra (2003). Improvement of somatic embryogenesis in *Medicago arborea*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 72,13-18.
- Hornung, R. y J. L. Verdeil (1999). Somatic embryogenesis in coconut from immature inflorescence explants. En: *Current Advances in Coconut Biotechnology*, editado por C. Oropeza, J. L. Verdeil, G.R. Ashburner, R. Cardeña y J. M. Santamaría, 297–308.

Países Bajos: Kluwer Academic Publishers.

- IndexMundi (2018). Precios de materias primas. <https://www.indexmundi.com/es/precios-de-mercado/>.
- Islas-Flores, I., J. L. Chan, C. Oropeza y S. M.T. Hernández-Sotomayor (2000). Occurrence of phosphorylated proteins and kinase activity in coconut tissues cultured *in vitro* in a medium that induces somatic embryogenesis. *Plant Physiology and Biochemistry* 38, 825-836.
- Jansen, M. A. K., H. Booij, J. H. N. Schel y S. C. De Vries (1990). Calcium increases the yield of somatic embryos in carrot embryogenic suspension cultures. *Plant Cell Reports* 9, 221-223.
- Jenik, P. D. y K. Barton (2005). Surge and destroy: The role of auxin in plant embryogenesis. *Development* 132, 3577-3585.
- Jiao, Y., Z. Li, K. Xu, Y. Guo, C. Zhang, T. Li, Y. Jiang, G. Liu y Y. Xu (2018). Study on improving plantlet development and embryo germination rates in *in vitro* embryo rescue of seedless grapevine. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science* 46, 39-53.
- Kim, S. W., S. C. Oh and J. R. Liu (2003). Control of direct and indirect somatic embryogenesis by exogenous growth regulators in immature zygotic embryo cultures of rose. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 74, 61-66.
- Kleine-Vehn, J., P. Dhonukshe, M. S., P. B. Brewer, J. Wiśniewska, T. Paciorek, E. Benková y J. Friml (2008). ARF GEF-dependent transcytosis and polar delivery of PIN auxin carriers in *Arabidopsis*. *Current Biology* 18, 526-531.
- Komatsu, S., T. Masuda y K. Abe (1996). Phosphorylation of a protein (Pp56) is related to the regeneration of rice cultured suspension cells. *Plant and Cell Physiology* 37, 748-753.
- Kumar, V. y J. Van Staden (2017). New insights into plant somatic embryogenesis: An epigenetic view. *Acta Physiologiae Plantarum* 39, 1-17.

- Lazzeri, P. A., D. F. Hildebrand y G. B. Collins (1987). Soybean somatic embryogenesis : effects of hormones and culture manipulations. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 10, 197-208.
- Lieberman, S., M. G. Enig y H. G. Preuss (2006). A review of monolaurin and lauric acid. *Alternative & Complementary Therapies* 12, 310-314.
- Livak, K. J. y T. D. Schmittgen (2001). Analysis of relative gene expression data using Real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. *Methods* 25, 402-408.
- Ljung, K. (2013). Auxin metabolism and homeostasis during plant development. *Development* 140, 943-950.
- Lokerse, A. S. y D. Weijers (2009). Auxin enters the matrix - assembly of response machineries for specific outputs. *Current Opinion in Plant Biology* 12, 520-526.
- LoSchiavo, F., L. Pitto, G. Giuliano, G. Torti, V. Nuti-Ronchi, D. Marazziti, R. Vergara, S. Orselli y M. Terzi (1989). DNA methylation of embryogenic carrot cell cultures and its variations as caused by mutation, differentiation, hormones and hypomethylating drugs. *Theoretical and Applied Genetics* 77, 325-331.
- LoSchiavo, F. (1994). The genetics and physiology of the totipotent cell. En: *Plant Molecular Biology*, editado por G. Coruzzi y P. Puigdomènech. Berlin, Heidelberg: Springer.
- Lu, C., V. Vasil y I.K. Vasil (1983). Improved efficiency of somatic embryogenesis and plant regeneration in tissue cultures of maize (*Zea mays* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 66, 285-289.
- Mahalakshmi, A., B. Singla, J. P. Khurana y P. Khurana (2007). Role of calcium-calmodulin in auxin-induced somatic embryogenesis in leaf base cultures of wheat (*Triticum aestivum* Var. HD 2329). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 88, 167-174.
- Mariani, T. S., S. Suhandono, D. Ermavitalini, Ihsan y T. Puspita (2014). Simple micropropagation by indirect somatic embryogenesis in sugarcane (*Sacharum officinarum* L.). *Asian Journal of Applied Sciences* 2, 206-208.

