

DOCTORADO EN CIENCIAS Y BIOTECNOLOGIA DE PLANTAS

**Estudio de diferentes estrategias para
promover la embriogénesis somática en
cocotero (*Cocos nucifera* L.) a partir de
explantes de plúmula**

Tesis que para obtener el grado de
Doctor en Ciencias presenta:

Alfonso Azpeitia Morales

Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Mérida, Yucatán, México
2003



CONTENIDO

	Página
Agradecimientos.....	i
Dedicatorias.....	ii
Lista de cuadros.....	iii
Lista de figuras.....	iv
Lista de abreviaciones.....	vii
Resumen	x
Abstract.....	xi
Capítulo 1.Introducción.....	1
Capítulo 2. Antecedentes.....	8
2.1 Micropropagación.....	8
2.2 Organogénesis	9
2.3 Embriogénesis somática (ESo).....	9
2.4 El ciclo celular.....	12
2.5 El ciclo celular y fitohormonas.....	14
2.6 Factores que promueven la embriogénesis somática.....	15
2.6.1 Fitohormonas.....	15
2.6.2 Auxinas y citocininas.....	15
2.6.3 Auxinas y embriogénesis somática.....	16
2.6.4 Entrada de la auxina a los tejidos.....	17
2.6.5 Citocininas.....	17
2.6.6 Citocininas endógenas.....	18
2.6.7 Anticitocininas.....	22
2.6.8 Acido abscísico.....	24
2.6.9 Brasinoesteroides.....	26
2.7 Factores físico químicos.....	29
2.7.1 Polietilénico (PEG).....	29
2.7.2 Inducción por daño mecánico.....	30

DEDICATORIAS

A mis padres, Sebastiana[†] y Agustín[†]
por siempre mi eterna gratitud,
porque aunque ya no están aquí,
siempre su recuerdo significará una fortaleza espiritual,
para nunca desfallecer aun en contra de la adversidad,
hasta lograr lo que a veces pareciera inalcanzable en la vida.

A mi esposa Gladys por su comprensión, cariño y apoyo,
el cual me permitió apreciar el valor de lo imprescindible,
lo sincero, lo incondicional durante estos últimos años,
que sin el cual no hubiera sido posible
alcanzar esta meta en mi vida.

A mis pequeños hijos: Alfonso y Samantha Estefanía,
quienes siempre me alentaron con una sonrisa,
a ellos aunque pequeños, pero grandes de corazón,
quienes son motivos suficientes
para seguir siempre adelante.

A mis hermanos: Francisco, Irma, Agustín, Yolanda y Guillermo.

A sus esposas: Hermelinda, Cirina y Angela.

A mis sobrinos:

Julio Cesar, Deysy Janeth, Nidia Roció,

Yendy Nayely, Alan Agustín,

Blanca Yadira y Angel Guillermo,

A todos ellos por vivir siempre en paz y
mantener nuestra armonía familiar.

LISTA DE CUADROS

Cuadro	Página
1.1. Comparación de rendimiento de materiales de cocotero.....	3
1.2. Situación de las huertas madre de cocotero en México.....	5
2.1. Algunas especies que han sido micropropagadas.....	8
2.2. Porcentaje de la concentración total de auxinas y citocininas.....	16
2.3. Niveles de fitohormonas endógenas de alfalfa <i>M. falcata</i>	19
2.4. Contenidos totales de citocininas endógenas.....	19
2.5. Efectos fisiológicos de las anticitocininas.....	22
2.6. Efectos fisiológicos de los BRs en especies vegetales.....	27
2.7. Antecedentes en la propagación <i>in vitro</i> de cocotero.....	32
2.8. Protocolos desarrollados en la actualidad para la propagación <i>in vitro</i> .	33
6.1. Effect of a 3 d pre-culture with 22(S),23(S)-homobrassinolide (HBr)....	85
8.1. Porcentaje de callos embriogénicos con embriones somáticos.....	108
8.2. Número de embriones somáticos/callos embriogénicos.....	110
8.3. Número de plántulas observadas en los tratamientos que presentaron plántulas.....	113
8.4. Estimación del número de embriones somáticos y plantas.....	117
9.1. Número de embriones somáticos obtenidos experimentalmente.....	124

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1.1. Disminución de la superficie de cocotero en México.....	2
1.2. Características de las plantaciones de cocotero en México.....	2
1.3. Cocotero y amarillamiento letal.	4
1.4. Situación de las huertas madre de cocotero en México.....	4
1.5. Esquema para la producción de palmas de cocotero.....	7
2.1. Comparación de embriogénesis somática y cigótica.....	10
2.2. Estados de la embriogénesis somática en dicotiledóneas.....	11
2.3. Estados de la embriogénesis somática en monocotiledóneas.....	12
2.4. Modelo de las transiciones de las fases G1-S y G2-M para plantas...	13
2.5. Proceso de la embriogénesis somática de grupos de células en estado 1.....	17
2.6. Efecto de la aplicación exógena de zeatina en la embriogénesis somática.....	20
2.7. Contenido de citocininas totales en cultivos <i>in vitro</i> a partir de plúmulas.....	21
2.8. Citocininas isoprénicas endógenas encontradas en tejidos.....	21
2.9. Eficiencia de la embriogénesis somática de explantes de hoja.....	23
2.10. Influencia del 2-cloro-4-ciclobutilamino-6-etilamino-1,3,5-triazina.....	24
2.11. Efecto del ácido abscísico (ABA) en el desarrollo de embriones.....	25
2.12. Interacción del hBR y AIA en la elongación de secciones.....	28
2.13. Interacción del hBR y 2,4-D en la elongación de secciones.....	28
2.14. Efecto combinado de ácido abscísico, manitol, sorbitol o polietilenglicol (PEG) en la producción y maduración de embriones...	29

Figura.	Página
2.15. Cigóto de <i>Cocos nucifera</i> (I) y etapas tempranas.....	31
2.16. Protocolo desarrollado en Orstom/Cirad a partir de inflorescencias...	34
2.17. Protocolo desarrollado en CICY a partir de plúmula.....	35
3.1. Estrategias utilizadas para incrementar la eficiencia de regeneración de cocotero.....	53
4.1. Formation of initial callus and embryogenic callus from coconut plumule explants.....	58
4.2. Schematic representation of the changes that occur during the formation of embryogenic callus from plumule explants cultured <i>in vitro</i>	59
4.3. Formation and germination of somatic embryos from coconut plumule explants.....	60
5.1. Influencia de las citocininas bencil aminopurina (BAP), zeatina trans isomero (Z) y N6 (2'-isopentenil) adenina (2iP) en las concentraciones de 0, 1, 5, 25 y 100 μM en la formación de callo.....	68
5.2. Influencia de las citocininas bencil aminopurina (BAP), zeatina trans-isomero (Z) y N6 (2'-isopentenil) adenina (2iP) en las concentraciones de 0, 1, 5, 25 y 100 μM en la formación de callo embriogénico....	69
5.3. Efecto de la bencil aminopurina en la formación de callo y callo embriogénico a los 90 días de cultivo en plúmulas de material Enano Malayo Amarillo.....	70
5.4. Porcentaje de callo y callo embriogénico en presencia de 8-azaadenina.....	71
5.5. Porcentaje de callo inicial y callo embriogénico en presencia de 8-azaadenina (0,4.5, 9 y 18 μM) y bencil aminopurina 1 μM	71
5.6. Número de embriones somáticos en presencia de 8-azaadenina (0,4.5, 9 y 18 μM) a los 30 y 60 días de cultivo de callos embriogénicos de cocotero Enano Malayo Verde.....	72
6.1. (A) Callus tissue developed in coconut plumule explants treated with 22(S),23(S)-homobrassinolide.....	81

Figura	Página
6.2. Effect of 3 day (A) and 7 day (B) pre-culture in modified medium I, containing different concentrations of 22(S),23(S)- homobrassinolide on the formation of initial callus in coconut plumule explants.....	82
6.3. Effect of 3 day (A) and 7 day (B) pre-culture in modified medium I, containing different concentrations of 22(S),23(S)-homobrassinolide, on the formation of embryogenic callus in coconut plumule explants..	83
6.4. Effect of 3 day (A) and 7 day (B) pre-culture in medium I, containing different concentrations of 22(S),23(S)-homobrassinolide, on the formation of somatic embryos in embryogenic calli obtained from coconut plumule explants.....	84
7.1. Número de embriones somáticos observados en función del número de veces que el callo embriogénico fue subdividido (n=3, donde cada repetición se estableció con 5 callos embriogénicos. Los valores con la misma letra son iguales estadísticamente, DMS 0.05).	93
7.2. Número de embriones somáticos por callo embriogénico a los 15 y 30 días en cultivo en condiciones II.....	94
7.3. Formación de embriones somáticos (ES) a los 15 y 30 días de cultivo en callos embriogénicos (CE) y en subdivisiones de callos embriogénicos (SCE).....	96
7.4. Peso fresco en los tratamientos con cultivo de callos embriogénicos (CE) y subdivisiones de callo embriogénico (SCE).....	97
8.1. Embriones con diferente grado de diferenciación.....	109
8.2. Embriones somáticos globulares y torpedo.....	112
8.3. Porcentaje de callos embriogénicos con embriones somáticos.....	115
9.1. Estrategias utilizadas para incrementar la eficiencia del protocolo de regeneración de cocotero <i>in vitro</i> a través de embriogénesis somática.....	122
9.2. Protocolo hipotético integrando estrategias para incrementar la eficiencia de la regeneración de cocotero <i>in vitro</i>	125

LISTA DE ABREVIACIONES

Abreviación	Significado	Abreviación	Significado
ABA	Acido abscísico	CE	Callo embriogénico
ACC	Acido 1-amino-ciclopropano-1-carboxílico	CE-H	Callo embriogénico sin fitohormonas en el medio de cultivo
ADN	Acido desoxiribonucleico	CI	Callo inicial
AgNO ₃	Nitrato de plata	CP	4-ciclopentilamino-2 metiltio-pirrol[2,3-d]-pirimidina.
AIA	Acido indolacético	D	Distal
AL	Amarillamiento letal	DHZ	Dihidrozeatina
ANA	Acido naftalenacético	DHZR	Ribósido de dihidrozeatina
ANAVA	Análisis de varianza	DMS	Diferencia mínima significativa
AVG	Aminoetoxivinilglicina	EMA	Enano Malayo Amarillo
B	Basal	ES	Embrión somático
BAP	Bencil aminopurina	esd	Embrión somático en dediferenciación
BR	Brasinoesteroide	Esf	Embriones somáticos fusionados
C	Callo	Esg	Embriones somáticos globulares
c	Coleóptilo	ESo	Embriogénesis somática
CA	Carbón activado	EMV	Enano Malayo Verde
CPPS	Proteínas solubles unidas a citocininas	g	Gramo
CDKs	Cinasas dependiendo de ciclinas	GA	Giberelinas

Abreviación	Significado	Abreviación	Significado
GA ₃	Acido giberélico	M	Molar
GES	Estructuras embriogénicas globulares	ma	Meristemo apical
GES-L	Estructuras embriogénicas globulares alargadas	mc	Centros meristemáticos
Gest	Grupos de embriones somáticos tipo torpedo	mM	Milimolar
gp	Poros germinativos	MN	Nódulos meristemáticos
h	Haustorio	mz	Zona meristemática
H	Hora	ns	Estructuras nodulares
ha	Hectárea	p	Protodermis
HBr	22(S), 23(S)-homobrasinólido	PC	N-(4-piridil)-O(4-clorofenil)-carbamato
IBA	Acido indolbutírico	PEDCS	Células embriogénicas predeterminadas
IEDCs	Células determinadas que inducen la embriogénesis	PEG	Polietilenglicol
IP9G	9-glucósido de isopentenil adenina	pf	Primordio foliar
iPR	Ribósido de isopentenil adenina	µg	Microgramo
L	Litro	µM	Micromolar
lmc	Capa de células meristemáticas	pl	Hojas de la plúmula
LP	Primordio de la hoja	PPFD	Densidad de flujo fotónico fotosintético

Abreviación	Significado	Abreviación	Significado
r	Raíz	zm	zona meristemática
RA	Apice radicular	ZR	Ribósido de zeatina
rm	Meristemo radicular	°C	Grados Celsius
RNA	Acido ribonucleico	2,4-D	2,4-Diclorofenoxiacético
S	Escutelo	2iP	2 isopentenil adenina
SA	Meristemo apical	2iPA	2 isopentenil adenosina
SCE+H	Subdivisión de callo embriogénico conteniendo fitohormonas en el medio de cultivo	8-Aza.	8 azaadenina
SCE	Subdivisión de callo embriogénico		
SCE-H	Subdivisión de callo embriogénico sin fitohormonas en el medio de cultivo		
SD	Desviación estándar		
SE	Embrión somático		
sm	Apice meristemático		
ts	Estructuras transiúcidas		
VZ	Zona vascularizada		
Z	Zeatina		
Z9OG	Glucósido de zeatina		

RESUMEN

En los últimos años, la enfermedad conocida como amarillamiento letal del cocotero ha ocasionado la desaparición de aproximadamente 15 mil ha en la península de Yucatán y su avance continua hacia los estados del Golfo de México y del Pacífico. Aunado a este problema el 80% de las plantaciones son improductivas porque estas rebasan los 40 años de edad, por lo que se requiere producir alrededor de 32 millones de palmas de cocotero resistentes. La escasez de material hace necesario contar con un método de multiplicación masiva, a través de la micropropagación. El uso de explantes de plúmula de cocotero ha tenido progresos importantes para el desarrollo de un protocolo reproducible, sin embargo la eficiencia en la regeneración de plantas es todavía baja.

Los resultados de los estudios histológicos y morfológicos de la embriogénesis somática mostraron que el meristemo apical no contribuye a la formación del callo inicial, mientras que las hojas de la plúmula juegan un papel importante en la formación de callo inicial y callo embriogénico. Las células de la periferia de este órgano participan en la formación de los nódulos meristemáticos y embriones somáticos, este estudio permite entender mejor al proceso embriogénico en cultivos de plúmula.

Los estudios con citocininas exógenas (BAP, zeatina y 2iP) indicaron que no favorecen la formación de callo embriogénico (CE). La inhibición de CE está asociado probablemente a los niveles endógenos de citocininas en esta especie debido a que cuando se utilizó la 8-azaadenina (una anticitocinina) en 4.5 y 9 μM se obtuvo 65% de CE, esto significó un incremento del 23.8% respecto al control, además, con 4.5 μM se obtuvieron 8.8 embriones somáticos (ES), lo que representa un 52.51% de incremento en relación al control. El empleo del brasinoesteroide 22(S), 23(S)-homobrasinolido (HBr) en 0.01 y 0.1 μM (precultivo de 3 días), permitió la formación de CE en 90% y con 12 ES/CE lo que significó un incremento del 42.2% en formación de CE y del 100% en ES con relación al control. Los CE formados en medio con HBr, morfológicamente mostraron una gran abundancia de estructuras nodulares e histológicamente presentaron la ocurrencia de nódulos meristemáticos en su periferia y en su interior.

Cuando los CE fueron subdivididos en 4 partes, los resultados permitieron observar que el número de embriones somáticos se incrementó presentándose ES tipo torpedo principalmente y en mayor sincronización con respecto a CE. Por último, los resultados obtenidos con una combinación de 90 μM de ácido abscísico + 15 g L^{-1} de polietilenglicol favoreció la formación de ES, obteniendo 10.5 ES (75% mayor al control) y 3 plantas por CE (71% más que el control). Un total de 30 plantas fueron aclimatizadas y presentaron una sobrevivencia del 90% en invernadero.

Los resultados obtenidos en este estudio son prometedores considerando el lento progreso de la investigación en la micropropagación de esta especie considerada como recalcitrante. La combinación e integración de diferentes estrategias incluyendo el uso de brasinoesteroides, anticitocininas, ácido abscísico/polietilenglicol, y algunas otras que han mostrado resultados promisorios como el ácido giberélico y la embriogénesis secundaria podrán mejorar significativamente la eficiencia de la regeneración *in vitro* de cocotero siempre y cuando sus efectos sean acumulativos.

ABSTRACT

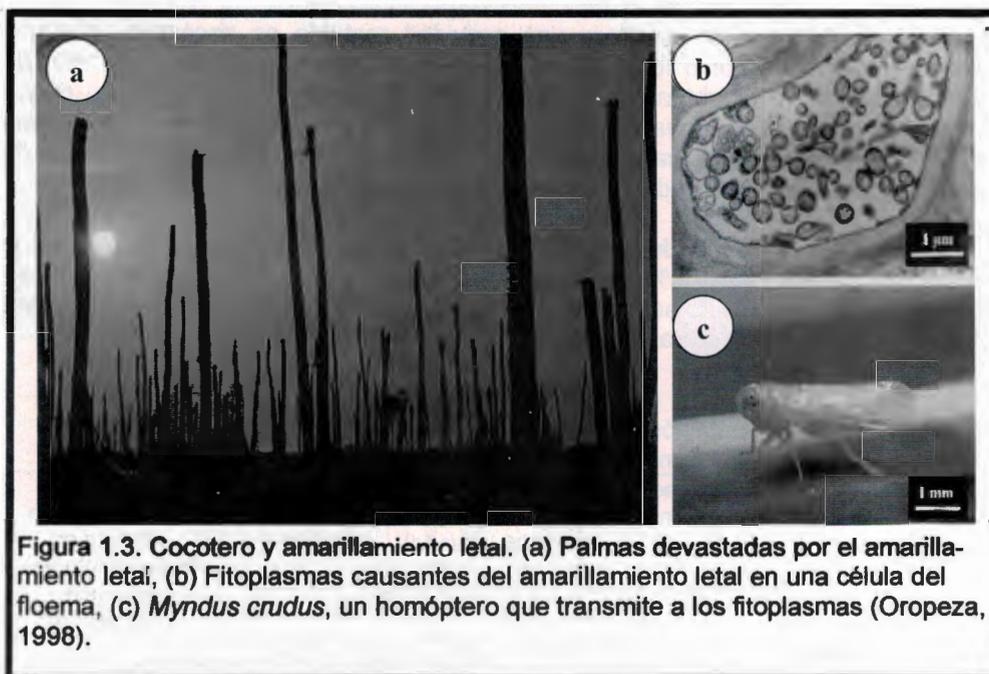
The culture of coconut palm is faced to some menaces; one is the lethal yellowing disease. This epidemic, that has been spread along the coast of the Peninsula of Yucatan and the Gulf of Mexico, has destroyed over 15 000 hectares of plantations. The problem is worst because most of the palms are more than 40 years old. This means that is necessary 32 millions of palms for the replantation. However there are not enough seeds to accomplish it. An approach would be the micropropagation of the coconut palm through somatic embryogenesis utilising plumule as explants. Although, there are promising results on this methodology the efficiency is still low for a practical application.

To better understand at the cellular level the events involved in coconut somatic embryogenesis, a detailed study of the histology during the formation and germination of the somatic embryos (SE) carried out. This study showed that the external leaves of the plumules play an important role during the formation of callus (C) and embryogenic callus (EC). The meristematic cells of the periphery of the callus developed into meristematic nodules (MN) and eventually SE.

The addition of some cytokinins such as BAP and 2iP into the culture medium was investigated. However, these compounds affected negatively the formation of EC. This inhibition could be associated to endogenous level of cytokinins because the adding of 8-azaadenine (anticytokinin) at 4.5 and 9 μM increased the formation of EC (23% over control). Besides with addition of this compound it was formed 8.8 SE per callus (52.51% over control). On other hand the utilisation of one brassinosteroid 22(S), 23(S)-homobrasinolid at 0.01 and 0.1 μM (preculture 3 days), increased the formation of EC (90%) and produced 12 SE/EC (42.2% and 100% respectively over control). The EC of the explants treated showed a great abundance of MN in the periphery and inner tissue compared with the control.

When the EC was subdivided in 4 parts, the results showed that the number of SE was increased. The torpedo like embryos were the major structures and the synchronisation was better utilising this method. In addition, the formation of SE produced with a combination of 90 μM of abscisc acid + 15 polyethylene glycol gL^{-1} was favoured. It was obtained 10.5 SE (75 % greater than control) and 3 plantlets/EC (71% greater than the control). A total of 30 plants were acclimatised in the green house with 90% of survival.

The results shown in the present work are very promising considering the very slow progress of micropropagation research for this very recalcitrant species that has taken now three decades since it was started. On the other hand other strategies currently being tested in our laboratory, includes secondary embryogenesis and the use of substances such as anticytokinins. Both approaches have shown promising results. We believe that the combination of different strategies, including the use of brassinosteroids, will increase the chances to improve significantly the efficiency of coconut regeneration provided their effects are cumulative.



Respecto a la formación de híbridos, en México actualmente se cuenta con 106 ha establecidas como huerta madre con cocotero Malayo Enano Amarillo, pero solamente 32 ha se encuentran en producción de híbridos (Figura 1.4).

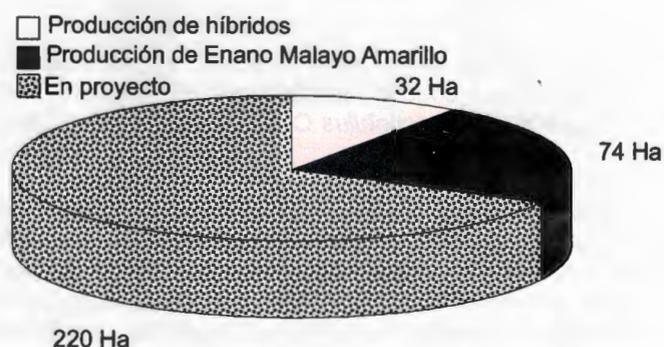


Figura 1.4. Situación de las huertas madre de cocotero en México.

Además de las que ya existen, se planea establecer 220 ha de huerta madre, no obstante, considerando la producción potencial de nueces híbridas de estas plantaciones así como de las 106 ha ya establecidas (solo 32 producen híbridos), se necesitarían 23 años para cubrir 200 mil ha (Cuadro 1.2). En la actualidad se requieren cerca de 50 millones de nueces híbridas, pero solamente se producen aproximadamente 283 mil nueces lo que significa establecer 1 600 ha por año.