- Maust, B. E., F. Espadas, C. Talavera, M. Aguilar, J. M. Santamaría y C. Oropeza (2003). Changes in carbohydrate catabolism in coconut palms infected with the lethal yellowing phytoplasma. *Phytopathology* 93, 976-981.
- McCoy, R. E., F. W. Howard, J. H. Tsai, H. M. Donselman, D. L. Thomas, H. G. Basham, R. A. Atilano, F. M. Eskafi, L. Britt y M. E. Collins (1983). Lethal yellowing of palms. *Agricultural Experimental Station Bulletin* 834. Gainesville. Florida, USA.
- Montero-Cortés, M., J. L. Chan-Rodríguez, I. Cordova-Lara, C. Oropeza-Salin y L. Sáenz-Carbonell (2011). Addition of benzyladenine to coconut explants cultured *in vitro* improves the formation of somatic embryos and their germination. *Agrociencia* 45, 663-673.
- Montero-Cortés, M., I. Cordova, J. L. Verdeil, V. Hocher, A. Pech y Ake, A. Sandoval, C. Oropeza y L. Sáenz (2011). GA3 induces expression of E2F-like genes and CDKA during *in vitro* germination of zygotic embryos of *Cocos nucifera* (L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 107, 461-470.
- Montero-Cortés, M., F. Rodriguez-Paredes, C. Burgeff, T. Pérez-Núñez, I. Cordova, C. Oropeza, J. L. Verdeil y L. Sáenz (2010). Characterisation of a cyclin-dependent kinase (CDKA) gene expressed during somatic embryogenesis of coconut palm. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 102, 251-258.
- Montero-Cortés, M., L. Sáenz, I. Córdoba, A. Quiroz, J.L. Verdeil y C. Oropeza (2010). GA³ stimulates the formation and germination of somatic embryos and the expression of a KNOTTED-like homeobox gene of *Cocos nucifera* (L.). *Plant Cell Reports* 29, 1049-1059.
- Moon, H. K., Y. W. Kim, Y. P. Hong y S. Y. Park (2013). Improvement of somatic embryogenesis and plantlet conversion in *Oplopanax elatus*, an endangered medicinal woody plant. *SpringerPlus* 2, 1-8.
- MPOC. (2018). Daily Palm Oil Prices. http://www.mpoc.org.my/Daily_Palm_Oil_Prices.aspx.
- Mravec, J., M. Kubes, A. Bielach, V. Gaykova, J. Petrasek, P. Skupa, S. Chand, E.