Los resultados de evaluaciones de variedades de cocotero e híbridos obtenidos en Jamaica, especialmente el híbrido Maypan (Enano Malayo Amarillo X Alto de Panamá) habían permitido convivir con esta enfermedad, sin embargo reportes recientes indican que estos híbridos son susceptibles a una enfermedad con sintomatología similar al amarillamiento letal, aunque en México no existen reportes oficiales de la susceptibilidad de los híbridos. Esta susceptibilidad de materiales híbridos puede deberse a la existencia de variantes de fitoplasmas asociados con la sintomatología del amarillamiento letal (Harrison *et al.*, 2002). Recientemente, se ha reportado la resistencia de materiales de cocotero Alto del Pacífico 2, con una mortalidad del 12% contra 79% para el ecotipo alto del atlántico (Zizumbo *et al.*, 1999).

Cuadro 1.2. Situación de las huertas madre de cocotero en México y su potencial en la producción de híbridos.

Estado actual	Ha ¹	No potencial de nueces producidas ²	Estimación en años para cubrir 200 mil Ha ^{3,4}
Ha en producción, producción de híbridos y en proyección.	326	2 890 316	23
Ha en producción de EMA.	74	656 084	100
No. de ha en producción de híbridos.	32	283 712	231

¹ Las plantaciones están establecidas a una densidad de 143 plantas/Ha.

² Con base a 62 nueces híbridas por palma al año.

³ Estimando el 54.8% de germinación en almácigo.

⁴ Considerando una densidad de plantación de 180 plantas/ha.

Estos resultados sugieren que además de la obtención de híbridos, también se debe multiplicar material vegetativo del ecotipo Alto del Pacífico 2 debido a que presenta resistencia al amarillamiento letal. Como es conocido, el mejoramiento de palmas de cocotero se realiza a través de polinizaciones inducidas en progenitores femeninos establecidos en una huerta madre, pero desafortunadamente la producción de híbridos es escasa por lo que este factor es una fuerte limitante para multiplicar y disponer

rápidamente de las cantidades de palmas que se necesitan para el establecimiento y renovación de plantaciones.

Por lo tanto, es necesario disponer de un sistema para propagar masivamente cocotero híbrido y/o materiales de ecotipos resistentes como el Alto del Pacífico 2, por lo que es necesario mejorar los procesos de micropropagación o propagación *in vitro* para esta especie, ya que esta puede permitir una rápida multiplicación clonal de variedades seleccionadas (Murashige, 1974). Además esta técnica representa una herramienta potencial para producir materiales mejorados por ingeniería genética.

La micropropagación del cocotero

La embriogénesis somática permite la producción asexual de plantas al generar embriones somáticos, los cuales son estructuras bipolares capaces de crecer y formar plantas completas. En el caso de cocotero ya se han reportado protocolos para su micropropagación vía embriogénesis somática (Chan *et al.*, 1998; Hocher *et al.*, 1998), pero la eficiencia para la producción de embriones somáticos y su conversión a plántulas es aun muy baja. Por lo tanto, la producción de plantas por embriogénesis somática de materiales híbridos de cocotero representa una alternativa para aumentar la productividad, resistencia a enfermedades (amarillamiento letal principalmente) y mayor precocidad; además la introducción de estos nuevos materiales permitiría resolver el problema de senectud y establecer plantaciones en zonas devastadas por el amarillamiento letal así como anticipar la siembra en zonas libres de esta enfermedad.

En el inicio de la presente tesis se vislumbraron dos posibles escenarios para tratar de resolver el problema de multiplicación de materiales seleccionado: a) Por medio del desarrollo de un protocolo de mediana eficiencia y b) por medio de un protocolo de alta eficiencia (Figura 1.5).

Con base al lento desarrollo de un sistema de propagación *in vitro* de esta especie y considerando que el cocotero es una especie recalcitrante, se planteo enfocar los estudios hacia el desarrollo de un protocolo de mediana eficiencia, el cual consistiría de la combinación de la embriogénesis somática de explantes de plúmula para la propagación de materiales seleccionados para el establecimiento de plantaciones y la propagación convencional por semilla para establecer y renovar las plantaciones existentes en México. En la presente tesis se evaluaron una serie de estrategias para incrementar la eficiencia de la formación de embriones somáticos en particular, que incluyeron el uso de diferentes compuestos que no han sido previamente ensayados con explantes de plúmula: (a) fitohormonas sintéticas o naturales (ABA- conjuntamente con polietilenglicol - y brasinoesteroides); y (b) compuestos que afectan la acción de las fitohormonas (anticitocininas). También se ensayó la subdivisión de callos con capacidad embriogénica.

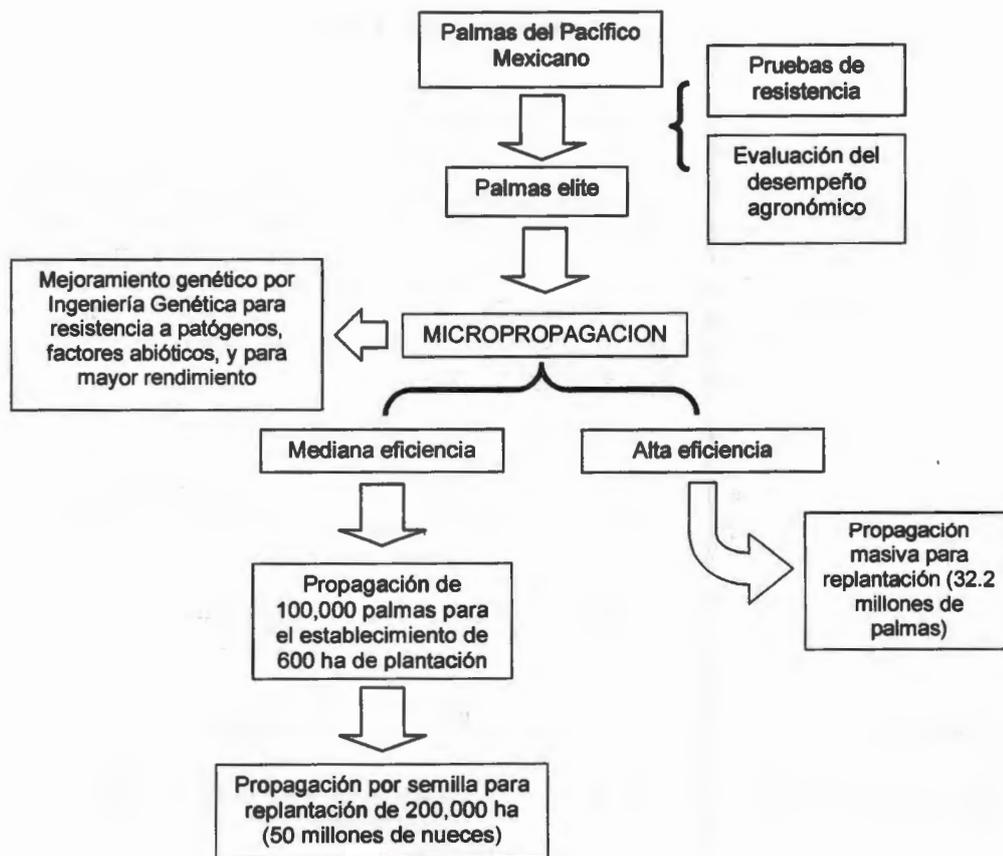


Figura 1.5. Esquema para la producción de palmas de cocotero para replantar 200 mil ha por micropropagación y producción por semilla.

CAPITULO 2

ANTECEDENTES

2.1 Micropropagación. La micropropagación o propagación *in vitro* es un método alternativo para la multiplicación masiva de especies vegetales (Villalobos y Thorpe, 1991). Se realiza por medio del cultivo de células vegetales, tejidos o aislamiento de órganos de una planta madre en un medio nutritivo artificial bajo condiciones estériles (Pierik, 1987; George, 1993a). Existen en la literatura numerosos ejemplos de especies que son micropropagadas (Cuadro 2.1) destacando principalmente especies hortícolas, ornamentales y más limitadas en especies leñosas.

Cuadro 2.1. Algunas especies que han sido micropropagadas.

Especie	Tipo de especie	Método	Referencia
<i>Anthurium andreanum</i>	Ornamental	Organogénesis	Pierik <i>et al.</i> , (1979)
<i>Rosa híbrida</i>	Ornamental	Organogénesis	Dohare <i>et al.</i> , (1991).
<i>Ananas comosus</i> L. Merr. (Piña)	Frutal	Organogénesis	Escalona <i>et al.</i> , (1999).
<i>Musa Sp.</i>	Herbácea	Organogénesis y Embriogénesis somática	Teisson y Côte (1997).
<i>Dendrocalamus strictus</i> Ness (Bambú)	Gramínea	Embriogénesis somática	Saxena y Dhawan (1999).
<i>Citrus deliciosa</i> Ten.	Frutal	Embriogénesis somática	Cabasson <i>et al.</i> , (1997).
<i>Carya illinoensis</i> (nogal)	Frutal	Embriogénesis somática	Burns y Wetzstein <i>et al.</i> , (1997).

La micropropagación de especies presenta ventajas en comparación con los sistemas convencionales de propagación, destacando principalmente: (a) el incremento rápido del número de plantas de algún genotipo y en menor superficie, (b) reducción del tiempo de multiplicación, (c) mayor control de sanidad del material que se propaga, (d) facilita el intercambio seguro de material *in vitro* de un país a otro con menores restricciones fitosanitarias (Murashige y Skoog, 1974; Villalobos y Thorpe, 1991).

Actualmente, algunas especies tropicales de importancia económica están siendo micropropagadas debido a que esta representa una forma de incrementar la tasa de multiplicación en varias veces más que su propagación natural. Por ejemplo en el caso de piña (*Ananas comosus* L. Merr) es posible por organogénesis incrementar hasta 40 veces más el número de plantas individuales por planta en un año (Jona y Menini 1987; Escalona *et al.*, 1999), mientras que para café es posible producir 5 402 000 embriones somáticos /1 g de materia fresca (Zamarripa, 1994).

Para que se obtenga la formación de una planta a partir de un tejido vegetal organizado o desorganizado es necesario que sé de un proceso de diferenciación celular, la cual comprende procesos de naturaleza morfológica y fisiológica que determinan la especialización de las células (Esau, 1959). Por lo que en el proceso de morfogénesis se presenta crecimiento y diferenciación de células que conducen a la formación de tejidos, órganos y organismos, de esta forma una planta se transforma así misma a partir de un óvulo fecundado en otro individuo (Salisbury, 1992).

Los métodos usados para micropropagar especies se basan en procesos de morfogénesis. De acuerdo a Litz y Jarret (1991), la organogénesis así como la embriogénesis somática se utilizan como una alternativa en los métodos de propagación.

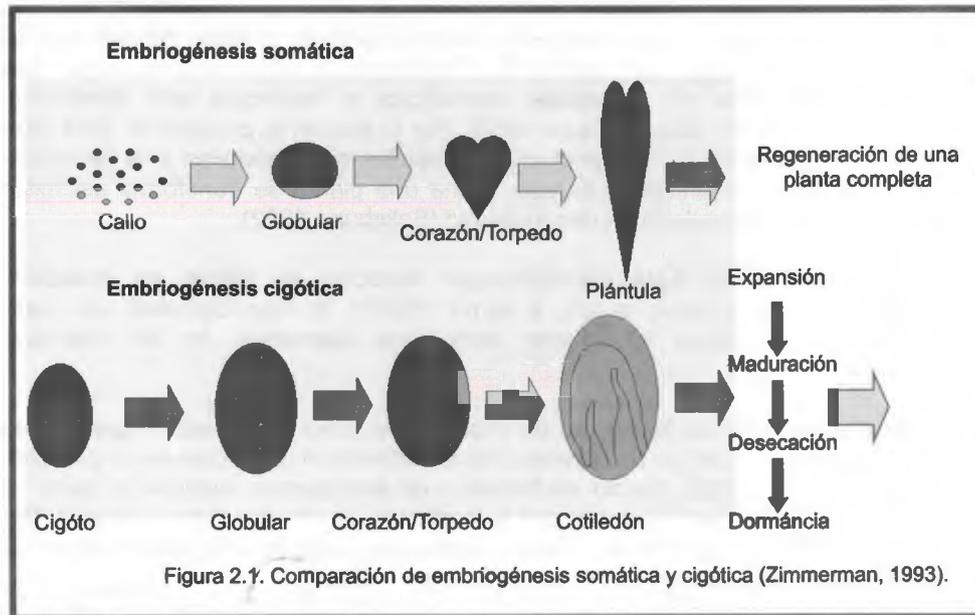
2.2 Organogénesis. La formación de órganos *de novo* es llamada organogénesis y esta se puede presentar en un órgano o tejido cultivado *in vitro*. Este es un proceso que comprende el desarrollo directo de brotes o de meristemos radicales a partir de un explante o indirectamente pasando por la formación de un callo (Litz y Jarret, 1991). Es posible obtener la formación *de novo* de: (a) brotes y raíz. (b) embriones somáticos. (c) iniciación de flores o partes de perianto (George, 1993a).

2.3 Embriogénesis somática (ESo). En cuanto a la embriogénesis somática (ESo), esta ocurre en muchas especies de forma natural, a veces a partir de células relacionadas con el desarrollo de la semilla, por ejemplo células de la nucela o sinérgidas en *Citrus* spp., *Mangifera indica*, *Eugenia* spp., *Garcinia mangostana* y *Lansium domesticum*, o a partir de integumentos del óvulo en *Eugenia malacencis* (Litz y Jarret, 1991). Sin embargo, en la mayoría de los casos, la ESo se induce en condiciones controladas.

La ESo inducida fue descrita hace 40 años en reportes independientes en zanahoria (Reinert, 1958; Steward, 1958; citados por Litz y Jarret, 1991). Ellos describieron la inducción de embriones somáticos a partir de callos derivados del ápice radicular de zanahoria (*Daucus carota*).

Esta técnica consiste en el desarrollo de embriones somáticos asexuales y que tienen su origen a partir de una o varias células hasta su formación (Ammirato, 1983). Los embriones somáticos (ES) son estructuras bipolares con eje radical-apical y no poseen conexión vascular con el tejido materno; estas estructuras bipolares deben ser también capaces de crecer y formar plantas normales y completas (Litz y Jarret, 1991). La diferencia principal con la embriogénesis cigótica es que las células que dan origen al embrión somático no resultan de la fecundación sexual (Tisserat *et al.*, 1979).

De acuerdo a Zimmerman (1993), la embriogénesis cigótica y la somática son dos eventos muy similares en morfología y desarrollo, ambos son parecidos en el estado globular y torpeda y difieren en que los ES no experimentan deshidratación o dormancia como se presenta en la Figura 2.1.



En las especies dicotiledóneas un ES atraviesa por los estados de desarrollo pro-embrional, globular, corazón, torpeda y que conduce a la formación de una plántula (George, 1993a) como se presenta en la Figura 2.2.

Los estados del desarrollo en monocotiledóneas son diferentes; los ES en estado globular se confunden con meristemos apicales. Los embriones crecen hasta alcanzar la forma de un brote a partir de cuerpos globulares discretos, que desarrollan estructuras parecidas a un escutelo y coleóptilo (George, 1993a) como se observa en la Figura 2.3.

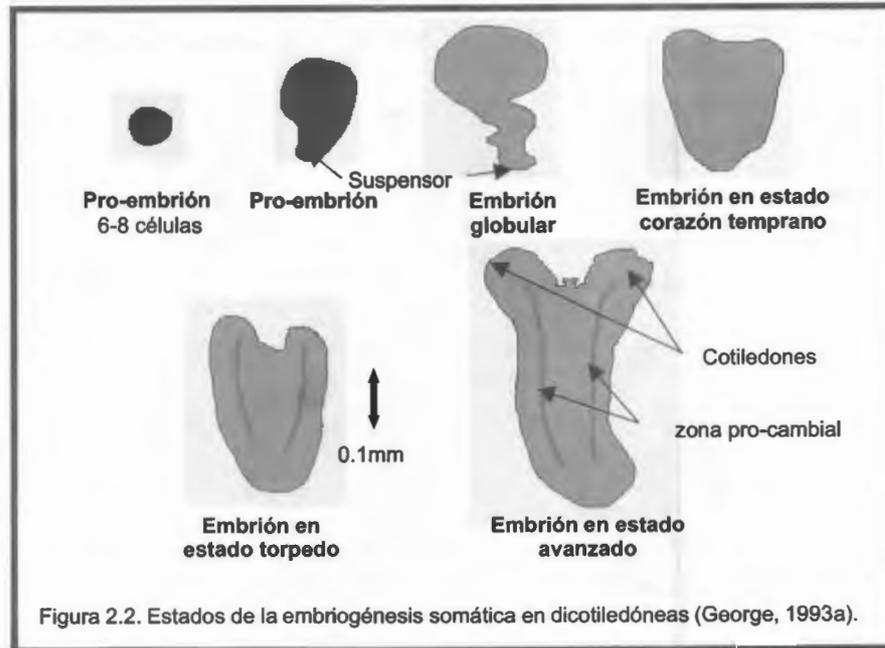
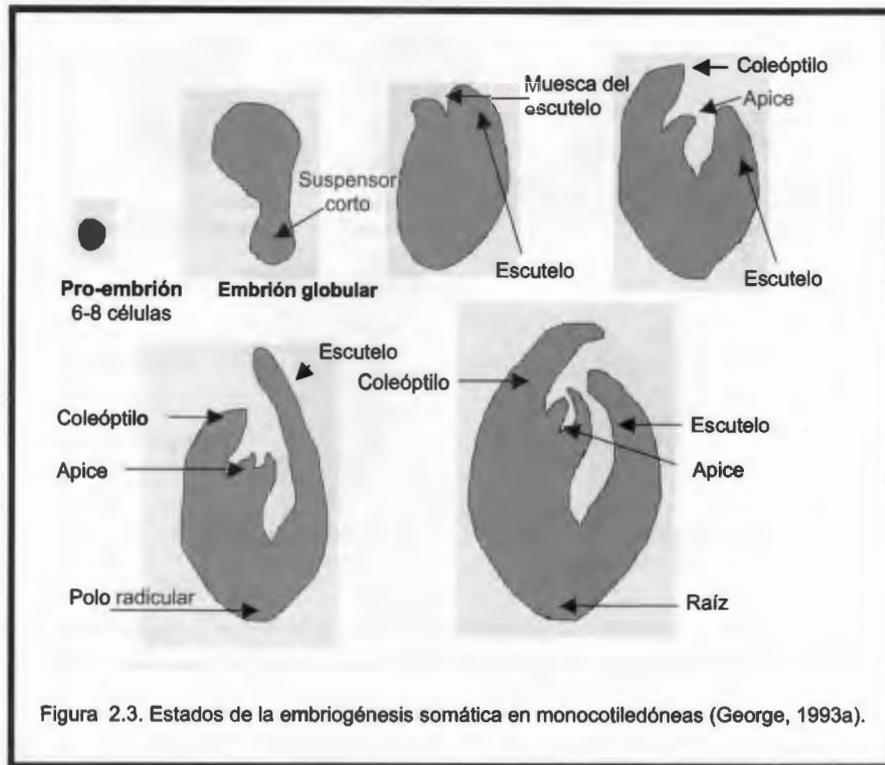


Figura 2.2. Estados de la embriogénesis somática en dicotiledóneas (George, 1993a).

Por otra parte, las células que pueden conducir a una respuesta embriogénica se han clasificado en dos formas: (a) células embriogénicas predeterminadas (PEDCs) y (b) células determinadas que inducen la embriogénesis (IEDCs). Las PEDCs son epigenéticamente embriogénicas sobre el explante, como por ejemplo las células de un embrión cigótico, mientras que las IEDCs son el producto de un "switch" epigenético que conduce a un estado embriogénico (Sharp *et al.*, 1980, 1982; Evans *et al.*, 1981; citados por Merckle *et al.*, 1990).

La ESo puede ser "directa" con células embriogénicas desarrollándose a partir de células del explante o esta puede ser "indirecta" con divisiones celulares no embriogénicas desorganizadas (callo) interpuestas entre el tejido del explante diferenciado y estructuras embriogénicas reconocibles (Merkle *et al.*, 1990).

La maduración y germinación de los ES los conduce a la formación de una planta, pero cuando estos ES fracasan en madurar normalmente, estos eventualmente producen ciclos sucesivos de embriones, muchos generalmente de células superficiales de los cotiledones o hipocótilos, estos eventos de producción continua de ES es conocida como embriogénesis somática recurrente, repetitiva, accesoria o secundaria (Merkle, *et al.*, 1990).



Las células de un tejido pueden ser inducidas a un estado embriogénico por la adición de fitohormonas, shock de pH y shock de calor principalmente (Tooneen y de Vries, 1995). A continuación, se describen aspectos relevantes como es el caso de las fitohormonas y su interacción con el ciclo celular, así como otros factores y compuestos que favorecen a la ESo.

2.4 El ciclo celular. Durante la división celular, una célula necesita pasar a través de procesos o fases, que son secuencialmente repetidos desde una división a la siguiente, a estas fases se le conocen como ciclo celular (George, 1993a). Este es un proceso altamente ordenado que da como resultado la formación de 2 células hijas. El ciclo celular se divide en cuatro fases (Figura 2.4): *G1*, *S* (replicación del ADN), *G2* y *M* (cariogénesis y citocinesis), asegurando que cada nueva célula hija reciba un complemento completo de material hereditario requerido para la alternación correcta entre las fases *S* y *M* (Stals e Inzé, 2001). Se conoce que el ciclo celular en levaduras, mamíferos y plantas, es conducido por una clase común de proteínas cinasas de serina/treonina altamente conservadas conocidas como cinasas dependiendo de ciclinas (*CDKs*), además tienen múltiples mecanismos evolutivos que regulan estrictamente la actividad de las *CDK* para mantener el orden temporal correcto de los eventos críticos del ciclo celular, tal como la replicación del ADN (Stals e Inzé, 2001).

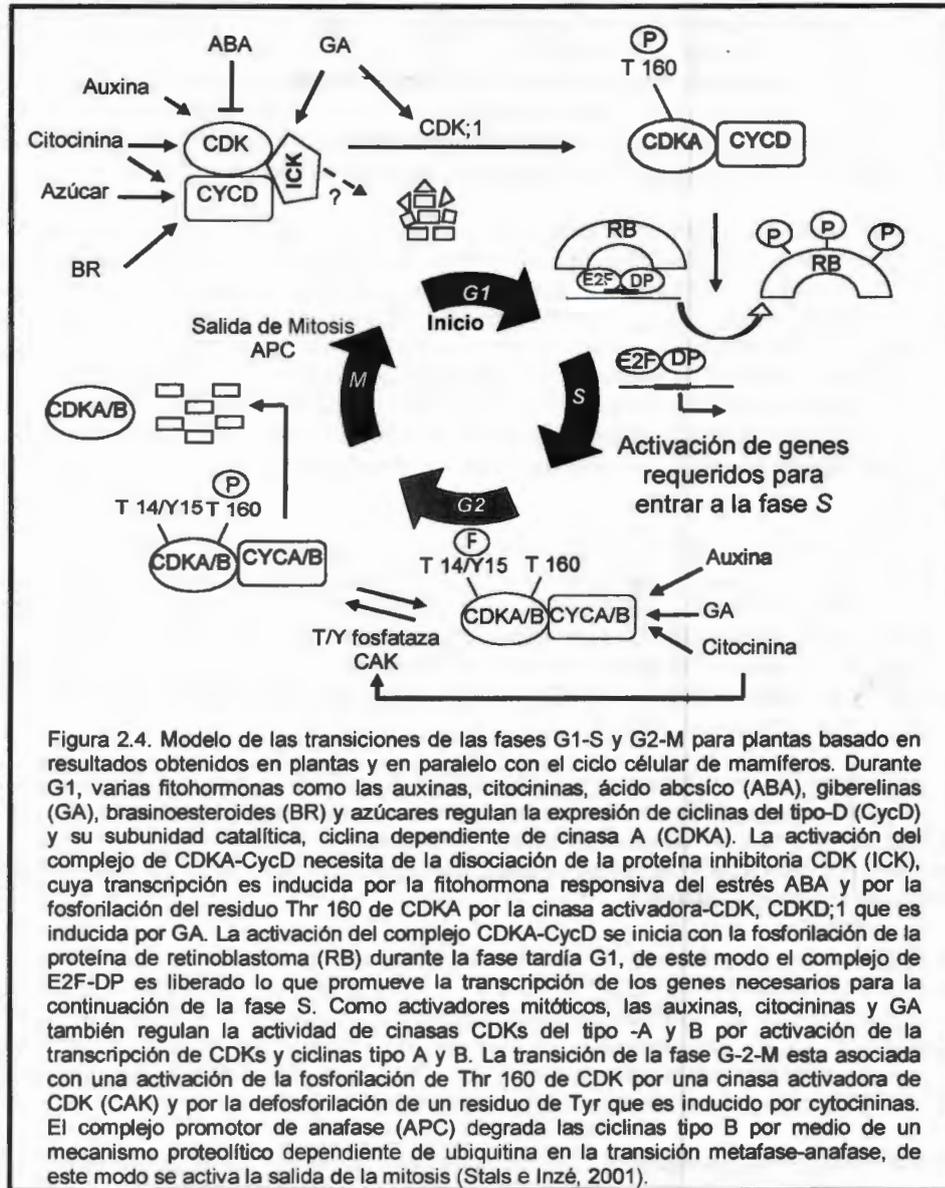


Figura 2.4. Modelo de las transiciones de las fases G1-S y G2-M para plantas basado en resultados obtenidos en plantas y en paralelo con el ciclo celular de mamíferos. Durante G1, varias fitohormonas como las auxinas, citocininas, ácido abscísico (ABA), giberelinas (GA), brasinoesteroides (BR) y azúcares regulan la expresión de ciclinas del tipo-D (CycD) y su subunidad catalítica, ciclina dependiente de cinasa A (CDKA). La activación del complejo de CDKA-CycD necesita de la disociación de la proteína inhibitoria CDK (ICK), cuya transcripción es inducida por la fitohormona responsiva del estrés ABA y por la fosforilación del residuo Thr 160 de CDKA por la cinasa activadora-CDK, CDK;1 que es inducida por GA. La activación del complejo CDKA-CycD se inicia con la fosforilación de la proteína de retinoblastoma (RB) durante la fase tardía G1, de este modo el complejo de E2F-DP es liberado lo que promueve la transcripción de los genes necesarios para la continuación de la fase S. Como activadores mitóticos, las auxinas, citocininas y GA también regulan la actividad de quinasas CDKs del tipo -A y B por activación de la transcripción de CDKs y ciclinas tipo A y B. La transición de la fase G2-M está asociada con una activación de la fosforilación de Thr 160 de CDK por una cinasa activadora de CDK (CAK) y por la defosforilación de un residuo de Tyr que es inducido por citocininas. El complejo promotor de anafase (APC) degrada las ciclinas tipo B por medio de un mecanismo proteolítico dependiente de ubiquitina en la transición metafase-anafase, de este modo se activa la salida de la mitosis (Stals e Inzé, 2001).

Se han hecho progresos considerables en la identificación de genes involucrados en la regulación del ciclo celular, por ejemplo se conoce que la proteína cinasa p34 codificada por el gene *cdc2* es un componente del control del ciclo celular en eucariontes requerido para las fases S hacia la G1 y su entrada a mitosis (Martínez, et

al., 1992). Además, la expresión de los genes *cdc2* y *cdc2a* son un factor crítico en la regulación de la actividad meristemática y el establecimiento de competencia proliferativa en *Arabidopsis thaliana* y pueden contribuir a la regulación temporal y espacial de la división celular en plantas (Martínez, *et al.*, 1992; Hemerly *et al.*, 1993). Los genes *cdc2aAt*, *cdc2bAt* y *cycb1;1* identificados en experimentos en plantas tienen también importancia en el control de la división celular (Mironov *et al.*, 1999).

2.5 El ciclo celular y fitohormonas. Las fitohormonas, incluyendo las giberelinas (Sauter *et al.*, 1995), etileno (Appelbaum y Burg, 1972) y ácido abscísico (Hemerly *et al.*, 1993) participan en la regulación de la proliferación celular dentro de ciertos tejidos y bajo condiciones específicas. Sin embargo, la habilidad de las citocininas y auxinas para estimular la proliferación de un amplio espectro de tipos de células sugiere que estas dos últimas son las fitohormonas primarias de la división celular (Hare y Staden, 1997). El papel individual de cada fitohormona en controlar las fases *G1* a *S* y la transición *G2* a *M* son todavía controversiales y la información concerniente al balance hormonal endógeno dentro del explante inicial es generalmente pobre (Boucheron *et al.*, 2002).

Aunque aún no es muy claro, el papel de las fitohormonas en la regulación del ciclo celular, se conoce que las ciclinas del tipo *CycD3* desempeñan una función importante durante la entrada a la fase *S* hacia la respuesta a fitohormonas vegetales tales como citocininas y brasinoesteroides (Stals e Inze, 2001). Recientemente, se reportó que en células de tallo de tabaco la alta competencia a diferenciar se asocia con la capacidad de expresar los genes *Cdc2a* y *Cycb* en presencia de altos niveles de citocininas endógenas (Bucheron *et al.*, 2002).

Se ha demostrado que los picos más altos en los niveles de citocininas tipo zeatina y dihidrozeatina alcanzados en su biosíntesis de *novo* están asociados con la mitosis y la replicación de ADN en células de tabaco sincronizadas (Redig, 1996), en contraste no se encontró correlación significativa entre los niveles de AIA y ABA en la progresión del ciclo celular (Redig, 1996).

Las citocininas son necesarias, en concertación con auxinas para la división celular durante la fase de transición en *G1-S* y *G2-M* en una amplia variedad de vegetales (Stals e Inzé, 2001). Los tratamientos con citocininas pueden actuar dentro de la fase de transición *G1-S*; por ejemplo en yemas dormantes de *Fraxinus*, la bencil aminopurina (20 μM) y ácido indolbutírico (0.1 μM) indujeron la transición de células inactivas (*G0*) hacia la fase *S* (Nougarède *et al.*, 1996).

Recientemente, se ha mostrado que los tratamientos con zeatina conducen a una sobrerregulación de *CycD3* en *Arabidopsis*, además la bencil aminopurina puede acortar la duración de la fase *S* y la cinetina está involucrada en la fosforegulación del punto de control *G2-M* (Francis y Sorrell, 2001). Las citocininas regulan parcialmente la transición de *G1-S* por la inducción de *CycD3;1* (Meijer *et al.*, 2000). Además, la transcripción de *CycD3* es sobrerregulada por los brasinoesteroides los cuales pueden sustituir a las citocininas en la promoción de la proliferación celular de callos en cultivos en suspensión de *Arabidopsis* (Hu y Li, 2000).

Uno de los efectos de las auxinas es la inducción de la formación de las raíces laterales por la iniciación de divisiones celulares periclinales desde la fase G2, un proceso que es precedido por el incremento de la expresión de *CycB1;1* en *Arabidopsis thaliana* (Stals e Inzé, 2001). También en esta misma especie se ha descubierto una ciclina tipo D (*CycD4;1*) que es expresada durante la formación de las raíces, manteniendo un control hacia la competencia mitogena dentro del periciclo (De Veyler *et al.*, 1999).

En cuanto a giberelinas se conoce que en presencia de estas fitohormonas la elongación celular y división se aceleran en los meristemos intercalares de arroz. Estas fitohormonas inducen por un mecanismo desconocido una ciclina *CDK* tipo A, conocida como *CDKD;1* durante la etapa de transición G1-S (Lorbiecke y Sauter, 1999) y también estimula la sobrerregulación de una ciclina *CDK* en la fase G2-M (Francis y Sorrell, 2001).

La fitohormona responsiva del estrés, el ácido abscísico inhibe la división celular en respuesta a señales adversas del medio ambiente, estos efectos pueden ser mediados por la inducción de un inhibidor *CDK*, *Ick1*, que juntos pueden disminuir la expresión del gene *CDKA;1*, resultando en una baja actividad de *CDK* (Wang *et al.*, 1998; Francis y Sorrell, 2001).

Respecto al etileno actualmente no existen datos moleculares que indiquen un vínculo con el ciclo celular, pero esto no excluye la posibilidad de una interconexión con este (Francis y Sorrell, 2001).

2.6 Factores que promueven la embriogénesis somática

2.6.1 Fitohormonas. Los compuestos que afectan el crecimiento y desarrollo en una planta son conocidos como fitohormonas o reguladores del crecimiento vegetal. Sin embargo a los compuestos que no son sintetizados por la planta y tienen la habilidad de influir en las respuestas fisiológicas se clasifican como reguladores del crecimiento vegetal (Ross, 1992, George, 1993b). Las fitohormonas juegan un papel importante en el crecimiento y desarrollo de una planta. Estos son compuestos que están presentes en la naturaleza, son sustancias orgánicas que influyen en procesos fisiológicos como el crecimiento, diferenciación y desarrollo en bajas concentraciones (Davies, 1995).

Actualmente se reconoce la existencia de cinco clases de fitohormonas: (1): auxinas, (2) citocininas, (3) giberelinas, (4) ácido abscísico y (5) etileno (Gaspar *et al.*, 1996). No obstante existen evidencias que los brasinoesteroides tienen varios efectos fisiológicos en el crecimiento y desarrollo de las plantas por lo que actualmente se les considera como fitohormonas (Clouse, 1996; Hooley, 1996; Yokota, 1997; Clouse y Sasse, 1998).

2.6.2 Auxinas y citocininas.

En general, el conocimiento de los mecanismos que intervienen en la percepción, transporte, metabolismo y acción de las auxinas en plantas superiores es limitado (Ceccarelli *et al.*, 2000). Estas juegan un papel importante en una amplia variedad de procesos fisiológicos del crecimiento y desarrollo (Fischer-Iglesias *et al.*, 2001). A nivel celular, actúan como una señal para la división, extensión y diferenciación durante el

curso del ciclo de vida de la planta (Guilfoyle *et al.*, 1998). Existen evidencias que una proteína unida a la auxina (ABP1) es un receptor funcional de esta (Napier y Venis, 1995), así mismo se han identificado elementos de respuesta conocidos como AuxRE (Guilfoyle *et al.*, 1998).

De acuerdo a Skoog y Miller (1957) la formación de brotes puede ser inducida a partir de callos de tabaco usando niveles relativamente bajos de auxinas y niveles altos de citocinina en el medio de crecimiento. Desde este descubrimiento, muchos aspectos de la diferenciación celular y organogénesis en tejidos y cultivo de órganos son controlados por una interacción entre la auxina y citocinina (George, 1993b). Sin embargo, en la embriogénesis somática esta relación parece ser algo diferente. En la mayoría de los casos la auxina conocida como 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) es utilizado para inducir la formación de embriones somáticos especialmente en plantas de la clase monocotiledónea; mientras que en dicotiledóneas, la combinación de esta fitohormona con citocininas la favorece como se puede apreciar en el Cuadro 2.2.

Cuadro 2.2. Porcentaje de la concentración total de auxinas y citocininas usadas en las dos etapas para obtener formación de brotes adventicios indirectos o embriogénesis indirecta (adaptado de George, 1993b).

Clase de planta	Tipo de fitohormona	Formación de brotes adventicios indirectos		Embriogénesis indirecta	
		Etapa I (Formación de callos)	Etapa II (Formación de brotes)	Etapa I (Formación de callos)	Etapa II (Formación de embriones y/o crecimiento)
Dicotiledónea	Auxina (μM)	10.1	5.7	14.6	1.7
	Citocinina (μM)	8.9	20.7	5.3	6.9
Monocotiledónea	Auxina (μM)	17.0	4.6	12.8	1.8

2.6.3 Auxinas y embriogénesis somática. El proceso de la embriogénesis somática se inicia en un medio conteniendo altos niveles de auxina, especialmente el 2,4-D, pero los embriones no desarrollan hasta que la concentración de auxinas se reduce (George, 1993a). En monocotiledóneas, particularmente en cereales y palmas se utilizan niveles altos del 2,4-D en el crecimiento de callos (Krikorian, 1995). Por lo general, para la inducción de la embriogénesis somática, las auxinas más comúnmente empleadas son el 2,4-D, el ácido naftalenacético (ANA) y el ácido indolbutírico (IBA).

Aunque el proceso de inducción de la ES no esta bien entendido, generalmente se cree que la presencia continua de auxinas en las células competentes induce la síntesis de los productos necesarios para completar el estadio globular de los embriones somáticos, sin embargo otros RNA mensajeros y proteínas inhiben la continuación del programa embriogénico, y cuando la auxina es eliminada provoca la inactivación de ciertos genes de tal manera que el programa puede continuar (Toonen y de Vries, 1995). No obstante, en el caso de zanahoria, un grupo de células en estado I es

inhibido su desarrollo por el 2,4-D cuando se adiciona después del estado corazón, deformando los ES (Figura 2.5). Este evento morfogénético es consecuencia de la auxina ya que cuando esta fitohormona se agrega al medio de cultivo en presencia de ES tipo corazón, interrumpe el gradiente endógena adquirido por la difusión de la auxina exógena en el ES lo que provoca la inhibición de su desarrollo posterior (Kawahara y Komamine, 1995).

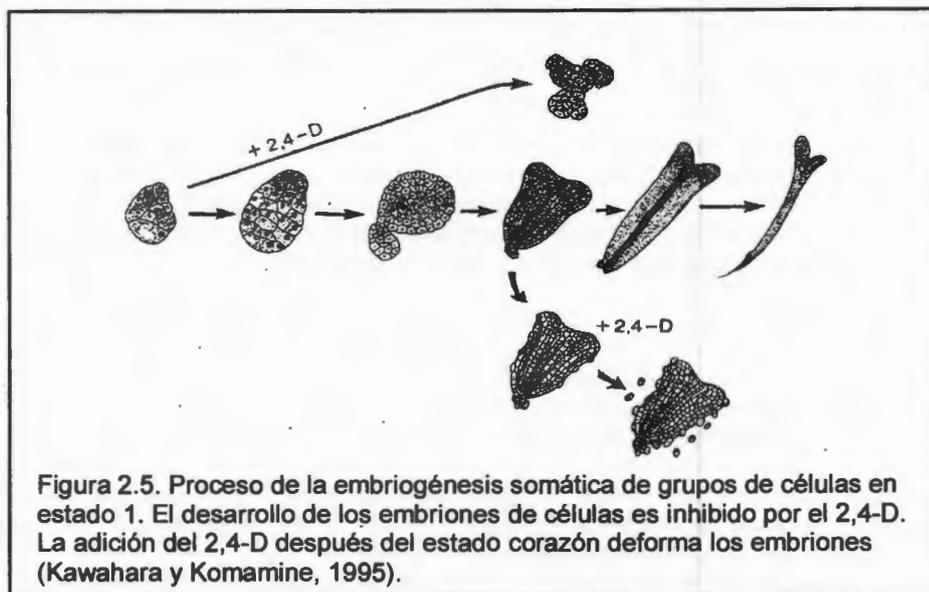


Figura 2.5. Proceso de la embriogénesis somática de grupos de células en estado 1. El desarrollo de los embriones de células es inhibido por el 2,4-D. La adición del 2,4-D después del estado corazón deforma los embriones (Kawahara y Komamine, 1995).

Posteriormente, en el desarrollo normal de un embrión, el transporte polar de esta fitohormona es importante en el establecimiento de la simetría bilateral durante la embriogénesis ya que de acuerdo a Liu *et al.*, (1993) al utilizar inhibidores del transporte polar de las auxinas en embriones cigóticos de *Brassica juncea* cultivados *in vitro* encontraron que producía la fusión de los cotiledones. Observaciones similares han sido indicadas en embriones cultivados *in vitro* en trigo (Fischer *et al.*, 1997; Fischer-Iglesias *et al.*, 2001).

2.6.4 Entrada de la auxina a los tejidos. El transporte de las auxinas en las células vegetales es a través de la membrana plasmática y esta mediado por: (a) difusión facilitada por gradiente de pH y (b) por dos tipos de acarreadores, uno que transporta a las auxinas del medio externo hacia el interior de la célula y por otro que las transporta del interior de la célula al medio externo (Rubery, 1978). En el caso específico en explantes de cocotero, Oropeza y Taylor (1994) encontraron evidencias de que la absorción se presenta a través de difusión facilitada por un gradiente de pH.

2.6.5 Citocininas. Las citocininas están involucradas en muchos aspectos del crecimiento y diferenciación de un vegetal, incluyendo la división celular, dominancia apical, movilización de nutrimentos, desarrollo de los cloroplastos, retardo de la senescencia, aumento de la expansión cotiledonal, desarrollo de cloroplastos, incremento de la apertura estomatal en algunas especies y crecimiento lateral de las yemas (Davies, 1995). La cinetina fue la primera citocinina descubierta y aislada en plantas por Skoog, posteriormente se han identificado al menos 25 citocininas con estructuras relacionadas a la cinetina, en forma de compuestos libres, glucósidos o ribosidos (George, 1993b). La degradación de las citocininas se realiza por la citocinina oxidasa, esta enzima rompe la cadena lateral de cinco carbonos y libera la adenina (Rinaldi y Comandini, 1999).

Como el caso de otras fitohormonas, debe ocurrir una amplificación del efecto inicial, debido a que estas están presentes en concentraciones bajas de 0.01 a 1 .0 μM (Ross, 1992). Se ha sugerido que estas pueden tener distintos mecanismos de acción en distintos tejidos y no se puede excluir la posibilidad que existan varios receptores de citocininas, cada uno responsable de iniciar una respuesta única (Hare y Staden 1997).

Existen algunas proteínas que se combinan en forma más o menos específica con las citocininas, estas se han encontrado en diversas partes de la planta, pero casi ninguna se combina con la suficiente especificidad con las citocininas activas (Napier y Venis, 1990). Existen varias proteínas solubles unidas a citocininas (CBPs), pero su papel funcional en la señalización de citocininas en gran parte no se conoce (Hare y Staden, 1997). Se han identificado sitios de unión de las citocininas en algunas plantas, específicamente en cereales (Trigo). La proteína llamada CBF-I (CBF= factor de unión de citocinina) se une a la citocinina como un receptor hormonal (Libbenga y Mennes, 1995). Además se han descrito diferentes receptores CBPs encontrados en el citoplasma o asociadas en el ribosoma, mitocondria y fracciones microsomales de varias especies de plantas y al menos siete se han identificado (Mitsui y Sugiura, 1993).

El papel de las citocininas en el medio de inducción de la ESo no es muy claro, aunque normalmente este medio incluye alguna de ellas como la cinetina y la bencil aminopurina pero en concentración baja de entre 0.5 a 2.5 μM (Litz y Jarret, 1991). De acuerdo a George (1993b) su empleo es más común en dicotiledóneas en la inducción así como en la formación de los embriones somáticos, mientras que al parecer en monocotiledóneas su empleo es más limitado, dado que existen evidencias de que estas fitohormonas no son favorables ya que una concentración de 0.01 μM de citocinina es suficiente para inhibir la embriogénesis en *Dactylis glomerata* (Wenck *et al.*, 1988).

2.6.6 Citocininas endógenas. La variación en respuestas a la embriogénesis somática en muchos sistemas vegetales puede deberse a las diferencias en el estado hormonal del explante inicial. En el caso de *Medicago falcata* se han estudiado niveles endógenos de citocininas, ácido abscísico y ácido indolacético. En este caso, los niveles altos de citocininas endógenas están relacionadas a una mejor respuesta embriogénica, para el caso del ácido indolacético no se observó una relación entre los contenidos endógenos con la capacidad embriogénica, mientras que para el caso del

ácido abscísico su contenido endógeno fue alto en líneas no embriogénicas como se muestran en el Cuadro 2.3 (Denchev y Atanassov, 1995).

Cuadro 2.3. Niveles de fitohormonas endógenas de alfalfa *M. falcata* (Denchev y Atanassov, 1995).

Línea	Fitohormona (ng/g)					
	ZR ¹	Z ²	2iP ³	2iPA ⁴	AIA ⁵	ABA ⁶
Embriogénica débil	32	220	16	4	7.5	2400
Embriogénica moderada	50	460	16	11	5.8	1400
Embriogénica alta	90	800	35	57	5.8	750

¹ZR= Ribósido de zeatina. ²Z=Zeatina. ³2iP= 2 isopentenil adenina.

⁴2iPA= 2 isopentenil adenosina. ⁵AIA= Acido indolacético. ⁶ABA= Acido abscísico.

En contraste, en estudios reportados por Wenck *et al.*, (1988) y realizados en explantes basales de hojas con genotipos no embriogénicos de pastos (*Dactylis glomerata* L.), encontraron un contenido de 3.5 veces más citocininas endógenas que los genotipos embriogénicos como se presenta en el Cuadro 2.4.