- Benkova, E. Zazimalova y J. Friml (2008). Interaction of PIN and PGP transport mechanisms in auxin distribution-dependent development. *Development* 135, 3345-3354.
- Murali, S., D. Sreedhar y T.S. Lokeswari (1996). Regeneration through somatic embryogenesis from petal-derived calli of *Rosa hybrida* L. Cv Arizona (Hybrid Tea). *Euphytica* 91, 271-275.
- Nguyen, Q. T., H. D.Dharshani Bandupriya, A. López-Villalobos, S. Sisunandar, M. Foale y S. W. Adkins (2015). Tissue culture and associated biotechnological interventions for the improvement of coconut (*Cocos nucifera* L.): A review. *Planta* 242, 1059–1076.
- Noh, B., A. S. Murphy y E. P. Spalding (2001). Multidrug resistance-like genes of *Arabidopsis* required for auxin transport and auxin-mediated development. *The Plant Cell* 13, 2441-2454.
- Ntushelo, K., and N. A. Harrison (2013). Palm phytoplasmas in the caribbean basin. *Palms* 57, 93-100.
- Oehlschlager, A. C., C. Chinchilla, G. Castillo y L. Gonzalez (2002). Control of red ring disease by mass trapping of *Rhynchophorus palmarum* (Coleoptera: Curculionidae). *Florida Entomologist* 85, 507-513.
- Ohler, J G. (1999). Modern coconut management. *Palm Cultivation and Products* 1-458.
- Oropeza, C., E. Rillo, V. Hoher y J. L. Verdeil (2005). Coconut micropropagation. En: *Coconut Genetic Resources*, editado por P. Batugal, V. R. Pao y J. Oliver, 334-346. Serdang: IPGRI-APO.
- Oropeza, C., L. Sáenz, J. L. Chan, G. Sandoval, T. Pérez-Núñez, M. Narváez, G. Rodríguez y C. Borroto (2016). Coconut micropropagation in Mexico using plumule and floral explants. *International Journal of Coconut R & D* 32.
- Parrotta, J. A. (1993). *Cocos nucifera* L. coconut palm, palma de coco. SO-Institute of Tropical Forestry - SM.
- Perera, P. I.P., D. M.D. Yakandawala, V. Hoher, J. L. Verdeil y L. K. Weerakoon (2009).

- Effect of growth regulators on microspore embryogenesis in coconut anthers. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 96, 171-180.
- Perera, P. I. P., V. Hocher, J. L. Verdeil, S. Doubeau, D. M. D, Yakandawala y L. K. Weerakoon (2007). Unfertilized ovary: A novel explant for coconut (*Cocos nucifera* L.) somatic embryogenesis. *Plant Cell Reports* 26, 21-28.
- Pérez-Núñez, M. T., J. L. Chan, L. Sáenz, T. González, J. L. Verdeil y C. Oropeza (2006). Improved somatic embryogenesis from *Cocos nucifera* (L.) plumule explants. *In vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 42, 37-43.
- Pérez-Núñez, M.T., R. Souza, L. Sáenz, J. L. Chan, J. J. Zúñiga-Aguilar y C. Oropeza (2009). Detection of a SERK-like gene in coconut and analysis of its expression during the formation of embryogenic callus and somatic embryos. *Plant Cell Reports* 28, 11-19.
- Petrásěk, J. y J. Friml (2009). Auxin transport routes in plant development. *Development* 136, 2675-2688.
- Phillips, R L. (1994). The coconut fact sheet HS-40. Florida, USA.
- Ponsamuel, J., N. P. Samson, P. S. Ganeshan, V. Sathyaprakash y G. C. Abraham (1996). Somatic embryogenesis and plant regeneration from the immature cotyledonary tissues of cultivated tea (*Camellia sinensis* (L). O. Kuntze). *Plant Cell Reports* 16, 210-214.
- Ptak, A. y A. Bach (2007). Somatic embryogenesis in tulip (*Tulipa gesneriana* L.) flower stem cultures. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 45, 35-39.
- Rajesh, M. K., T. P. Fayas, S. Naganeeswaran, K. E. Rachana, U. Bhavyashree, K. K. Sajini y Anitha Karun (2016). *De novo* assembly and characterization of global transcriptome of coconut palm (*Cocos nucifera* L.) embryogenic calli using illumina paired-end sequencing. *Protoplasma* 253, 913-928.
- Ramakrishna, A., P. Giridhar y G. A. Ravishankar (2011). Calcium ionophore A23187 induce high-frequency somatic embryogenesis in cultured tissues of *Coffea canephora* P Ex Fr. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 47, 667-673.