Cuadro 2.4. Contenidos totales de citocininas endógenas en genotipos embriogénicos (E) y no embriogénicos (NE) de *Dactylis glomerata* L. (adaptado de Wenck *et al.*, 1988).

Genotipo y parte de la hoja.	Total de citocinina (µg/g peso seco)
NE ₁ (B) ¹	10.74
NE ₂ (B)	8.06
E _{1a} (B)	2.08
E _{1b} (B)	3.05
E _{1a} (D) ²	4.47
E _{1b} (D)	2.04

¹ Basal de 0-3 cm y ² Distal de 3-6 cm.

Las principales citocininas endógenas encontradas fueron: ribósido de zeatina, zeatina, dihidroxizeatina y ribósido de hidroxizeatina. Además se observó que la presencia de pequeñas cantidades de citocininas exógenas inhibe la embriogénesis somática, como se aprecia en la Figura 2.6 (Wenck *et al.*, 1988).

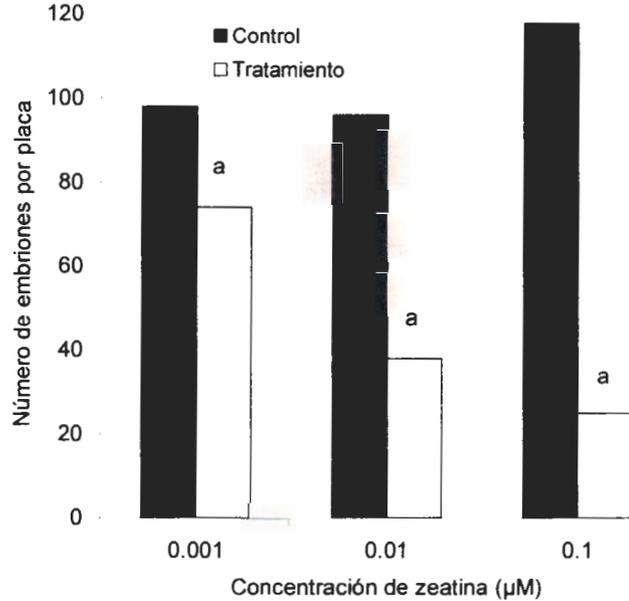


Figura 2.6. Efecto de la aplicación exógena de zeatina en la embriogénesis somática. Las medias de los tratamientos indicados con una "a" son significativamente diferentes en el nivel de 0.01 por prueba de pares de valores de t (Wenck *et al.*, 1988).

Es importante destacar que estudios realizados con callos no embriogénicos de cocotero mostraron que estos presentan niveles elevados de citocininas endógenas mientras en callos embriogénicos la cantidad fue menor (Saézn, 1999). En mayores cantidades se encontraron citocininas isoprénicas y en menor proporción las aromáticas como se presenta en la Figura 2.7.

Las principales citocininas isoprénicas encontradas en los cultivos de plúmula fueron en el siguiente orden creciente: Dihidrozeatina (DHZ), Ribósido de dihidrozeatina (DHZR), Ribósido de isopentenil adenina (iPR), Ribósido de zeatina (ZR), Glucósido de zeatina (Z9OG), 9-glucósido de isopentenil adenina (IP9G) como se puede observar en la Figura 2.8 (Saézn, 1999).

Con base a los reportes de la literatura las citocininas endógenas en niveles altos pueden actuar favoreciendo la embriogénesis somática en especies con buena capacidad embriogénica, mientras que en especies de baja capacidad embriogénica, los niveles endógenos altos de citocininas inhiben la embriogénesis somática.

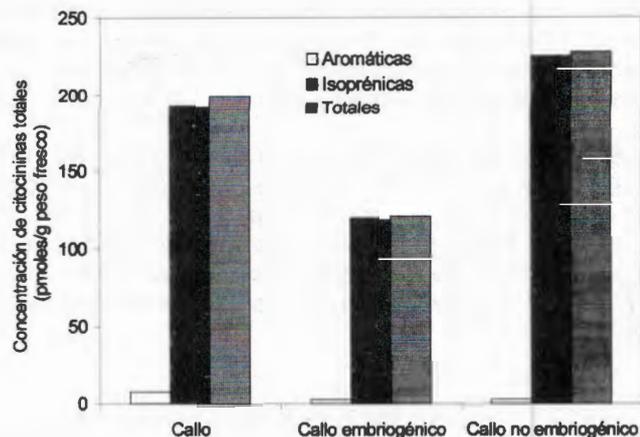


Figura 2.7. Contenido de citocininas totales en cultivos *in vitro* a partir de plúmulas. Los callos tienen 3 meses de cultivo, los callos con estructuras embriogénicas y los no embriogénicos tienen 6 meses de cultivo en MI con carbón RPQ-F. Las muestras fueron purificadas parcialmente por HPLC utilizando un sistema de disolventes gradual de metanol-H₂O 15-40% durante 40 minutos. Las fracciones fueron colectadas cada minuto con un flujo de 1.5 ml min⁻¹. A cada fracción se les determinó el contenido de citocininas por la técnica ELISA utilizando anticuerpos específicos para los diferentes tipos de citocininas (Saénz, 1999).

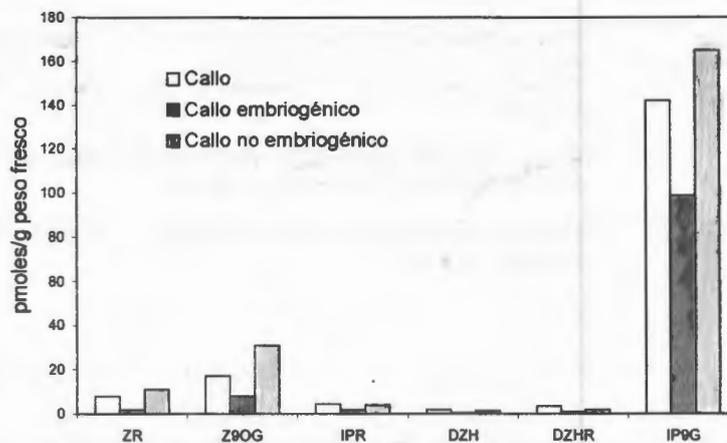


Figura 2.8. Citocininas isoprénicas endógenas encontradas en tejidos con diferentes respuestas morfológicas originados a partir de plúmula de cocotero (Saénz, 1999).

2.6.7 Anticitocininas. Los antagonistas de las citocininas o anticitocininas tienen un valor potencial en el estudio de los mecanismos de acción así como en estudios fisiológicos del crecimiento en varios sistemas que no requieren una fuente exógena de citocinina para su desarrollo normal (Skoog y Schmitz, 1973).

Aunque el modo de acción de las citocininas no es claro aun, las anticitocininas son usadas en el estudio de los aspectos del modo de acción de las citocininas. Puesto que inhiben la acción de las citocininas en sus respuestas fisiológicas típicas de forma competitiva (Sergiev *et al.*, 1995). Se cree que las anticitocininas se unen a un receptor de citocinina compitiendo con citocininas y esto inhibe sus efectos biológicos (Braul *et al.*, 1997). En el Cuadro 2.5 se presentan algunos de los efectos más importantes de estos compuestos.

Cuadro 2.5. Efectos fisiológicos de las anticitocininas.

Compuesto	Efectos fisiológicos	Referencia
2,cloro-4-ciclobutilamino-6-etilamino-1,3,5-triazina.	Promueven la embriogénesis somática en pastos.	Somleva <i>et al.</i> , (1995).
N-(4-piridil)-O-(4-clorofenil) carbamato.		
Atrazina.	Inducen la floración en plántulas de <i>Asparagus officinalis</i> L. cuando las semillas son remojadas por 12 días, la floración inicia a los 25 días después de la siembra, pero estas tienden a morir por su acción herbicida.	Abe y Kameya, 1986, citado por Iwamura (1990).
N-propil N-(p-cloro y bromofenil) carbamato.	Inducen floración en plántulas de <i>Asparagus officinalis</i> L. se obtuvo entre 90-95% de floración y estas no murieron debido a su baja toxicidad.	Yanosaca e Iwamura, 1989, citado por Iwamura, 1990).
S-triazinas.	Inhiben el flujo de electrones en el fotosistema II en cloroplastos y tienen acción herbicida.	Iwamura (1990).
2, 6-diaminopurina.	Inhiben el crecimiento de callos de soya que requieren cinetina.	Blaydes (1966).
8-azaguanina.		
8-azaadenina.		

En la búsqueda de antagonistas más específicos de las citocininas se han utilizado análogos de la purina, incluyendo 6-metilaminopurina, 2,6-diaminopurina, 8-azaguanina, 8-azaadenina y también de adenina, pero la inhibición con estos compuestos hacia las citocininas es débil (Skoog y Schmitz, 1973). La actividad anticitocinica también existe en compuestos estructurales relacionados a la octopamina, tales como la tiramina y dopamina (Christou y Barton, 1989).

En bioensayos con callos de tabaco realizados con citocininas como cinetina y BAP se ha observado que las anticitocininas consideradas con mayor actividad son la 4-ciclopentilamino-2 metiltio-pirrolo[2,3-d]-pirimidina (CPP) y el N-(4-piridil)-O(4-clorofenil)-carbamato (PC) (Sergiev *et al.*, 1995).

En la embriogénesis somática, Somleva *et al.*, (1995) mencionaron que las anticitocininas, triazina y carbamato estimulan la iniciación de callos y la formación de embriones producidos directamente e indirectamente en genotipos con poca capacidad embriogénica del pasto *Dactylis glomerata* L. Cabe señalar que estos genotipos contienen altas cantidades de citocininas endógenas en comparación con genotipos embriogénicos. La triazina se utilizó en concentraciones de 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} y 10^{-4} M y el carbamato en 10^{-7} , 10^{-6} y 10^{-5} M. La triazina incrementó en un 60% la formación de CE en la concentración de 10^{-7} con respecto al carbamato (Figura 2.9).

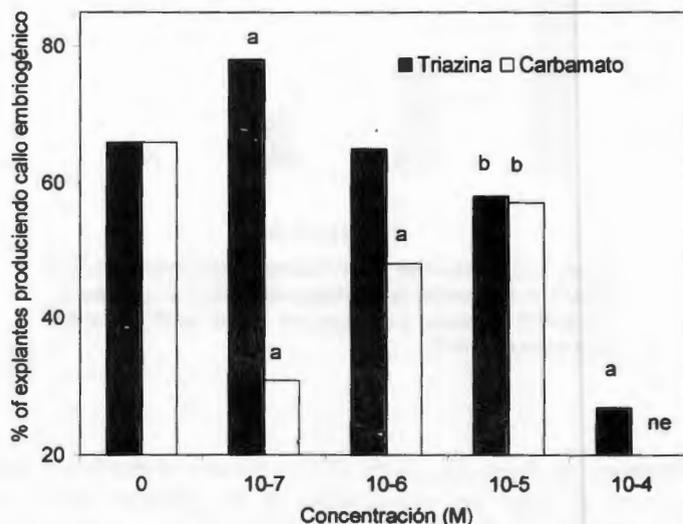


Figura 2.9. Eficiencia de la embriogénesis somática de explantes de hoja de pasto en la presencia de 2-cloro-4-ciclobutilamino-6-etilamino-1,3,5-triazina (I) y N-(4-piridil)-O-(4-clorofenil) carbamato (II); n.e. No evaluado, a - significativo en 0.01; b-significativo al 0.05 (Somleva *et al.* 1995).

Además, esta misma anticitocinina promovió una alta intensidad de embriogénesis indirecta en un 760.4% de ES con una concentración de 10^{-7} M (Figura 2.10) en comparación con el carbamato que solamente presentó ligeramente arriba del 300% de ES.

En estudios recientes con anticitocininas se ha reportado que estas reducen los niveles de citocininas endógenas en los cultivos de 5 días en *Dactylis glomerata* L. (Somleva, *et al.*, 1999 citado por Somleva *et al.*, 2000), y probablemente promueven la expresión de la capacidad embriogénica durante el siguiente subcultivo, posiblemente a través de la modificación del estado de oxido/reducción, lo cual favorece la embriogénesis somática (Somleva *et al.*, 2000).

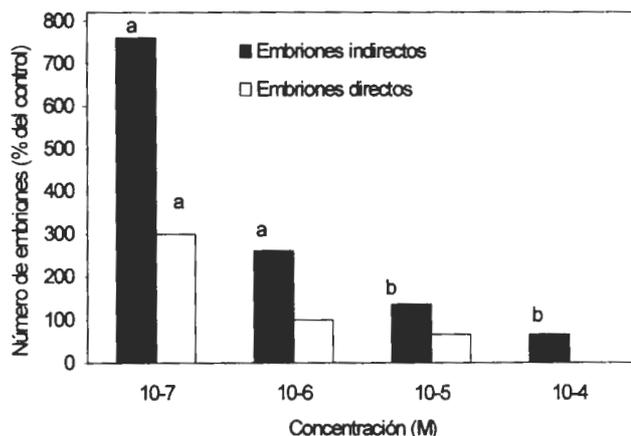


Figura 2.10. Influencia del 2-cloro-4-ciclobutilamino-6-etilamino-1,3,5-triazina en la intensidad de embriogénesis somática de explantes de hojas de *D. Glomerata*, a -significativo al 0.01; b - significativo al 0.05 (Somleva *et al.*, 1995).

2.6.8 Ácido abscísico. El ácido abscísico (ABA) está involucrado en varios procesos fisiológicos como es el caso del crecimiento de las plantas, en el desarrollo de embriones y la maduración de semillas (Dunstan *et al.*, 1998). En las semillas promueve la síntesis de proteínas de almacenamiento, la inhibición de la germinación precoz, tolerancia a la deshidratación, supresión de la movilización de reservas e inducción de la dormancia (Gaspar *et al.*, 1996). El ABA influye en los procesos de morfogénesis, este es un inhibidor para el crecimiento de callos pero es esencial para el crecimiento normal de los ES y en su presencia adquieren parecido a los embriones cigóticos en su desarrollo y estructura (George, 1993b).

No obstante, parece ser que la respuesta depende de la etapa del desarrollo en que se encuentren los embriones somáticos, por ejemplo en alfalfa, los embriones somáticos adquieren sensibilidad a esta fitohormona en la etapa torpedo o al principio de la etapa cotiledonar, justamente antes de la germinación precoz. Si es aplicado antes o después de estas etapas no se induce la tolerancia a la deshidratación (McKersie *et al.*, 1995).

La deshidratación de los ES tiene la ventaja de ejercer como una señal del desarrollo en los procesos de maduración de embriones (McKersie *et al.*, 1995), esto causa la síntesis de proteínas de reservas, por lo que las plantas provenientes de los ES deshidratados suelen ser más vigorosas y presentan un desarrollo más rápido y uniforme que las plantas procedentes de ES germinados de forma precoz (McKersie, 1989). La mejor conformación de los ES puede estar asociada con la promoción de la síntesis de proteínas de almacenamiento (Gaspar *et al.*, 1996), por lo que se induce una sincronización de la maduración que trae como resultado una mayor germinación y uniformidad de las plántulas (Bornman, 1993). Las proteínas de almacenamiento se han considerado como marcadores característicos en embriones cigóticos de angiospermas y gimnospermas (Dunstan *et al.*, 1998). Además, las aplicaciones de ABA exógeno inducen la expresión de genes que codifican para formación de proteínas abundantes de la embriogénesis tardía (LEA) las cuales participan en la tolerancia a la deshidratación (Dunstan *et al.*, 1998).

En *Hevea brasiliensis*, el ABA favorece el desarrollo de un alto número de embriones somáticos en 10^{-5} M cuando se cultivan masas celulares durante 2 meses en presencia de esta fitohormona como se puede apreciar en la Figura 2.11 (Veissereire *et al.*, 1994).

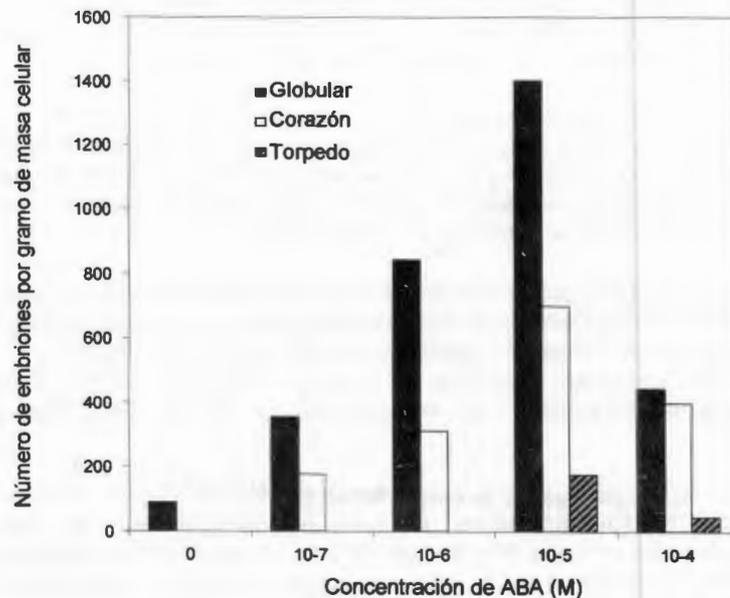


Figure 2.11. Efecto del ácido abscísico (ABA) en el desarrollo de embriones somáticos en *Hevea brasiliensis*. La evaluación de las diferentes formas fue hecha después de 2 meses de cultivo (Veissereire *et al.*, 1994).

Samosir *et al.*, (1999) reportaron la evaluación de agentes con actividad osmótica y ABA para mejorar la sincronización y aumento de la maduración de embriones

somáticos de cocotero. Estos investigadores encontraron que la combinación de 45 μM ABA y 30 gL^{-1} de PEG (peso molecular 3,350) produjeron mayor desarrollo sincronizado y mayor número de brotes que el control, además permitió disminuir el crecimiento de los callos no embriogénicos y el tejido haustorial. Después de doce semanas en medio de germinación se obtuvieron más brotes que en otros tratamientos.

En un reporte más reciente, Fernando y Gamage (2000) encontraron un efecto favorable del ABA, obteniendo un 67.4% de embriogénesis somática, cuando aplicaron 5 μM de ABA durante 5 semanas en callos nodulares de 2 meses de iniciados a partir de embriones cigóticos inmaduros de *Cocos nucifera*, sin embargo no mencionan el número de embriones somáticos obtenidos por callo embriogénico.

2.6.9 Brasinoesteroides. En la década de los 30 y los 40, diversos investigadores habían reconocido la existencia de sustancias estimuladoras del crecimiento vegetal en extractos de polen y semillas inmaduras principalmente (Núñez, 1996). En 1970 y 1972 Mitchell *et al.*, (citado por Adam y Marquardt, 1986) reportaron que el polen de colza (*Brassica napus* L.) producía un poderoso efecto acelerador, cuando se aplicó al entrenudo del frijol propiciando el alargamiento celular (respuesta típica de las giberelinas) con el engrosamiento y la curvatura. El principio activo fue aislado de 40 Kg de polen de colza de donde obtuvieron 4 mg de un compuesto cristalino que fue llamado brasinolido. Los brasinolidos y compuestos relacionados son conocidos colectivamente como brasinoesteroides (BRs) (Adam y Marquardt, 1986).

Yamamoto *et al.*, (1997) mencionaron que los BRs son un grupo de esteroides que están presentes en muchas especies vegetales. Los progresos recientes en el conocimiento acerca de la síntesis y función de estos, obtenidos de varias biosíntesis y suministrados a mutantes sensibles han evidenciado que son fitohormonas (Clouse 1996, Hooley 1996, Yokota 1997, Bishop y YoKota, 2001).

Existen evidencias de que estos compuestos al igual que las giberelinas y las auxinas están ampliamente distribuidos en el reino vegetal, tanto en plantas superiores como inferiores. De acuerdo a Takasuto (1994), químicamente se han identificado cerca de 30 BRs de fuentes vegetales. Los BRs se han encontrado en polen, hojas, yemas, flores y semillas principalmente, en proporciones y formas diferentes (Adam y Marquardt, 1986).

Clouse y Sasse (1998) resumieron el efecto fisiológico de los BRs en cinco puntos: (1) Expansión celular. (2) División celular. (3) Diferenciación vascular. (4) Senescencia (acelera la senescencia en hojas de plántulas de frijol mungo) y (5) Respuesta al estrés (aumenta la tolerancia al frío entre 1^o y 5^oC en plantas de arroz). Algunos ejemplos de sus efectos se presentan en el Cuadro 2.6.

Sasse (1990) indicó que el Brasinolido (BR) y auxinas inducen elongación de tallos de *Pisum sativum* L., sin embargo menciona que el BR no depende de una auxina para promover la elongación pero que pueden interactuar en una forma muy compleja con la auxina, y que en la elongación de tejido, probablemente los BRs aceleran el efecto de las auxinas. Cuando el brasinolido es aplicado en epicótilos de soya en 1 μM se observa un incremento máximo de 0.3 mm, mientras que el control registro un

crecimiento de 0.06 mm durante 6 horas de incubación, lo cual significa un aumento de hasta 8 veces (Zurek *et al.*, 1994).

Cuadro 2.6. Efectos fisiológicos de los BRs en especies vegetales.

Respuesta	Especie	Brasinoesteroide utilizado	Referencia
(1) Crecimiento.	Soya (<i>Glicine max</i>), crecimiento en hipocótilos.	24-epibrasinolido. Brasinolido, Isoepibrasinolido y 24-epibrasinolido.	Sathiyamoorthy y Nakamura (1990). Zurek <i>et al.</i> , (1994).
	<i>Capsicum annum</i> L., elongación de hoja y tallo.	24-epibrasinolido (EBR).	Frankc-Duchenne <i>et al.</i> , (1998).
(2) Diferenciación de elementos traquéales.	<i>Zinnia elegans.</i>), diferenciación de elementos traquéales.	Brasinolido. Homobrasinolido. Brasinolido.	Iwasaki y Shibaoka (1991). Yamamoto <i>et al.</i> , (1997).
(3) División celular.	<i>Petunia híbrida</i> Vilm, suspensiones de protoplastos.	Brasinolido.	Oh y Clouse (1998).
(4) Organogénesis.	<i>Arachis hypogaea</i> L., mayor formación de brotes.	Brasin.	Ponsamuel <i>et al.</i> , (1998).
	<i>Spartina patens</i> , mayor incremento del crecimiento y regeneración de brotes.	Brasinolido.	Zhou <i>et al.</i> , (2003).

Además, estos actúan de manera sinérgica con auxinas, como el ácido indolacético y el 2,4-D (Yopp *et al.*, 1981; Katsumi, 1985; Adam y Marquard, 1986). Cuando se utilizaron las concentraciones de 1 mgL⁻¹ y 10 mgL⁻¹ del homobrasinolido en presencia de diferentes concentraciones de ácido indolacético (AIA) se favoreció un incremento en la longitud de hipocótilos de pepino, pero en mayor proporción con 10 mgL⁻¹ del homobrasinolido y con 1 µM de AIA (Figura 2.12), mientras que en presencia del 2, 4-D y el homobrasinolido se presentó la mejor respuesta con 10 µM en ambas fitohormonas (Figura 2.13) (Katsumi, 1985).

Aunque no hay reportes en la formación de embriones somáticos, hay evidencias que los esteroides y BRs juegan un papel en la regulación y señalización en la división y expansión celular durante el desarrollo embriogénico y post-embriogénico en plantas (Jang *et al.*, 2000). En cultivos en suspensión de *Arabidopsis del2*, se ha encontrado

que el epi-brasinolido sobre regula la transcripción del gene que codifica para la ciclina vegetal de tipo-D (*CytD3*), y que este BR promueve la división celular a través del *CycD3*, y puede sustituir la citocinina en el cultivo de callos y células en suspensión. La inducción del gene *CycD3* por el BR mostró mayor síntesis de proteínas *de novo* (Hu y Li, 2000).

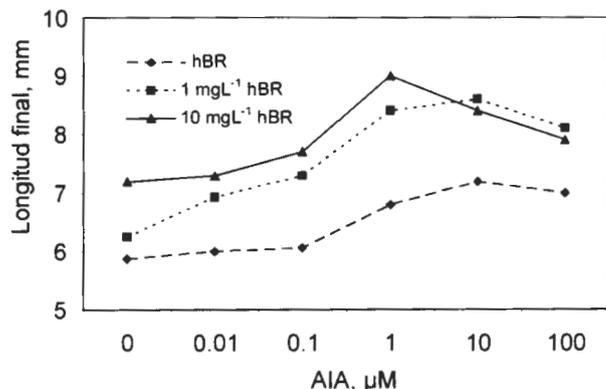


Figura 2.12. Interacción del hBR y AIA en la elongación de secciones de hipocótilo de pepino. Las medidas fueron hechas cada 24 h después de la incubación. La concentración del AIA fue variada (Katsumi, 1985).

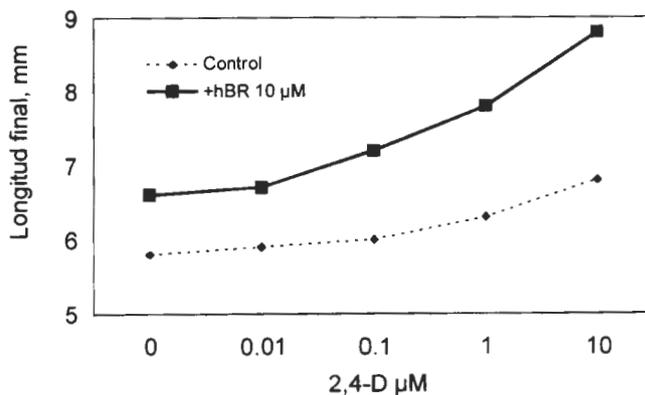


Figura 2.13. Interacción del hBR y 2,4-D en la elongación de secciones de hipocótilos. Las medidas fueron hechas 24 h después de la incubación (Adam y Marquard, 1986).

2.7 Factores físico químicos

2.7.1 Polietilenglicol (PEG). El PEG es ampliamente utilizado como un agente osmótico al inducir estrés hídrico en las plantas provocando un potencial hídrico negativo (Kriizeck, 1985). Este compuesto, es un polímero de cadena larga y está disponible en un amplio rango de pesos moleculares. El PEG de peso molecular de más de 4000 induce estrés hídrico en las plantas al disminuir el potencial hídrico de la solución, este no entra a la célula y no provoca toxicidad.

Un agente osmótico ideal no debe alterar directamente los procesos metabólicos y osmóticos celulares por su entrada al simplasto, al respecto, el PEG de peso molecular alto es mejor que otros agentes osmóticos porque sus moléculas de gran tamaño no penetran el plasmalema y ni el simplasto (Newton, *et al.*, 1990).

El potencial osmótico provocado por estas sustancias puede romper interconexiones citoplasmáticas entre las células (George, 1993b) por lo que se facilita el desarrollo de embriones independientes (Wheterel, 1984). La ESo es favorecida principalmente cuando el PEG se combina con él ABA, por ejemplo, Samosir *et al.*, (1999) reportaron la evaluación de agentes con actividad osmótica y ABA para mejorar la sincronización y aumento de la maduración de embriones somáticos de cocotero. Estos investigadores encontraron que la combinación con 45 μM ABA y 30 gL^{-1} de PEG produjeron mayor desarrollo sincronizado y número de plantas que el control, además permitió disminuir el crecimiento de los callos no embriogénicos y el tejido haustorial (Figura 2.14), después de doce semanas en medio de germinación se obtuvieron más brotes que en otros tratamientos.

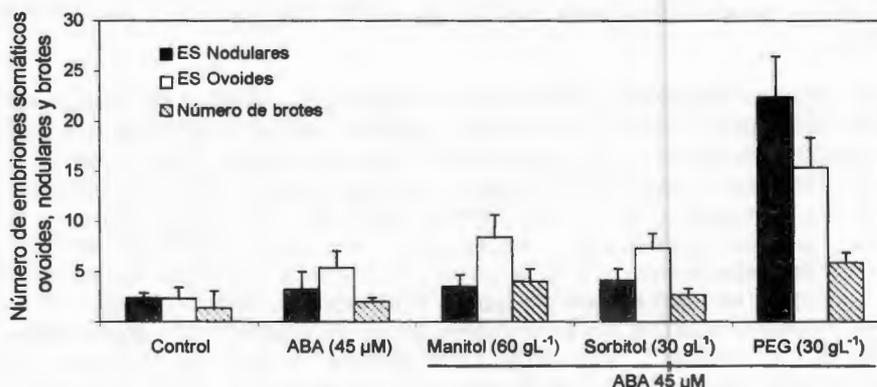


Figura 2.14. Efecto combinado de ácido abscísico, manitol, sorbitol o polietilenglicol (PEG) en la producción y maduración de embriones somáticos y la subsecuente regeneración de plantas. El período de cultivo fue de 4 semanas y después de este período se cultivaron en un medio de germinación. Los embriones somáticos nodulares y ovoides fueron estimados en 4 y 8 semanas después de iniciar los tratamientos y el número de brotes a las 12 semanas (n=4, donde cada repetición estuvo formada con un grupo de 10 callos y cada uno con un peso de 100 mg de peso fresco, Samosir *et al.*, 1999).

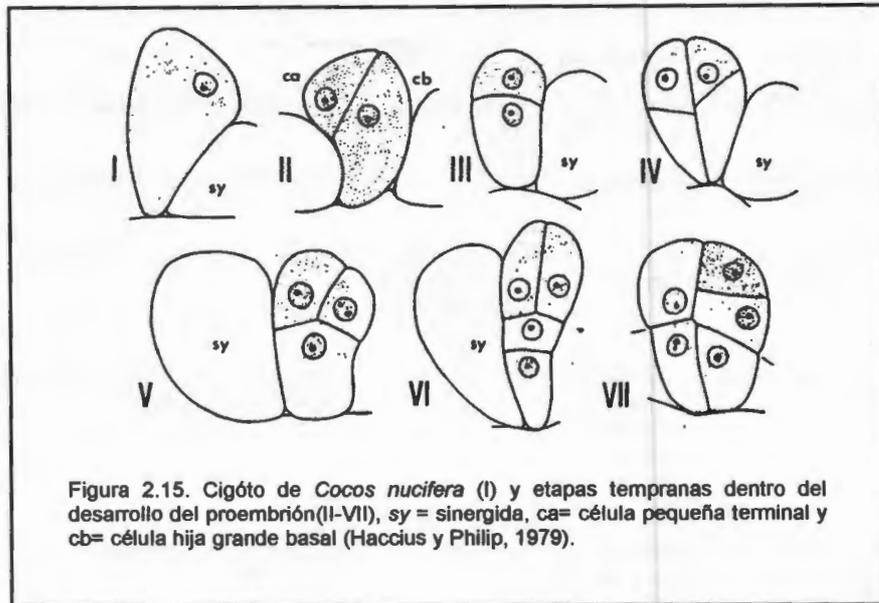
En abeto (*Picea abies* (L.) Karst) la combinación de 5% PEG y 15 μ M ABA propicio un incremento en la formación de embriones somáticos (cerca del 100%) después de 8 semanas en presencia de estos compuestos, en comparación al control adicionado solo con ABA (Find, 1997).

2.7.2 Inducción por daño mecánico. Se conoce que la adición de fitohormonas a un tejido puede inducir a ciertos grupos de células a un estado embriogénico, pero además se conoce que factores tales como el daño mecánico son capaces de inducir un proceso similar. Por ejemplo, al realizarse una ruptura o herida en un embrión cigótico de zanahoria se induce la formación de ES en un medio de cultivo libre de fitohormonas (Smith y Krikorian, 1989). Una observación similar fue hecha para *Dysosma pleiantha* por Meng-Jin y Wei-Chin (1987). A partir de embriones cigóticos heridos fueron inducidos callos embriogénicos, mientras los embriones intactos no respondieron.

Por otra parte, se conoce que cuando un tejido sufre daño mecánico o este es sometido a varias clases de estrés se induce la formación de fitohormonas, destacando principalmente el ácido abscísico (Peña-Cortes *et al.*, 1989), ácido jasmónico (Farmer y Ryan, 1990) y etileno (O'Donnell *et al.*, 1998). Eventualmente una herida conduce a estimular la división celular (Mariotti y Arcioni, 1983) y estimula la organogénesis en condiciones *in vitro* (Ambrozic-Dolinsek, *et al.*, 2001), por ejemplo cuando los cotiledones de *Pyrus malus* fueron previamente divididos a la mitad, en la región del corte se produjo callo que estimuló la formación de múltiples brotes adventicios (Browning *et al.*, 1987). Por otro lado, en hojas de *Platyserium bifurcatum* sometidas a estrés por heridas se incrementó significativamente el potencial de formación de gametófitos en comparación con hojas intactas (Ambrozic-Dolinsek, *et al.*, 2001). Los gametófitos se originaron de áreas entre las heridas (Ambrozic-Dolinsek, *et al.*, 2001), sugiriendo los autores que la síntesis o un cambio en el sitio de localización de síntesis de las fitohormonas dentro de la hoja herida podría contribuir a la inducción de los gametófitos.

2.8 Embriogénesis cigótica y formación del embrión cigótico de *Cocos nucifera*

L. En la embriogénesis cigótica, el embrión cigótico se origina a partir de una ovocélula que al ser fecundada forma un cigoto que da lugar al embrión. Este cigoto posee dos polos, un polo superior que es el principal asiento de potencialidad para su crecimiento y desarrollo, mientras que el polo inferior tiene esencialmente solo una función vegetativa, su crecimiento produce el suspensor que une al embrión con el micrópilo y es uno de los mecanismos para la transferencia de nutrientes hacia el embrión (Esau, 1977). En *Cocos nucifera* se conoce que la formación del embrión cigótico se inicia a partir de divisiones oblicuas o transversales del cigoto (Figura 2.15), separándose una pequeña célula terminal y una célula basal grande. A partir de la célula pequeña terminal se forma el embrión y de la célula basal grande se origina el suspensor, a partir de estos eventos se inicia la formación de un proembrión (Haccius y Philip, 1979).



2.9 Micropropagación del cocotero. El cocotero es propagado generalmente de forma sexual por semilla. Las semillas tardan en germinar entre 1 y 2.5 meses dependiendo del genotipo (Dominguez *et al.*, 1999). La propagación asexual de cocotero se inició con los trabajos exitosos reportados por Eeuwens (1976, 1978) y Eeuwens y Blake (1977) quienes identificaron los requerimientos minerales, orgánicos y reguladores del crecimiento para la producción de callo a partir de explantes de tallos, hojas e inflorescencias de cocotero maduro, a esta nueva formulación mineral se le denominó Y3. Varios grupos de científicos en diferentes países (Cuadro 2.7) han trabajado desde los años setenta con el objetivo de realizar la clonación *in vitro* de cocotero evaluando diferentes tipos de explante como hojas inmaduras, raíces, embriones e inflorescencias inmaduras con diferentes grados de éxito.

Recientemente ha sido posible la inducción de la embriogénesis y regeneración a partir de inflorescencias inmaduras (Verdeil y Buffard-Morel, 1995) y de plúmula (Hornung, 1995; Oropeza y Chan, 1995). En la actualidad la investigación desarrollada para la micropropagación de cocotero se realiza por medio de la embriogénesis somática a partir de explantes de inflorescencias y de plúmula, ya que a la fecha no existen reportes que indiquen la formación de brotes por organogénesis. En el caso particular de plúmula es posible obtener embriones somáticos y regeneración de plantas de manera reproducible y con mayor eficiencia como se puede observar en el Cuadro 2.8.

Cuadro 2.7. Antecedentes en la propagación *in vitro* de cocotero (*Cocos nucifera* L.).

Referencia	Expiante (s)	Medio (s)	Resultados
Eeuwens (1976, 1978).	Tallos, hojas e inflorescencias.	White, Heller y Murashige y Skoog.	Formulación mineral denominada Y3.
Apavatjirut y Blake (1977).	Explantos de tallo.	Y3.	Obtención de células meristemáticas en presencia de BAP.
Pannetier y Buffard-Morel (1982).	Hojas inmaduras.	Eeuwens (1976) y las vitaminas de Morel y Wetmore (1951).	Obtención de estructuras nodulares.
Gupta <i>et al.</i> , (1984).	Explantos de tallo, hoja y raquis de árboles maduros de 20 años.	Y3.	Las hojas cultivadas en 2,4-D formaron estructuras globulares.
Karunaratne y Periyapperuma (1989).	Embriones inmaduros de 6 a 8 meses después de la polinización.	De Fossard.	Formación de callos embriogénicos y germinación.
Ebert y Taylor (1990).	Inflorescencia inmadura.	Macronutrientes del MS y micronutrientes del medio Y3.	El carbón activado causa cambios en la disponibilidad del 2,4-D.
Buffard-Morel <i>et al.</i> , (1992).	Explantos foliares	Eeuwens (1976) y las vitaminas de Morel y Wetmore (1951).	Los embriones primarios se originan de divisiones mitóticas en células perivasculares, donde se producen áreas meristemáticas.
Verdeil <i>et al.</i> , (1992).	Hoja e inflorescencias.	Y3 y vitaminas de Morel y Wetmore (1951).	Obtuvieron plántulas <i>in vitro</i> de cinco clones de genotipo diferente, pero con muy baja eficiencia.
Verdeil <i>et al.</i> , (1994).	Inflorescencias.	Y3 y las vitaminas de Morel y Wetmore (1951).	Desarrollo de protocolo pero con baja eficiencia.
Hornung (1995).	Plúmula.	MS.	Se obtuvo formación de callos embriogénicos y regeneración de plantas.
Oropeza y Chan (1995).	Plúmula.	Y3.	Encontraron que la plúmula es un tejido más responsivo.
Chan <i>et al.</i> , (1998).	Plúmula.	Y3.	Desarrollo de un protocolo que permite la regeneración del cocotero en forma reproducible pero con baja eficiencia.

Cuadro 2.8. Protocolos desarrollados en la actualidad para la propagación *in vitro* de cocotero (*Cocos nucifera* L.).

Protocolo				
Inflorescencia ¹			Plúmula ²	
Etapas	% de explantes respondiendo	Duración de la fase (meses)	% de explantes respondiendo	Duración de la fase (meses)
Inducción de CE	15-40	4-8	-	1-2
Callo embriogénico	9.2	2-6	57	3
Embriones	6.4	4-6	22	3-6
Plántulas	0.25	10-12	22	6
Duración del proceso	-	26	-	15

¹ De acuerdo a Hocher *et al.*, 1998. ² Chan *et al.*, 1998

Estos protocolos son muy similares, en cuanto a sus fases de desarrollo hasta la obtención de una planta, ya que atraviesan por una fase de callo, callo embriogénico, formación de embriones somáticos, obtención de plántulas y adaptación *ex vitro* como se observa en las Figuras 2.16 y 2.17.

Aunque el protocolo a partir de plúmula presenta mejor respuesta en comparación al de inflorescencia, su eficiencia todavía es baja por lo que es necesario mejorar la formación de callo embriogénico, la formación de embriones por callo embriogénico, germinación y conversión de los embriones somáticos a plantas ya que esta especie presenta factores que limitan su propagación *in vitro*, como son: una baja capacidad embriogénica, intenso necrosamiento del tejido, heterogeneidad en su respuesta, fuerte habilidad de enraizamiento y formación de tejido tipo haustorial (Verdeil y Buffard-Morel, 1995), indudablemente la eliminación o reducción de estos aspectos permitirá incrementar la eficiencia de estos protocolos.

2.9.1 Etapas de la micropropagación del cocotero. Básicamente en los protocolos desarrollados se identifican tres etapas: (a) Formación de callo embriogénico. (b) Formación de embriones somáticos y (c) Formación de Plántulas.

2.9.2 Formación de callo embriogénico. La formación de callo embriogénico en el caso de plúmula generalmente ocurre después de 3 meses y hasta 6 meses con explantes de inflorescencia. El medio de cultivo utilizado generalmente se basa en el reportado por Eeuwens (1976), el cual contiene 2,4-D en diferentes concentraciones dependiendo del tipo de carbón activado utilizado ya que este causa la adsorción de esta fitohormona. En el caso de secciones de embrión cigótico se adiciona BAP al medio de cultivo en 5 μ M (Samosir *et al.*, 1999).

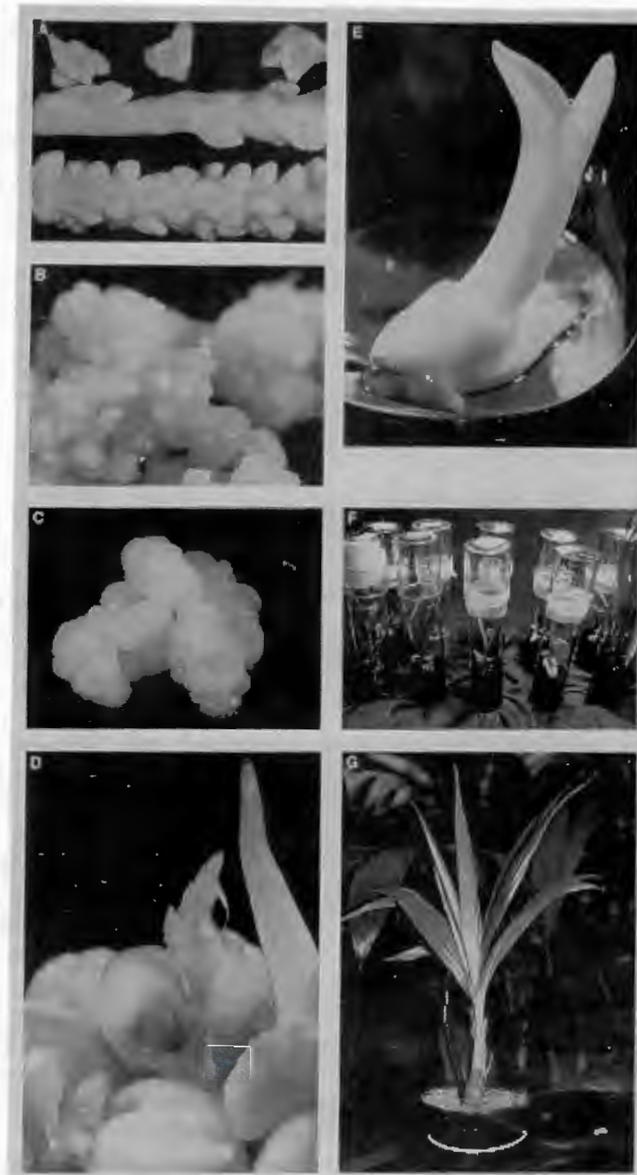


Figura 2.16. Protocolo desarrollado en Orstom/Cirad a partir de inflorescencias (Hoche *et al.*, 1998): (a) Preparación de explantes de inflorescencias inmaduras. (b) Callo embriogénico de cocotero. (c) Estructuras embrionarias tipo globular. (d) Embriones somáticos durante la fase de maduración. (e) Embrión somático germinando de cocotero. (f) Plántulas somáticas de cocotero. (g) Planta somática adaptada en invernadero.

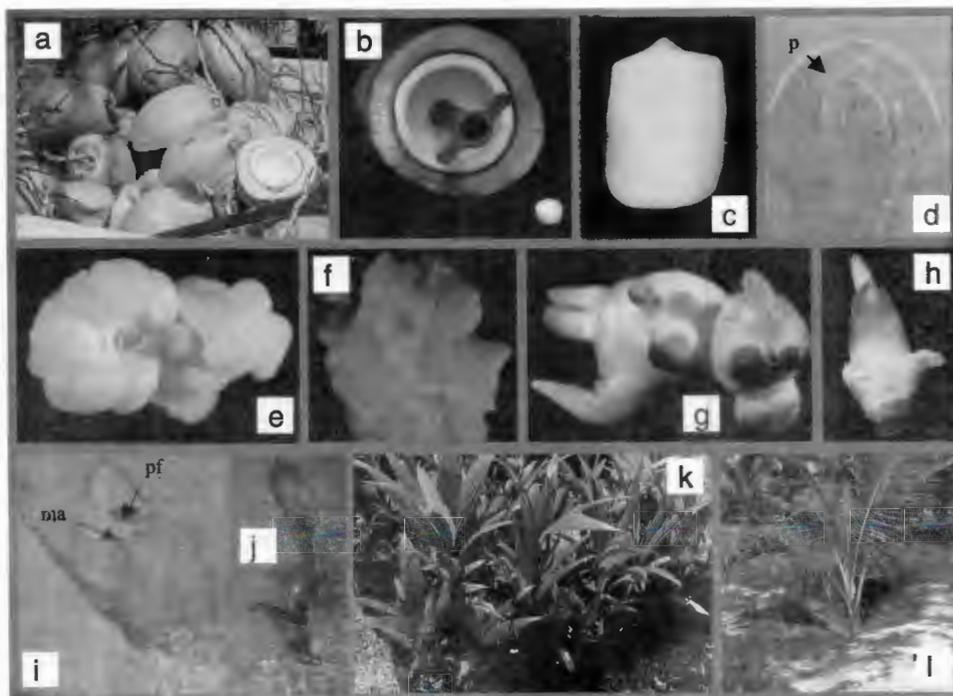


Figura 2.17. Protocolo desarrollado en CICY a partir de plúmula (Chan *et al.*, 1998). (a) Colecta de nueces de cocotero de 9 a 11 meses después de la polinización. (b) Las nueces son seccionadas a la mitad y se extrae un cilindro con albumen conteniendo el embrión cigótico. (c) Embrión cigótico aislado. (d) Corte histológico del embrión cigótico que muestra la zona donde se localiza la plúmula (p). (e) Callo embriogénico de cocotero con formaciones tipo globular. (f) Callo con embriones somáticos. (g,h) Embriones somáticos en germinación. (i) Corte histológico de un embrión somático que muestra sus primordios foliares (pf) y el meristemo apical (ma). (j) Plántula somática de cocotero. (k) Plantas somáticas adaptadas en vivero. (l) Plantas establecidas en campo.