- Reinert, J. (1958). Morphogenese in ihrem kontrolle and gemebekuteren our carothern. Winsens Chapten 45, 344-345.
- Reis, E., M. T. Batista y J. M. Canhoto (2008). Effect and analysis of phenolic compounds during somatic embryogenesis induction in *Feijoa sellowiana* Berg. *Protoplasma* 232, 193-202.
- Roolant, L. (2014). Why coconut water is now a one billion industry?. <https://transferwise.com/blog/2014-05/why-coconut-water-is-now-a-1-billion-industry/>.
- Ross, I A. (2005). *Medicinal plants of the world. Vol 3*. Totowa, New Jersey, USA.: Humana Press.
- Sachs, T. (1981). Control of the patterned differentiation of vascular tissues. *Advances in Botanical Research* 9, 151-262.
- Sáenz-Carbonell, L., M. Montero-Cortés, T. Pérez-Núñez, A. Azpeitia-Morales, I. Córdova-Lara, J. L. Chan-Rodríguez y C. Oropeza-Salin (2013). Coconut (*Cocos nucifera* L.) somatic embryogenesis and related gene expression. En: *Somatic embryogenesis and gene expression*, editado por J. Aslam, P. S. Srivastava y M. P. Sharma. 172-187. New Delhi: Narosa Publishing House.
- Sáenz, L., A. Azpeitia, B. Chuc-Armendariz, J. L. Chan, J. L. Verdeil, V. Hoher y C. Oropeza (2006). Morphological and histological changes during somatic embryo formation from coconut plumule explants. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 42, 19-25.
- Sáenz, L., J. L. Chan, R. Souza, R. Hornung, E. Rillo, J. L. Verdeil y C. Oropeza (1999). Somatic embryogenesis and regeneration in coconut from plumular explants. En *Current Advances in Coconut Biotechnology*, editado por C. Oropeza, J. L. Verdeil, G. R. Ashburner, R. Cardeña y J. M. Santamaría, 309-319. Netherlands: Springer International Publishing.
- Sáenz, L., M. Montero-Cortés, T. Pérez-Núñez, A. Azpeitia-Morales, A. Andrade-Torres, I. Córdova-Lara, J.L. Chan-Rodríguez, G. Sandoval-Cancino, G. Rivera-Solís y C. Oropeza (2016). Somatic embryogenesis in *Cocos nucifera* L. en: *Somatic*

- embryogenesys: Fundamental Aspects and Applications, editado por V.M. Loyola-Vargas y N. Ochoa-Alejo, 297-318. Switzerland: Springer International Publishing.
- Sáenz, L., G. Herrera-Herrera, F. Uicab-Ballote, J. L. Chan y C. Oropeza (2010). Influence of form of activated charcoal on embryogenic callus formation in coconut (*Cocos nucifera*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 100, 301-308.
- Salas, J. A. (1980). El anillo rojo del cocotero en varias áreas de Costa Rica. *Agronomía Costarricense* 4, 199-202.
- Sandoval-Cancino, G., L. Sáenz, J. L. Chan y C. Oropeza (2016). Improved formation of embryogenic callus from coconut immature inflorescence explants. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 52, 367-378.
- Sauer, M., S. Robert y J. Kleine-Vehn (2013). Auxin: Simply complicated. *Journal of Experimental Botany* 64, 2565-2577.
- Schmidt, E. D. L., F. Guzzo, M. Toonen y S. C. de Vries (1997). A leucine-rich repeat containing receptor-like kinase marks somatic plant cells competent to form embryos. *Development* 124, 2049-2062.
- SIAP (2012). Resumen de la producción anual agrícola. México.
- Sistema producto palma de coco (2012). Plan rector Veracruz. Coatzacoalcos, Veracruz.
- Solís-Ramos, L. Y., A. Andrade-Torres, L. A. Sáenz Carbonell, C. M. Oropeza Salín y E. Castaño de la Serna (2012). Somatic embryogenesis in recalcitrant plants. En: *Embryogenesis*, editado por Ken-Ichi Sato, 297-618.
- Somleva, M. N., E. D.L. Schmidt y S. C. de Vries (2000). Embryogenic cells in *Dactylis glomerata* L. (Poaceae) explants identified by cell tracking and by SERK expression. *Plant Cell Reports* 19, 718-726.
- Steward, F. y K. Mears (1958). Growth organized development of cultured cells. II- organization in cultures grown from freely suspended cells. *American Journal of Botany* 45, 705-708.
- Swarup, R. y B. Péret (2012). AUX/LAX family of auxin influx carriers: An overview.

- Frontiers in Plant Science 3, 1-11.
- Takeda, T., H. Inose y H. Matsuoka (2003). Stimulation of somatic embryogenesis in carrot by additional calcium. *Biochemical Engineering Journal* 14, 143-148.
- Teixeira da Silva, J. A., J. Dobránszki y S. Ross (2013). Phloroglucinol in plant tissue culture. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 49, 1-16.
- Terasaka, K., J. Blakeslee, B. Titapiwatanakun, W. Peer, A. Bandyopadhyay, S. Makam, O. Lee, *et al.* (2005). PGP4, an ATP binding cassette P-glycoprotein, catalyzes auxin transport in *Arabidopsis thaliana* roots. *The Plant Cell* 17, 2922-2939.
- Uhl, N. W. y J. Dransfield (1987). *Genera Palmarum*. 1st ed. Kansas, USA: Liberty Hyde of the Cornell University International Palm Society.
- Us-Camas, R., G. Rivera-Solís, F. Duarte-Aké y C. De-la-Peña (2014). *In vitro* culture: An epigenetic challenge for plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 118, 187-201.
- Vanneste, S. y J. Friml (2013). Calcium: The missing link in auxin action. *Plants* 2, 650-675.
- Vanneste, S., L. Maes, I. De Smet, K. Himanen, M. Naudts, D. Inzé y T. Beeckman (2005). Auxin regulation of cell cycle and its role during lateral root initiation. *Physiologia Plantarum* 123, 139-146.
- Verdeil, J. L. (1993). Etude de la régénération du cocotier (*Cocos nucifera* L.) par embryogenèse somatique à partir d'explants inflorescentiels." Montpellier.
- Verdeil, J. L., F. Grosdemanges, C. Huet y A. Rival (1992). Coconut (*Cocos nucifera* L.) somatic embryogenesis: Obtention of several clone ramets. *Oléagineux* 47, 465-467.
- Vidhanaarachchi, V. R.M., S. C. Fernando, P. I.P. Perera y L. K. Weerakoon (2013). Application of un-fertilized ovary culture to identify elite mother palms of *Cocos nucifera* L. with regenerative potential. *Journal of the National Science Foundation of Sri Lanka* 41, 29-34.
- Vidican, T. I. y D. Cachita-Cosma (2010). Studies regarding the influence of different wavelengths of LEDs light on regenerative and morphogenetic processes in *in vitro*

- cultures of *Echinopsis chamaecereus* f. *Lutea*. *Studia Universitatis Vasile Goldis Arad, Seria Stiintele Vietii* 20, 41-45.
- Vieten, A., S. Vanneste, J. Wisniewska, E. Benkova, R. Benjamins, T. Beeckman, C. Luschnig y J. Friml (2005). Functional redundancy of PIN proteins is accompanied by auxin-dependent cross-regulation of PIN expression. *Development* 132, 4521-4531.
- Von-Arnold, S. (1987). Improved efficiency of somatic embryogenesis in mature embryos of *Picea abies* (L.) Karst. *Journal of Plant Physiology* 128, 233-244.
- Von-Arnold, S., I. Sabala, P. Bozhkov, J. Dyachok y L. Filonova (2002). Developmental pathways of somatic embryogenesis. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 69, 233-249.
- Voo, K. S., C. L. Rugh y J. C. Kamalay (1991). Indirect somatic embryogenesis and plant recovery from cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 27P, 117-124.
- Woodroof, J. G. (1979). *Coconuts: Production, processing, products*. 2nd edition. Westport, Connecticut, USA: AVI Publishing Company, Inc.
- Yang, T. y B. W. Poovaiah (2003). Calcium/calmodulin-mediated signal network in plants. *Trends in Plant Science* 8, 505-512.
- Young, E. y M. Turnbull (2017). 2,4-dichlorophenoxyacetic acid pathway map. http://eawag-bbd.ethz.ch/2,4-d/2,4-d_image_map2.html.