2.9.3 Formación de embriones somáticos. La formación de embriones a partir del callo embriogénico se logra cuando se reduce la concentración de auxina en el medio de cultivo en los protocolos para inflorescencias y plúmula (Branton y Blake, 1986; Verdeil *et al.*, 1992; Verdeil *et al.*, 1994; Hornung, 1995; Chan *et al.*, 1998). La inclusión de citocininas favorece un desarrollo adecuado de los embriones y la germinación de los embriones ocurre en ausencia de auxina (Branton y Blake, 1986; Verdeil *et al.*, 1992; Verdeil *et al.*, 1994; Hornung, 1995; Chan *et al.*, 1998).

2.9.4 Formación de plántulas. La germinación de varios embriones en un mismo callo da lugar a cúmulos de brotes, los cuales deben ser separados mecánicamente para poder ser cultivados posteriormente en forma individual. La adición de agentes que promueven la formación de raíces (auxinas) no es necesaria en el caso de plúmula (Chan *et al.*, 1998) aunque ha sido reportada en cultivos de inflorescencia (Buffard-Morel *et al.*, 1995) y de embriones cigóticos inmaduros (Fernando y Gamage, 2001).

2.10 Uso del carbón activado (CA) en el medio de cultivo. El carbón activado es una sustancia que se añade al medio de cultivo de algunas especies debido a que produce efectos benéficos en muchos procesos *in vitro* al adsorber fenoles y compuestos tóxicos (Mensuali-Sodi *et al.*, 1993).

En el caso de cocotero, se ha encontrado que el CA favorece el desarrollo de los explantes en condiciones *in vitro*, posiblemente al eliminar los compuestos tóxicos del medio (Branton y Blake, 1983), por lo que se ha utilizado desde hace varios años como un componente esencial. Sin embargo, presenta algunos inconvenientes.

El CA generalmente adsorbe compuestos como las fitohormonas, particularmente a las auxinas, (2,4-D, ANA, AIA), las citocininas (BAP, cinetina) y el ácido abscísico (George, 1993b). Ebert y Taylor (1990) cuantificaron la adsorción de ¹⁴C-2,4-D en el CA mostrando que solamente 0.5% de la concentración inicial de 2,4-D (0.1 mM) quedó libre, es decir, no fue adsorbido por el CA (2.5 gL⁻¹) en medio líquido 5 días después de su preparación. En medio sólido el tiempo para su estabilización es mucho más largo (10-20 días). Además, los mismos investigadores reportaron diferencias en el crecimiento de tejidos de inflorescencias dependiendo del tiempo de reposo del medio usado, lo cual estuvo asociado a las variaciones en el contenido de 2,4-D libre. Por otro lado, se ha observado que entre diferentes marcas y tipos de CA se presenta variación de capacidades de adsorción y con diferentes respuestas morfogénicas de los tejidos durante el cultivo (Verdeil, 1998; Saénz, 1999). Estas diferencias pueden ocurrir en el CA de un solo proveedor, pero de diferentes lotes.

2.11 OBJETIVOS

Objetivo general:

Evaluar diferentes estrategias que contribuyan a aumentar la eficiencia del protocolo de micropropagación del cocotero a través de embriogénesis somática utilizando explantes de plúmula.

Objetivos particulares:

1. Caracterizar morfológica e histológicamente el proceso de la embriogénesis somática inducida a partir de explantes de plúmula de cocotero (*Cocos nucifera* L.).
2. Estudiar el efecto de las citocininas en la formación de callo y callo embriogénico.
3. Evaluar el efecto de anticitocininas en la formación de callo, callo embriogénico y embriones somáticos.
4. Evaluar el efecto de los brasinoesteroides en la formación de callo, callo embriogénico y embriones somáticos.
5. Evaluar el efecto de la subdivisión de callos embriogénicos en la formación de embriones somáticos.
6. Evaluar el efecto del ácido abscísico en combinación con polietilenglicol en la formación de embriones somáticos a partir de callos embriogénicos.

2.12 HIPOTESIS

Hipótesis 1: Se ha reportado que las citocininas endógenas en genotipos de *Dactylis glomerata* L. afectan su capacidad embriogénica, además, el uso de citocininas exógenas en el medio de cultivo interfiere negativamente con el proceso de embriogénesis somática. La capacidad embriogénica en esta especie se recupera cuando se usa una anticitocinina en el medio de cultivo. En el caso de cocotero es conocido que los callos no embriogénicos originados a partir de explantes de plúmula presentan mayores contenidos de citocininas endógenas que los callos embriogénicos, por lo que posiblemente las citocininas aromáticas ó isoprénicas afectarían negativamente la embriogénesis somática en cocotero y en contraste el uso de las anticitocininas, podría promover la embriogénesis somática en esta especie como ocurre en *Dactylis glomerata* L.

Hipótesis 2: Existen evidencias de que los brasinoesteroides juegan un papel importante en la regulación y señalización dentro de la división y expansión celular durante el proceso embriogénico y post-embriogénico en plantas, promoviendo la diferenciación, y su respuesta es favorecida en presencia de auxinas. En el caso particular de explantes de plúmula de cocotero, la embriogénesis somática es inducida especialmente por la auxina ácido 2,4-diclorofenoxiacético, por lo que el uso de

compuestos que actúen de forma sinergista con esta fitohormona y que promuevan la diferenciación como los brasinoesteroides podrían favorecer el proceso embriogénico.

Hipótesis 3: Se conoce que un embrión somático subdividido y cultivado en condiciones *in vitro*, puede permitir la formación de nuevos embriones somáticos. En el caso de cocotero, la formación de embriones somáticos (ES) a partir de los callos embriogénicos generalmente ocurre cuando este callo es cultivado íntegramente sin sufrir fragmentación o subdivisión, por lo que se considera que si los callos embriogénicos son subdivididos y cultivados en etapa II quizás se permitiría incrementar el número de embriones somáticos por callo embriogénico.

Hipótesis 4: La formación de embriones somáticos en explantes de embriones cigóticos inmaduros de cocotero y otras especies ha sido promovida por el uso de ácido abscísico en combinación con el polietilenglicol por lo que el uso de estos dos compuestos en explantes de plúmula de cocotero podrían incrementar la formación de embriones somáticos y la capacidad de conversión a plantas completas.

2.13 BIBLIOGRAFIA

- Adam, G. and V. Marquardt. 1986. Brassinosteroids. *Phytochemistry*, 8: 1787-1786.
- Ambrozic-Dolinsek, J., M. Camloh, B. Bohanec and J. Zel. 2001. Apospory in leaf culture of staghorn fern (*Platycoerium bifurcatum*). *Plant Cell Reports* (on line), file://A:\Plant%20Cell%20Rep%20-%20Full%20Text%20DOI%2010_1007-s00299-001-...
- Ammirato, P.V. 1983. Embryogenesis. In: D. A. Evans, W. R. Sharp, P. V. Ammirato and Y. Yamada (Eds.) *Handbook of Plant Cell Culture, Techniques for propagation and breeding*, Vol. 1. McMillan Publishers Company, U.S.A. pp. 82-123.
- Apavatjirut, P. and J. Blake 1977. Tissue culture of stem explants of coconut (*Cocos nucifera* L.). *Oléagineux*, 32: 267-271.
- Appelbaum, A. and S. P. Burg. 1972. Effects of ethylene on cell division and deoxyribonucleic acid synthesis in *Pisum sativum*. *Plant Physiology*, 50: 117-124.
- Bishop, J. G. and T. Yokota. 2001. Plants steroid hormones, brassinosteroids: current highlights of molecular aspects on their synthesis/metabolism, transport, perception and response. *Plant and Cell Physiology*, 42: 114-120.
- Blaydes, D. F. 1966. Interaction of kinetin and various inhibitors in the growth of soybean tissue. *Physiologia Plantarum*, 19: 748-753.
- Boucheron, E. A. Guivar'ch, A. Azmi, W. Dewitte, H. Van Onckelen and D. Chriqui. 2002. Competency of *Nicotiana tabacum* L. stem tissues to dedifferentiate is associated with differential levels of cell cycle gene expression and endogenous cytokinins. *Planta*, 215: 267-278.
- Bornman, CH. 1993. Maturation of somatic embryos. In: Redenbaugh K. (Ed.) *Synseeds: application of synthetic seeds to crop improvement*. CRC. Boca Raton, Fl. pp 105-113.
- Branton, R. L., and J. Blake. 1983. Development of organized structures in callus derived from explants of *Cocos nucifera* L. *Annals of Botany*, 52: 673-678.
- Branton, R. L. and J. Blake. 1986. *In vitro* plantlet development from calloid derived from immature inflorescence of *Cocos nucifera* L. In : Somers D.A., Gengenbach B.G, Biesboer D.O., Hacket W. P. and Green C.E. (Eds) *Abstract of VI International Congress of Plant Tissue and Cell Culture*.
- Braul, M., R. Maldiney and E. Miginiac. 1997. Cytokinin-binding proteins. *Physiologia Plantarum*, 100: 520-527.

- Browning, G. Ognjanov V., A. J. Passey and D. J. James. 1987. Multiple Shoot and root regeneration from pear embryo cotyledon explants *in vitro*. *Journal of Horticultural Science*, 62: 305-311.
- Buffar–Morel, J., J. L. Verdeil and C. Pannetier. 1992. Embryogenèse somatique du cocotier (*Cocos nucifera* L.) á partir d'explants foliaires: étude histologique. *Canadian Journal of Botany*, 70: 735–741.
- Burns, A. J. and Y. H. Wetzstein. 1997. Development and characterization of embryogenic suspension cultures of pecan. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 48: 93-102.
- Carrillo, R. H. y J. Piña Razo. 1990. Situación actual del amarillamiento letal en el sureste de México. In: Manuel L. Robert y Daniel Zizumbo V. (Ed.) *La problemática del amarillamiento letal del cocotero en México*. CICY. Primera edición, pp 69-93.
- Cabasson, C., D. Alvard, D. Dambier, P. Ollitrault and C. Teisson. 1997. Improvement of Citrus somatic embryo development by temporary immersion. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 50: 33-37.
- Ceccarelli, N., A. Mondin, M. Cyradi, R. Lorenzi and F. Lo Schiavo. 2000. Auxin metabolism and transport in an embryogenic cell line of *Daucus carota* L. *Journal of Plant Physiology*, 157: 17-23.
- Chan, L. J., L. Saénz, C. Talavera, R. Hornung, M. Robert and C. Oropeza. 1998. Regeneration of coconut (*Cocos nucifera* L.) from plumule explants through somatic embryogenesis. *Plant Cell Reports*, 17:515-521.
- Christou, P and K. A. Barton. 1989. Cytokinin antagonist activity of substituted phenethylamines in plant cell culture. *Plant Physiology*, 89: 564-568.
- Clouse, S. D. 1996. Molecular genetic studies confirm the role of brassinosteroids in plant growth and development. *Plant Journal*, 10: 1-8.
- Clouse, S. D. and J. M. Sasse. 1998. Brassinosteroids: Essential regulators of plant growth and development. *Annual Review of Plant Physiology Plant Molecular Biology*, 49: 427-451.
- Davies, J. P. 1995. Introduction. The plant Hormones: Their nature, occurrence and functions. In: Peter J. Davis (Ed.) *Plant Hormones. Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*. Kluwer Academic Publishers pp. 1-12.
- Denchev, P. D. and A.I. Atanassov. 1995. Micropropagation through somatic embryos. In: Bhojwani S.S. (Ed.) *Plant tissue culture: Applications and limitations*. Department of Botany, University of Delhi. Delhi 110007, India. Elsevier, pp. 193-206.

- De Veylder, L., J. de A. Engler, S. Burssens, A. Maneveski, B. Lescure, M. Van Montague, G. Engler and D. Inzé. 1999. A new D-type cyclin of *Arabidopsis thaliana* expressed during lateral root primordia formation. *Planta*, 208: 453-462.
- Dohare, S.R. M. Shafi and U. S. Kaiker. 1991. Micropropagation in rose. *Acta Horticulturae*, 289: 107-108.
- Domínguez, E., A. R. Gonzáles Castillo, J. I. López y P. Ruíz., 1999. El cocotero *Cocos nucifera* L. Manual para la producción en México. INIFAP.CIRGOC. Campo Experimental Huimanguillo. Libro Técnico Núm. 6. Tabasco, México. 132 p.
- Dunstan, I., D. Jin-Zhuo D., D. J. Carrier, and S. R. Abrams. 1998. Events following ABA treatment of spruce somatic embryos. *In vitro Cellular Developmental Biology-Plant*, 34: 159-168.
- Ebert, A. and H.F. Taylor. 1990. Assessment of the changes of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid concentrations in plant tissue culture media in the presence of activated charcoal. 1990. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 20: 165-172.
- Eeuwens, C. J. and Blake J. 1977. Culture of coconuts and date palm tissue with a view to vegetative propagation. *Acta Horticulturae*, 78: 277-288.
- Eeuwens, C. J. 1976. Mineral requirements for growth and callus initiation of tissue explants excised from mature coconut palms (*Cocos nucifera* L.) 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* L.) and date (*Phoenix dactylifera*) palms cultured *in vitro*. *Physiologia Plantarum*, 42: 173-178.
- Esau, K. 1959. Meristemos y diferenciación celular. In: Katherine Esau (Ed.) *Anatomía vegetal*. Traducción de la primera edición, pp. 88-106.
- Esau, K. 1977. Embryo and Seedling. In: Katherine Esau (Ed.) *Anatomy of seed plants*. John Wiley & Sons, Inc. pp.475-500.
- Escalona, M., C. J. Lorenzo, B. González, M. Daquinta, C. J. González, Y. Desjardins and C. G. Borroto. 1999. Pineapple (*Ananas comosus* L. Merr) micropropagation in temporary immersion systems. *Plant Cell Reports*, 18: 743-748.
- Farmer, E. E. and C. A. Ryan. 1990. Interplant communication: airborne methyl jasmonate induces synthesis of proteinase inhibitors in plant leaves. *Proceedings of the National Academy Sciences*, 87: 7713-7716.
- FAOSTAT AGRICULTURE DATA. 2000. <http://apps.fao.org/cgi-bin/nphdb.pl? Subset=agriculture>.

- Fernando, S. C. and C. K. A. Gamage. 2000. Abscisic acid induced somatic embryogenesis in immature embryo explants of (*Cocos nucifera* L.). *Plant Science*, 2000: 193-198.
- Fischer, C. V. Speth, S. Fleigh-Eberenz, and G. Neuhaus. 1997. Induction of zygotic polyembryos in wheat: Influence of auxin polar transport. *The Plant Cell*, 9: 1767-1780.
- Fischer-Iglesias, C, B. Sundberg, G. Neuhaus and A. Munte Jones. 2001. Auxin distribution and transport during embryonic pattern formation in wheat. *The Plant Journal*, 26: 115-129.
- Find, I. J. 1997. Changes in endogenous ABA levels in developing somatic embryos of Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst) in relation to maturation medium, desiccation and germination. *Plant Science*, 128: 75-83.
- Francis, D. and A. D. Sorrell. 2001. The interference between the cell cycle and plant growth regulators: a mini review. *Plant Growth Regulation*, 33: 1-12.
- Franck-Duchenne, M. Y. S Wang, T. Ben, and R. N. Beachy. 1998. *In vitro* stem elongation of sweet pepper in media containing 24-epi-brasinolide. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 53: 79-84.
- Gaspar, T., C. Kevers., C. Penel., G. H. Reid M. D. and A. T. Thorpe 1996. Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture. *In vitro Cellular Developmental Biology-Plant*, 32: 272-289.
- George, F.E. 1993a. Plant tissue culture techniques. Edwin George F. (Ed) *Plant Propagation by Tissue Culture (part 1) The Technology*. Exegetics Ltd, Edington, Wilts. BA13 4 QG, England. pp. 3-36.
- George, F.E. 1993b. Plant growth regulators. Edwin George F. (Ed) *Plant Propagation by Tissue Culture (part 1) The Technology*. Exegetics Ltd, Edington, Wilts. BA13 4 QG, England. pp. 420-479.
- Guilfoyle, T., G. Hagen, T. Ulmasov, and J. Murfett. How does auxin turn on genes?. 1998. *Plant Physiology*, 118: 341-347.
- Gupta, P. K., S.V. Kendurkar, V. M. Kukarni, M.V. Shirgurkar, and A. F. Mascarenhas. 1984. Somatic embryogenesis and plants from zygotic embryos of coconut (*Cocos nucifera* L) *in vitro*. *Plant Cell Reports*, 3: 322-325.
- Haccius, B. Mainz y V. J. Philip, Kerala. 1979. Embryo development in *Cocos nucifera* L.: A critical contribution to a general understanding of palm embryogenesis. *Plant Systematics and Evolution*, 132: 91-106.
- Hare, P.D. and J. Staden Van 1997. The molecular basis of cytokinin action. *Plant Growth Regulation*, 23:41-78.

- Harrison, N.A., M. Narváez, H. Almeida, I. Cordova, M. L. Carpio and C. Oropeza. 2002. First report of group 16SrV phytoplasmas infecting coconut palms with leaf yellowing symptoms on the pacific coast of Mexico. Plant Pathology, On line: <http://www.bspp.org.uk/ndr/>
- Hemerly, A.S., P. Ferreira, J. de A. Engler, M. Van Montagu, G. Engler and D. Inzé. 1993. *cdc2a* expression in *Arabidopsis* is linked with competence for cell division. The Plant Cell, 5: 1711-1723.
- Hooley, R. 1996. Plant steroid hormones emerge from the dark. Trends Genet. 12: 281-283.
- Hornung, R. 1995. Micropropagation of *Cocos nucifera* L. from plumular tissue excised from mature zygotic embryos. Plantations, Recherche, Development, 2: 38-41.
- Hoche, V., J.-L. Verdeil, F. Grondemange, Ch. Huet, R. Bordeix, Y. N'Cho, A. Sangare, R. Hornung, J. Hans-Jörg, E. Rillo, C. Oropeza and S. Hamon 1998. Collaboration internationale pour la maîtrise de la multiplication végétative *in vitro* du cocotier (*Cocos nucifera* L.). Cahiers Agricultures, 7: 499-505.
- Hu, Y. and J. Li. 2000. Promotive effect of brassinosteroids on cell division involves a distinct CycD3-induction pathway in *Arabidopsis*. The Plant Journal, 5: 693-701.
- INIFAP. 1997. Datos básicos de los cultivos más importantes en Veracruz y Tabasco. Documento. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Centro de Investigación Regional del Golfo Centro, 73 p.
- Iwamura, H. 1990. Structure-activity relationship studies and development of s-Triazine and carbamate anticytokinins. In: R. P. Pharis S.B. Rood (Eds.) Plant Growth Substances, Springer-Verlang, pp. 179-187.
- Iwasaki, T. and H. Shibaoka. 1991. Brassinosteroids act as regulators of tracheary-element differentiation in isolated *Zinnia* Mesophyll. Cell, 32: 1007-1014.
- Jang, J.-C., S. Fujioka, Tasaka, M, H. Seto, S. Takatsuto, A. Ishii, M. Aida, S. Yoshida, and J. Sheen. 2000. A critical role of sterols in embryogenic patterning and meristem programming revealed by the *fackel* mutants *Arabidopsis thaliana*. Genes and Development, 14: 1485-1497.
- Jona, R. and U. G. Menini. 1987. Specific methods and plant requirements. In: R. Jona and U. G. Menini (Eds.) Tissue culture of selected tropical fruit plants, FAO, pp. 93-101.
- Katsumi, M. 1985. Interaction of a brassinosteroid with AIA and GA₃ in the elongation of cucumbers hypocotyl sections. Plant Cell Physiology, 26: 615-625.

- Kawahara, R., and A. Komamine. 1995. Molecular basis of somatic embryogenesis. In: YPS Bajaj (Ed.) Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol. 30, Somatic embryogenesis and synthetic seed I. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, Alemania pp. 30-40.
- Krikorian, D. A. 1995. Hormones in tissue culture and micropropagation. In: Peter J. Davis (Ed.) Plant Hormones. Physiology, Biochemistry and Molecular Biology. Kluwer Academic Publishers pp. 774-796.
- Krizeck, D. T. 1985. Methods of inducing water stress in plants. HortScience, 20: 1028-1038.
- Karunaratne, S. and K. Periyapperuma. 1989. Culture of immature embryos of coconut, *Cocos nucifera* L: callus proliferation and somatic embryogenesis. Plant Science, 62: 247-253.
- Libbenga, R. K., and A. M. Mennes. 1995. Hormone binding and signal transduction. In: Peter J. Davies (Ed). Plant Hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology, pp 272-297.
- Litz, R.E. and R.L. Jarret. 1991. Regeneración de plantas en el cultivo de tejidos: embriogénesis somática y organogénesis. In: William M. Roca y Luis A. Mroginsk (Eds.) Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones. Edit. Técnicos, CIAT; pp.144-163.
- Liu C-M, Xu Z-X, and Chua N-H. 1993. Auxin polar transport is essential for the establishment of bilateral symmetry during early plant embryogenesis. Plant Cell, 5: 621-630.
- Lorbiecke, R. and M. Sauter. 1999. Adventitious root growth and cell-cycle induction in deepwater rice. Plant Physiology, 119: 21-31.
- Martinez, C. M., J. Jan-Elo, M. A. Lawton, C. J. Lamb and P. W. Doerner. 1992. Spatial pattern of *cdc2* expression in relation to meristem activity and cell proliferation during plant development. Proceedings of the National Academy Sciences, 89: 7360-7364.
- Marrioti, D. and S. Arcioni. 1983. *Coronilla varia* L. (Crown vetch): plant regeneration through somatic embryogenesis. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2: 103-110.
- McKersie, B.D., S. S. Van Andcker and F-M. Lai. 1995. Role of maturation and desiccation of somatic embryos in the production of dry artificial seed. In : Y.P.S. Bajaj (Ed.) Biotechnology in Agriculture and Forestry Vol. 30, Somatic Embryogenesis and Synthetic Seed I. Springer-verlag, pp. 152-167.

- McKersie, B. D., T. Senaratna, S.R. Bowley, D.C.W. Brown, J. E. Krochko and J. D. Bewley. 1989. Application of artificial seed technology in the production of hybrid alfalfa (*Medicago sativa* L.). *In vitro Cellular Developmental Biology-Plant* 25: 1183-1188.
- Meijer, M. and J. A. H. Murrurray. 2000. The role and regulation of D-type cyclins in the plant cell cycle. *Plant Molecular Biology*, 43: 621-633.
- Meng-Jin, C. and C. Wei-Chin. 1987. Somatic embryogenesis and plant regeneration in callus culture derived from immature seeds and mature zygotic embryos *Dyosma pleiantha* (Hance) Woodson. *Plant Cell Reports*, 6: 484-485.
- Merkle, S.A., W. A. Parrot and E.G. Williams. 1990. Application of somatic embryogenesis and embryo cloning. In: Bhojwani S.S. (Ed.) *Plant tissue culture: Applications and limitations*. Department of Botany, University of Delhi. Delhi 110007, India. Elsevier, pp. 67-101.
- Mensuali-Sodi, A., M. Panizza, G. Serra and F. Tognoni. 1993. Involvement of activated charcoal in the modulation of abiotic and biotic ethylene levels in tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 54: 24-34.
- Mironov, V., L. De Veylder, M. Van Montagu and D. Inzé. 1999. Cyclin-dependent kinases and cell division in plants- The nexus. *Plant Cell*, 11: 509-521.
- Mitsui, S. and M. Sugiura. 1993. Purification and properties of cytokinin-binding proteins from tobacco leaves. *Plant Cell Physiology*, 34: 543-547.
- Murashige, T. 1974. Plant propagation through tissue culture. *Annual Review of Plant Physiology*, 25: 135-166.
- Napier, R. M and M.A.Venis. 1990. Receptor for plant growth regulators. *Recent advances. Journal of Plant Growth Regulation*, 9:113-126.
- Napier, R. M and M.A.Venis. 1995. Auxin action and auxin-binding proteins. *New Phytologist*, 129: 167-201.
- Newton, R. J., J. D. Puryear, S. Bhaskaran and R. H. Smith. 1990. Polyethylene glycol content of osmotically stressed callus cultures. *Journal of Plant Physiology*, 135: 646-652.
- Nougaréde, A., C.E. Silveira and P. Rondet. 1996. In nature dormant buds and *in vitro* dormat-like buds of *Fraxinus excelsior* L. *Protoplasma*, 190: 16-24.
- Núñez, V.M. 1996. Los brasinoesteroides y su actividad biológica. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA). La Habana, Cuba. 30 p.

- O'Donnell, P. J., M. R. Truesdale, C. M. Calvert, A. Dorans, M. R. Roberts, and D. J. Bowles. 1998. A novel tomato gene that rapidly responds to wound- and pathogen-related signals. *Plant Journal*, 14: 137-142.
- Oh, M. H. and S.D. Clouse. 1998. Brassinolide affects the rate of cell division in isolated leaf protoplast of *Petunia Hibrida*. *Plant Cell Reports*, 17: 921-924.
- Oropeza, C. and H. F. Taylor. 1994. Uptake of 2,4-D in coconut (*Cocos nucifera* L.) explants. In: Lumsden P.J., Nicholas P.R. and Davies W. J. (Eds). *Physiology, Growth and development of plants in culture*. The Netherlands: Kluwer Academics Publisher, 1994: 284-288.
- Oropeza, C. and J. L. Chan. 1995. Protocol for the formation of somatic embryos from coconut plumule explants. In: J.L. Verdeil (Ed.) *Compendium of protocols*. STD3 (ERTBTS3*CT940298). ORSTOM-CIRAD, Montpellier, Francia.
- Oropeza, C., R. Cardeña, D. Zizumbo, J.L. Chan y G. R. Ashburner. 1996. Biotecnología aplicada en la producción de plantas de cocotero. Novena reunión científica-tecnológica. Villahermosa, Tabasco, 5 y 6 de diciembre, pp. 163-168.
- Oropeza, C. 1998. Amarillamiento letal del cocotero. *Investigación y Ciencia*, 256: 30-33.
- Pannatier, C. and J. Buffard-Morel. 1982. First results of somatic embryo production from leaf tissue of coconut, *Cocos nucifera* L. *Oléagineux*, 37: 349-354.
- Peña-Cortes, H., J. Sanchez-Serrano, R. Mertens, L. Willmitzer and S. Prats. 1989. Abscisic acid is involved in the wound-induced expresión of the proteinase inhibitor II gene in potato and tomato. *Proceedings of the National Academy Sciences*, 86: 9851-9855.
- Pierik, R. L. M., P. Van Leeuwen, and G. C. C. M. Rigter. 1979. Regeneration of leaf explants of *Anthurium andreanum* Lind. *In vitro* Netherlands Journal of Agricultural Science, 27: 221-226.
- Pierik, R. L. M. 1987. Preparation and composition of nutrient media. In: *In vitro* culture of higher plants. Pierik R.L.M. (Ed) Martinus Nijhoff Publishers, pp 45-82.
- Piña Razo J. 1998. Programa Nacional de investigación del cocotero. Memoria de la 1ra. Reunión Nacional de Palma de Coco, Acapulco, Guerrero; México, pp 5-17.
- Ponsamuel, J., D. V. Huhman, B. G. Cassidy and D. Post-Beittenmiller. 1998. *In vitro* regeneration via caulogenesis and brassin-induced shoot conversion of dormant buds from plumular explants of peanut (*Arachys hypogaea* L.) C.V. Okrun. *Plant Cell Reports*, 17: 373-378.

- Ramírez, J. G. y R. J. Piña. 1998. Areas con potencial para el cultivo de cocotero *Cocos nucifera* L. bajo condiciones de temporal en la Republica Mexicana. Estudio de gran visión. INIFAP, CIR-Sureste, 42 p.
- Redig, P., O. Shaul, D. Inzé, M. Van Montague and H. Van Onckelen 1996. Levels of endogenous cytokinins, indole 3-acetic acid and abscisic acid during the cell cycle of synchronized tobacco BY-2 cells. *FEBS Letters*, 391: 175-180.
- Rinaldi, A. C. and O. Comandini. 1999. Cytokinin oxidase: new insight into enzyme properties. *Trends in Plant Science*, 4: 127-128.
- Ross, W.C. 1992. Hormonas y reguladores de crecimiento: auxinas y giberelinas. In: Frank B. Salisbury y Cleon W. Ross (Eds.) *Fisiología Vegetal*. Grupo Editorial Iberoamérica S.A de C.V. pp. 395-421.
- Rubery, P.H. 1978. Hydrogen ion-dependence of carrier-mediated auxin uptake by suspension-cultured crown gall cells. *Planta*, 142: 203-208.
- Saéñz Carbonell L. A. 1999. Desarrollo de protocolos para la regeneración de *Cocos nucifera* L. a través de embriogénesis somática. Tesis de doctorado. Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. 123 p.
- Salisbury, B. F. 1992. Crecimiento y Desarrollo. In: F. B. Salisbury y C. W. Ross (Eds.) *Fisiología Vegetal*. Grupo editorial Iberoamérica S.A de C.V. pp. 363-393.
- Sauter, M., S. L. Mekhedov and H. Kende 1995. Giberellin promotes histone H1 kinase activity and the expression of *cdc2* and *cyclin* genes during the induction of rapid growth in deep-water rice internodes. *The Plant Journal*, 7: 623-632.
- Samosir, Y. M. S., I. D. Godwin and S. W. Adkins. 1999. The use of osmotically active agents and abscisic acid can optimise the maturation of coconut (*Cocos nucifera* L.) somatic embryos. In: Oropeza C., Verdeil J.L, Ashburner, G.R., Cardeña R. and Santamaría J.M. (Eds.) *Current plant science and biotechnology in agriculture*. *Current Advances in Coconut Biotechnology* pp. 341-354.
- Saxena, S. and V. Dhawan 1999. Regeneration and large-scale propagation of bamboo (*Dendrocalamus strictus* Nees) through somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 18: 438-443.
- Sasse, M. J. 1990. Brassinolide-induced elongation and auxin. *Physiologia Plantarum*, 80: 401-408.
- Sathiyamoorthy and S. Nakamura. 1990. *In vitro* root induction by 24-epibrassinolide on hypocotyl segments of soybean (*Glycine max* (L.) Merr.). *Plant Growth Regulation*, 9: 73-76.

- Sergiev, G. I., S. V. Alexieva and N. E. Karanov. 1995. Cytokinin and anticytokinin effects on growth and free polyamine content in etiolated and green radish cotyledons. *Journal of Plant Physiology*, 145: 266-270.
- Skoog, F. and Y. R. Schmitz, 1973. Cytokinin antagonists: Synthesis and physiological effects of 7-substituted 3-methylpyrazolo [4,3-*d*]-pyrimidines. *Phytochemistry*, 12: 25-37.
- Skoog, F. and C. O. Miller. 1957. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultured *in vitro*. *Symposium Society Experimental Biology*, 11: 118-131.
- Smith, D. L. and A. D. Krikorian. 1989. Release of somatic embryogenic potential from excised zygotic embryos of carrot and maintenance of polyembryonic cultures in hormone-free medium. *Plant Science* 58: 1832-1843.
- Somleva, M.M., V. Kapchina, V. Alexieva and E. Golovinsky. 1995. Anticytokinin effects on *in vitro* response of embryogenic and nonembryogenic genotypes of *Dactylis glomerata* L. *Plant Growth Regulation*, 16: 109-112.
- Somleva, M., V. Kapchina-Toteva, V. Alexieva, I. Sergiev and E. Karanov. 2000. Novel Physiological properties of two cytokinin antagonists. *Journal of Plant Physiology*, 156: 623-627.
- Stals, H. and D. Inzé. 2001. When plants cells decide to divide. *Trends in Plant Science*, 6: 359-364.
- Takatsuto, S. 1994. Brassinosteroids: distribution in plants, bioassays and microanalysis by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography*, 658: 3-5.
- Teisson, C. and F. X. Côte. Micropropagation of *Musa* Species (Bananas). 1997. In: YPS Bajaj (Ed.) *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, Vol. 39. High-Tech and Micropropagation V. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, Alemania pp. 103-26.
- Tisserat, B., E. B. Esan and T. Murashige. 1979. Somatic embryogenesis in angiosperms. In: Janick J. (Ed.) *Horticultural Reviews*. Vol. I. Avi Publishing Company, Connecticut, USA. pp. 1-77.
- Toonen, M. A. J. and S.C. de Vries. 1995. Initiation of somatic embryos from single cells. In: Wang T.L. and Cuming A. (Eds.) *Embryogenesis*. Bios Scientific Publications pp. 173-190.
- Veisseire, P., L. Linossier and A. Coudret. 1994. Effect of abscisic acid and cytokinins on the development of somatic embryos in *Hevea brasiliensis*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 39: 219-223.

- Verdeil, J.L., C. Huet, F. Grosdemanges, A. Rival and J. Buffard-Morel. 1992. Coconut (*Cocos nucifera* L.) somatic embryogenesis: Obtention of several clone ramets. *Oléagineux*, 47: 465 – 469.
- Verdeil, J-L., C. Huet, F. Grosdemange, and J. Buffar – Morel. 1994. Plan regeneration from cultured immature inflorescence of coconut (*Cocos nucifera* L.): evidence for somatic embryogenesis. *Plant Cell Reports*, 3. 218 – 221.
- Verdeil, J-L., and J. Buffar – Morel. 1995. Somatic embryogenesis in coconut (*Cocos nucifera* L.): In: YPS Bajaj (Ed) *Biotechnology in agriculture and forestry*, Vol. 30, Somatic embryogenesis and synthetic seed I. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, Alemania pp. 299-317.
- Verdeil, J-L. 1998. Studies of growth regulators adsorption by activated charcoal. In: J-L Verdeil (Ed). *Reporte Final, 1995-1998: STD (ERBTS3* CT940298) ORTOM-CIRAD*, Montpellier, Francia. Pp. 14-15.
- Villalobos, A. V. M. and A. T. Thorpe. 1991. Micropropagación: conceptos, metodología y resultados. In: William M. Roca y Luis A. Mroginsk (Eds.) *Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones*. Edit. Técnicos, CIAT; pp.127-172.
- Wang, H., Q. Qi, P. Schorr, A. J. Cutler, W. L. Crosby and L. C. Fowke. 1998. ICKI, a cyclin-dependent protein kinase inhibitor from *Arabidopsis thaliana* interacts with both Cdc2a and CycD3 and its expression is induced by abscisic acid. *Plant Journal*, 15: 501-510.
- Wenck, R. A., B. V. Coger, R. N. Trigiano, and C. E. Sams. 1988. Inhibition of somatic embryogenesis in orchardgrass by endogenous cytokinins. *Plant Physiology*, 88: 990-992.
- Wheterell, D. F. 1984. Enhanced adventive embryogenesis resulting from plasmolysis of culture wild carrot cells. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 3: 221-227.
- Yamamoto, R., T. Demura and H. Fukuda. 1997. Brassinosteroids induce entry into the final stage of tracheary element differentiation in culture *Zinnia* cells. *Plant Cell Physiology*, 38: 980-983.
- Yokota, T. 1997. The structure, biosynthesis, and function of brassinosteroids. *Trends Plant Science*, 2: 137-143.
- Yoop, J.H. N. B. Mandava and J. M. Sasse. 1981. Brassinolide, a growth-promoting steroidal lactone I. Activity in selected auxin bioassays. *Physiologia Plantarum*, 53: 445-452.
- Zamarripa, C. A. 1994. Optimización de la embriogénesis somática de café arabusta (*Coffea canephora* P. x *Coffea arabica* L.) a partir de una suspensión celular. *Agricultura Técnica en México*, 20: 27- 41.

- Zhou, L., H. Min, G. Dong-Ping, Y. Yong-Hua, C. Xiao-Ning, Q. Pei and S. Jian-Ming. 2003. Effect of brassinolide on callus growth and regeneration in *Spartina patens* (Poaceae). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 73: 87-89.
- Zimmerman, L. J. 1993. Somatic embryogenesis: A model for early development in higher plants. *Plant Cell*, 5: 1411-1423.
- Zizumbo, D., M. Fernandez, N. Torres and R. Cardeña. 1999. Lethal yellowing resistance in coconut germplasm from México. In: Oropeza C., Verdeil J.L, Ashburner, G.R., Cardeña R. and Santamaría J.M. (Eds.) *Current plant science and biotechnology in agriculture. Current Advances in Coconut Biotechnology*, pp. 131-144.
- Zurek, M. Daniel, D. L.Rayle, T. C. Mc Morris, and S. D. Clouse. 1994. Investigation of gene expression, growth kinetics, and wall extensibility during Brassinosteroid-regulated stem elongation plant. *Plant Physiology*, 104:505-513.

CAPITULO 3

MATERIALES Y METODOS

En este capítulo se describen materiales y métodos generales utilizados en esta tesis y en cada uno de los siguientes capítulos se describen los materiales y métodos específicos que no son mencionados aquí.

3.1 Material vegetal. Se utilizaron frutos de 12-14 meses después de la polinización. El material vegetal para los experimentos fue de Enano Malayo Verde (EMV) procedente de Dzidzantun, Yucatán; así como material de cocotero Enano Malayo Amarillo (EMA) procedente del campo experimental Chetumal (INIFAP).

La obtención de los embriones cigóticos se realizó con la ayuda de un sacabocado y estos fueron extraídos con un anillo del endospermo. Estos anillos con endospermo conteniendo el embrión cigótico fueron desinfectados en el lugar de colecta del material con etanol al 70% por 3 minutos, posteriormente se lavaron tres veces con agua destilada y después se sometieron a un tratamiento con hipoclorito de sodio comercial (NaClO) al 50% volumen/volumen (Cloralex® 6%) durante 20 minutos. Al finalizar este tratamiento fueron lavados tres veces con agua destilada y depositados en bolsas de plástico, estas se sellaron y se colocaron en una nevera conteniendo hielo para su transporte al laboratorio. Bajo condiciones asépticas los cilindros de endospermo que contenían a los embriones cigóticos fueron desinfectados con etanol 70% por 3 minutos y lavados 3 veces con agua destilada estéril, después se esterilizaron con una solución de 6% NaClO durante 20 minutos y fueron lavados 3 veces con agua destilada. Los embriones extraídos del anillo de endospermo se desinfectaron nuevamente con 0.6% de la solución de NaClO durante 10 minutos.

Las plúmulas fueron extraídas con la ayuda de pinzas, bisturí y de un microscopio estereoscópico. Después de la extracción, la plúmula se sembró directamente al medio de cultivo.

3.2 Condiciones de cultivo. En esta tesis se hace referencia a dos etapas, etapa I y etapa II. La etapa I comprende la fase de formación de callo o callo inicial y callo embriogénico. Durante esta fase se utilizó el medio I, el cual consistió del medio de cultivo Y3 de acuerdo a Eeuwens (1976), adicionado con sacarosa (5%), gelrite (0.3 %), carbón activado (0.25%) y 2, 4-D en 0.65 mM o 0.55 mM de acuerdo a Chan *et al.* (1998). Todos los explantes (plúmulas) fueron cultivados en frascos de vidrio con capacidad de 35 ml conteniendo 10 ml de medio de cultivo y se establecieron bajo condiciones I, que consistieron en un período de oscuridad de 3 meses a $27 \pm 2^{\circ}\text{C}$.

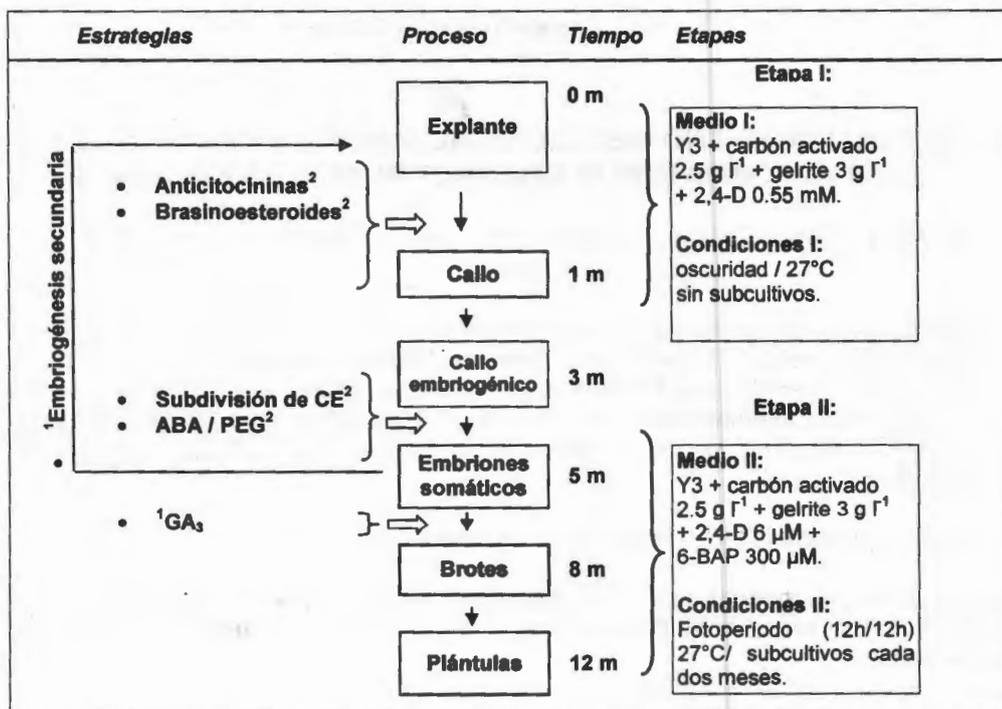
Al finalizar esta etapa los cultivos *in vitro* fueron transferidos a la etapa II, etapa en la cual se originan los embriones somáticos sobre los callos embriogénicos. Los cultivos se establecieron en un medio II, conteniendo sacarosa (5%), gelrite (0.3 %), carbón

activado (0.25%) y las fitohormonas bencil aminopurina (BAP) en 300 μM y 2,4-D 6 μM . Todos los callos embriogénicos fueron cultivados en frascos de alimento infantil Gerber® de vidrio de capacidad de 100 ml conteniendo 30 ml de medio de cultivo. Esta etapa se realizó en condiciones II, bajo fotoperíodo de 16 h de iluminación (45-60 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ppfd)/ 8 h de oscuridad a $27 \pm 2^{\circ}\text{C}$ y con subcultivos cada dos meses.

Todos los reactivos empleados en la formulación de los macronutrientes, micronutrientes y componentes orgánicos fueron adquiridos de Sigma®, así como las fitohormonas utilizadas (auxinas, citocininas, brasinoesteroides, anticitocininas y ácido abscísico), y el carbón activado lavado ácido (plant cell culture tested, No de catalogo C-6289).

En la presente tesis se evaluaron una serie de estrategias para incrementar la eficiencia de la formación de embriones somáticos, las cuales incluyeron el uso de diferentes compuestos que no habían sido ensayados previamente con explantes de plúmula: (a) fitohormonas sintéticas o naturales (ABA- conjuntamente con polietilenglicol - y brasinoesteroides); y (b) compuestos que afectan la acción de las fitohormonas (anticitocininas). También se ensayó la subdivisión de los callos (con capacidad embriogénica). Estas estrategias son presentadas en el esquema general en la Figura 3.1. En cada capítulo del estudio correspondiente se indican con mayor detalle los tratamientos utilizados.

3.3 ANALISIS ESTADISTICO. Los resultados se sometieron a análisis de varianza (ANAVA) y a la prueba de comparación de medias conocida como diferencia mínima significativa ($p < 0.05$), para lo cual se utilizó el paquete de diseños experimentales FEUANL, versión 2.5 (Olivares, 1994).



¹Estrategias en desarrollo por el grupo de cocotero.

²Estrategias realizadas dentro de esta Tesis.

Figura 3.1. Estrategias utilizadas para incrementar la eficiencia de regeneración de cocotero *in vitro* a través de embriogénesis somática.

CAPITULO 4

MORPHOLOGICAL AND HISTOLOGICAL CHANGES DURING SOMATIC EMBRYO FORMATION IN COCONUT PLUMULES EXPLANTS

Azpeitia A¹, Sáenz L², Chuc-Armendariz B², Chan J L², Verdiel J-L³, Hocher V⁴ and Oropeza C^{2*}

¹ Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), Campo Experimental Huimanguillo, Tabasco, México: aazp@cicy.mx. ² Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY), Mérida, México: cos@cicy.mx. ³ Centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement (CIRAD), Montpellier, France. ⁴ Institut de Recherche Pour le Développement (IRD), Montpellier, France.

*Author whom correspondence should be addressed.

Este capítulo se presenta escrito en Inglés porque será sometido a la revista *In vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*. Actualmente se encuentra en revisión por los autores.

4.1 INTRODUCTION

Somatic embryogenesis is the process of formation from somatic cells of structures that follow the histodifferentiation pattern which leads to a body pattern resembling that of zygotic embryos (Emons, 1994), and has been a useful approach for the large-scale micropropagation of plant species that have no natural vegetative propagation system such as coconut (Dublin *et al.*, 1991). Studies in coconut for this purpose have been reported for the last three decades, mostly using inflorescence explants (Eeuwens, 1976; Blake and Eeuwens, 1982; Branton and Blake, 1983; Verdiel *et al.*, 1994) however the results have showed low reproducibility and efficiency. Recent improvements in these aspects have been achieved using plumular explants (Hornung, 1995; Chan *et al.*, 1998; Sáenz *et al.*, 1999). However, a better understanding of the somatic embryogenesis process will be helpful to improve practical parameters such as efficiency. One approach to gain better insights throughout the process is the observation of the development of cells or group of cells by histological techniques, that have showed extremely useful in the understanding of embryogenesis of several plant species (see Yeung, 1999). In *Hevea brasiliensis* the adequate time of subculture was determined by histological procedures (Michaux-Ferriere and Philippe-Carron, 1989). In oil palm the formation of somatic embryos from perivascular cells of the leaf is well documented. Alemanno *et al.*, (1997) made a comparison between *Theobroma cacao* (L) zygotic embryos and somatic embryogenesis from floral buds, they found that

the somatic embryos lacked starch and protein reserves when compared to zygotic embryos.

In the case of coconut, Haccius and Philip (1979) used these techniques to describe the development of zygotic embryos. In *in vitro* culture of coconut many observations have been published on the histological changes occurring in explants and derived calli (Branton and Blake, 1983; Verdeil *et al.*, 1994; Hornung, 1995; Chan *et al.*, 1998). Recently Verdeil *et al.*, (2001) have reported that ultrastructural changes occurred during the process of formation of embryogenic cells in immature inflorescences of coconut cultured *in vitro*. They reported that first changes detected when the calli were into the embryogenic medium were the closure of the plasmadesmata and callose deposition. The embryogenic cells were characterised by special features: deep invagination of the nuclear envelope, proliferation of dictyosomes, with emission of golgi vesicle directly related to an increase in cell wall thickness.

In the case of plumule there are reports dealing with events occurring during the first days of culture (Hornung, 1995) and the formation of embryogenic calli (Chan *et al.*, 1998). However these types of studies have showed only isolated observations of the somatic embryogenesis process. Therefore this study presents a report on the morphological and histological events taking place in plumule explants cultured *in vitro*, covering in detail from the initial callus formation to the somatic embryo formation, including the formation of shoots.

4.2 MATERIALS AND METHODS

4.2.1 Plant material. Coconut fruits were harvested 12-14 months after pollination (except where otherwise indicated) from 15 year old Malayan Dwarf coconut palms at San Crisanto, Yucatán, México. The fruit were cut transversely with a machete revealing the embryos surrounded by solid endosperm. Embryos were excised from the open nuts using a cork borer (1.6 cm diameter) and placed in distilled water. Under aseptic conditions, the endosperm enclosing the embryo was washed in 70% ethanol for 3 min and rinsed three times with distilled sterile water, washed in a 6% NaClO solution for 20 min and rinsed three times with distilled sterile water. The embryos were excised from the endosperm and washed in a 0.6% NaClO solution for 10 min and rinsed with distilled sterile water three times. Embryos were 5-7 mm long and weighed approximately 100 mg each. The plumules were excised from these embryos under a stereoscopic microscope and placed directly in nutrient medium.

4.2.2 Culture media and conditions. The protocol used involved two culture stages, each with different media and conditions. All chemicals were supplied by Sigma® (USA). Each explant was cultured in 35 ml culture vessels containing 10 ml of Y3 medium (Eeuwens, 1976), added with gelrite (3 g l⁻¹) and charcoal (Acid washed, PCCT) (2.5 g l⁻¹). Growth regulator concentrations were 0.65 mM of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) for medium I (or as indicated in the text), and 1 µM

2,4-D and 300 μM benzylaminopurine (BAP) for medium II. The pH of the medium was adjusted to 5.75 before autoclaving for 20 min at 120°C. For stage I medium I was used and conditions I consisting of incubating the cultures in the dark for 3 months at 27 \pm 2°C without subculturing. For stage II medium II was used and conditions II consisting of illumination (45-60 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ photosynthetic photon flux density [PPFD]) at 27 \pm 2°C, and subculturing every two months.

4.2.3 Histology. The histological procedures were done according to Buffard-Morel *et al.*, (1992), with slight modifications. Tissue samples were fixed in paraformaldehyde 4% in phosphate buffer (pH 7.2) for 24 hours under negative pressure. Samples were dehydrated in a stepwise manner from 30%, to 100% aqueous ethanol. This was followed by impregnation with JB-4^R resin (Polyscience, USA). Three micrometer sections were prepared from the resin-impregnated tissues and stained with Periodic Acid-Schiff (PAS) reagent, combined with protein-specific naphthol blue-black (Fisher 1968).

4.3 RESULTS

4.3.1 Formation of initial callus. Coconut plumule explants (p) were approximately 1 mm diameter, showed a soft consistency, white colour (Figure 4.1A) and consisted of the stem meristem (sm), the leaf primordia plus cotyledonary tissue. There were generally two pairs of plumular leaves (pl), mostly formed by small meristematic cells (Figure 4.1B). At day 15 of culture the explant did not show any apparent growth, had a hard consistency, white colour and a smooth appearance (Figure 4.1C). However, a transverse section showed noticeable growth of the plumular leaves (particularly the external ones in most cases), apparently fusing with each other and forming a ring around the inner leaves and the stem meristem, which did not show any apparent growth (Figure 4.1D). After 15 days of culture the explants started growing steadily forming a callus that will be referred to as initial callus. At day 30 the size of the calli was approximately 2-3 mm diameter and their consistency was hard and the colour could be white or beige (Figure 4.1E). The stem meristem (sm) started to show some growth and the fused external plumular leaves continued growing (Figure 4.1F). At day 45 of culture the explants were still compact and of a white colour, but showed partial dedifferentiation with the development of callus structures with a translucent appearance, that we will refer to as "translucid structures" (ts) from here on (Figure 4.1G).

Initial callus transverse sections showed that the ts formed from the tissues of the fused external plumular leaves and presented peripheral layers of small cells with meristematic appearance (mz) (Figure 4.1 H). That is they had a visible nucleus of irregular shape, the nucleolus was not clearly defined and densely stained cytoplasm, indicating high metabolic activity (Figure 4.1 I). The apical meristem remained practically unchanged, containing a few meristematic cells.

4.3.2 Formation of embryogenic callus. At day 60 of culture the calli were approximately 4-5 mm diameter. The ts were better defined, showing an ear-like shape (Figure 4.1J). Transverse sections showed that the body of the callus was a compact structure formed by densely stained small meristematic cells (mc), located in the periphery of the callus, but below a layer of unstained cells forming the protodermis (pd), (Figure 4.1K). At this stage the meristematic cells started grouping into meristematic centers (mc), (Figure 4.1L). After day 60 these mc evolve into nodular structures (ns), (Figure 4.1M). At day 75 the nodular structures become pearly globular structures on the surface of ts of the calli (Figure 4.1N), from these structures somatic embryos eventually form and are referred to as globular embryogenic structures (GES) (Figure 1N).

By day 90 of culture the calli were approximately 5-7 mm diameter and the GES were larger (GES-L) with a compact consistency, a smooth appearance, and easily distinguishable from the rest of the callus. They were numerous covering most of surface of the callus that is not in contact with the medium gel (Figure 4.1O). Transverse sections showed that these structures consisted of meristematic cells surrounded by protodermis some GES seemed to fused with each other. Inner tissues of the callus consisted mostly of parenchyma cells and vascularized zones (VZ) (Figure 4.1P). The cells forming the GES had a nucleus of irregular shape, the nucleolus were scarcely visible and their cytoplasm densely stained (Figure 4.1Q). A schematic representation of the events that occur during the development of callus and embryogenic callus from plumule explants is depicted in Figure 4.2.

4.3.3 Formation and germination of somatic embryos. Once the GES were formed the calli were subcultivated in medium II under photoperiod conditions (45-60 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PPF). Before day 30 after subcultivation, formation of somatic embryos (SE) occurred on the GES, some forming clumps (Figure 4.3A). Early SE were observed as globular white translucent structures of 1-2 mm diameter, with a not yet well defined meristem and a few layers of meristematic cell (Figure 4.3B). Generally there were 3-6 globular somatic embryos per callus. After 30 days of subcultivation, SE differentiated further, forming a well defined meristematic zone (mz), and provascular bundles becoming visible, resembling those of the zygotic embryos (Figure 4.3C). Some of these SE contained starch reserves in their cortical parenchyma. At day 45 after subcultivation, it was possible to observe the presence of the germinative pore (gp) and the coleoptile (c) in the SE (Figure 4.3D). Transverse sections showed the stem meristem (sm) and the root meristem (rm) were beginning to define (Figure 4.3E). After day 45, SE differentiated into torpedo stage. They were 3-6 mm long, a coleoptile was present, (Figure 4.3F and G). By day 60 they had further developed into larger embryos with the appearance of the leaf primordia (Figure 4.3H and I).

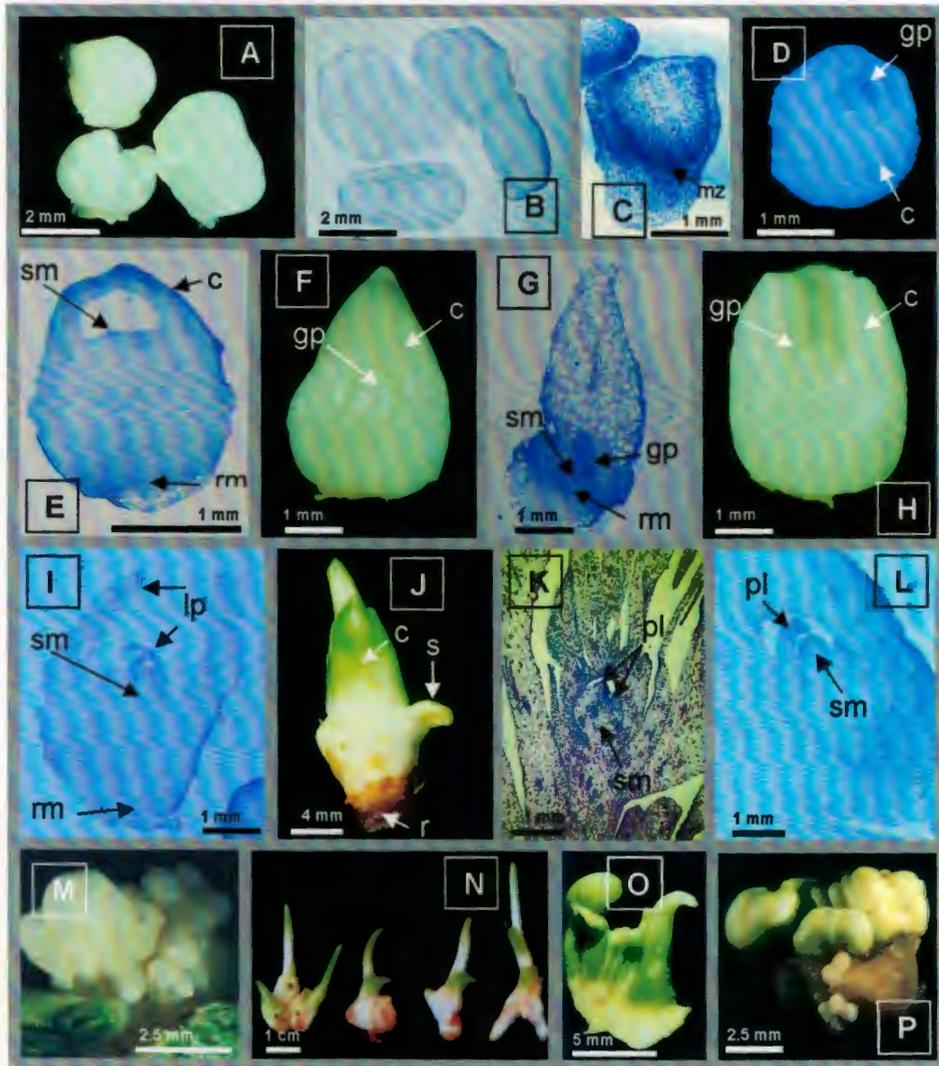


Figure 4.3. Formation and germination of somatic embryos from coconut plumule explants. (A) Somatic embryos (SE) developed from embryogenic callus. (B) Cross section of somatic embryos. (C) SE well differentiated, forming a well defined meristematic zone (mz), and provascular bundles becoming visible, resembling those of the zygotic embryos. (D) Somatic embryo showing the germinative pore (gp) and the coleoptile (c). (E) Transverse section of SE, sm (stem meristem), rm (root meristem). (F) SE differentiated into torpedo stage, c (coleoptile). (G) Transverse section of F. (H) Somatic embryo more developed. (I) Cross section of a well developed somatic embryo, lp (leaf primordium). (J) Somatic embryo germinated, s (scutellum). (K) Cross section of a somatic embryo germinated. (L) Magnification of the sm zone. (M) Clump of somatic embryos germinating. (N) Shoots from these clumps of somatic embryos. (O) Aberrant somatic embryos showing fused leaves and (P) haustorial-like tissue.

4.4 DISCUSSION

Somatic embryogenesis in coconut cultures utilising plumules as explants is relatively novel, hence scarce information has been reported on morphological and histological events occurring during the formation of somatic embryos. Therefore this study presents a detailed account on the morphological and histological changes that occur from initial calli induction to embryogenic calli development and embryo formation in plumule explants.

The origin of the formation of callus can be traced to changes of the plumular leaves, particularly the external ones. During the first 15 d of culture they grow, collide and their tissues fuse, becoming one single structure that surrounds the stem meristem and the other leaves. At this stage at the periphery of this fusing leaves, a meristematic zone (mz) develops, showing layers of small densely stained cells that apparently formed from provascular cells. As time elapses, this structure comprising the fused external leaves grows and develops into a callus at d 30-45 of culture. This growth is assured by the multiplication of the cells in the mz that progressively becomes more extensive during the following weeks.

The occurrence of a peripheral mz associated with callus growth has also been observed in explants of *C. nucifera* inflorescences (Verdeil *et al.*, 1994; Verdeil *et al.*, 2001), *Elaeis guineensis* zygotic embryos (Schwendiman *et al.*, 1990) and *Coffea canephora* leaves (Berthouly and Michaux-Ferriere, 1996). In these species callus formation from vascular bundle cells has also been reported (Schwendiman *et al.*, 1990; Verdeil *et al.*, 1994; Berthouly and Michaux-Ferriere, 1996). In plumular explants, callus growth derived mostly from the changes in the external leaves and only to a lesser extent from those in the other leaves. In the case of the stem meristem, practically no changes were observed.

The mz give rise to the formation of the meristematic centers (mc) by d 60-75, from which nodular or globular structures (GS) develop by d 75-90. Occurrence of these type of structures is well documented in *E. guineensis* (Schwendiman *et al.*, 1990), *Hevea brasiliensis* (Michaux-Ferriere and Carron, 1989) and inflorescence explants of *C. nucifera* (Verdeil and Buffard-Morel, 1995). The GS are isolated from each other and had a layer of protodermis around them. Due to increasing abundance, the GS coalesce into structures with elongated appearance. When observed in detail, the cells of the GS showed a nucleus with an irregular morphology. Verdeil *et al.*, (2001) reported that the nuclei of the embryogenic cells in coconut calli derived from inflorescence explants changed from a round shape to an irregular shape (with invaginations) when the calli were transferred to a medium with a higher concentration of 2,4-D. In our case the release of 2,4-D from the activated charcoal may have produce alteration in the 2,4-D level that could similarly affect the morphology of the nucleus from plumular cells.

The GS are proembryogenic since they already show the occurrence of proembryoids and eventually somatic embryos (SE) will form from them when the calli are transferred to medium II (containing a hundred fold lower 2,4-D concentration plus BAP) and photoperiod light conditions. As previously reported by Chan *et al.*, (1998), evidence in the present study supports a pluricellular origin for SE formation, whereas no unicellular embryo formation was observed, contrasting with previous reports providing evidence of this path for embryo formation in coconut calli obtained from inflorescence explants (Verdeil *et al.*, 1994; Verdeil and Buffard-Morel, 1995) and in plumule explants (Chan *et al.*, 1998), although occurring very scarcely, and this may explain the present failure to observe this path.

Regarding reserve accumulation by SE, they showed presence of starch grains in their cells but occurring very seldom. This limited starch accumulation may affect their germination capacity. For instance in the case of *Theobroma cacao*, Alemanno *et al.*, (1997), reported that SE were devoid of starch grains when obtained with a maturation medium containing maltose, but when this sugar was replaced by sucrose (at 234 mM) SE were capable of forming starch grains and showed higher germination, conversion and acclimatization rates than those obtained when using maltose. Also some embryos showed irregular development with aberrant structures such as fused embryos or embryos with fused leaves, both types generally without roots. Other embryos after germinating formed haustorial-like tissue. Germination in these aberrant embryos was not observed. Also some well formed SE did not germinate. These results stress the need to overcome these alterations. For instance, improved germination might be obtained by using the sucrose approach by Alemanno *et al.*, (1997). The media used in the present case already includes sucrose, but increase concentration could be tested. Alternatively ABA could be used since it is known to increase the production of storage reserves (Feirer *et al.*, 1989; Roberts *et al.*, 1990). This phytohormone has been used in coconut zygotic embryo explants added to the induction medium (Fernando and Gamage, 2000) or maturation medium (Samosir *et al.*, 1999) and was found in both cases to improve embryo formation and embryo conversion, however reserve substances were not analysed. The well formed SE were capable of germination and conversion. They started to germinate after 30 days of culture in medium II, the development of the shoots occurred after three months of culture. At this stage presence of roots was not observed, however histological studies showed that the root meristem was already well formed. Finally with formation of roots after 3 months of culture, whole plantlets were formed.

The present study allows us to have better insights into the understanding of the somatic embryogenesis process in coconut plumule explants cultured *in vitro* and to integrate the whole process as depicted in Figure 4.2. It could help us to detect limitations of the process. For instance the low germination of embryos that can be related to aberrant development (stem meristem absence, leaf fusion, etc.). In addition, this information can be useful to design studies to further understanding of the process. It can be the basis for molecular studies that can relate gene expression with the histomorphological development using techniques such as *in situ* hybridisation and *in situ*

RT-PCR. Also in studies requiring transformation, the information can help to define the time and the cells where we can try the insertion of genes of interest.

3.5 ACKNOWLEDGMENTS. A.A. thanks Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) and CONACYT (Ref. 119335) for the financial support for his PhD studies of which the present paper is part of. This project was supported by CONACyT-SISIERRA (Project number 990130).

3.6 REFERENCES

- Alemanno, L., M. Berthouly and N. Michaux-Ferriere 1997. A comparison between *Theobroma cacao* L. zygotic embryogenesis and somatic embryogenesis from floral explants. *In vitro Cellular and Developmental Biology -Plant*, 33: 163-172.
- Berthouly, M. and N. M. Michaux-Ferriere 1996. High frequency somatic embryogenesis in *Coffea canephora*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 44:169-176.
- Blake, J. and C. J. Eeuwens 1982. Culture of coconut palm tissues view to vegetative propagation. In: *Tissue culture for economically important plants. Proceedings of the International Symposium Costed, ANBS. Singapore*, pp 145-148.
- Buffard-Morel, J., J.L. Verdeil and C. Pannetier 1992. Embryogenèse somatique du cocotier (*Cocos nucifera* L.) à partir d'explants foliaires: étude histologique. *Canadian Journal of Botany*, 70:735-741.
- Branton, R.L., and J. Blake 1983. Development of organized structures in callus derived from explants of *Cocos nucifera* L. *Annals of Botany*, 52: 673-678
- Chan, J.L., L. Sáenz, C. Talavera, R. Hornung, M. Robert and C. Oropeza. 1998. Regeneration of coconut (*Cocos nucifera* L.) from plumule explants through somatic embryogenesis. *Plant Cell Reports*, 17: 515-521.
- Dublin, P., F. Enjalric, L. Lardet, M. P. Carron, N. Trolinder and C. Pannetier. 1991. Estate crops. In: Debergh PC, Zimmerman RH (Eds). *Micropropagation technology and application*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 337-361.
- Eeuwens, C.J. 1976. Mineral requirements for growth and callus initiation of tissue explants excised from mature coconut (*Cocos nucifera*) and date (*Phoenix dactylifera*) palms cultured *in vitro*. *Physiologia Plantarum*, 36: 23-28.

- Emons, A. M. C. 1994. Somatic embryogenesis: cell biological aspects. *Act. Bot. Neerl.* 43:1-14.
- Feirer, R. P., J. H. Conkey and S. A. Verhagen. 1989. Tryglicerides in embryogenic conifer calli: a comparasion with zygotic embryos. *Plant Cell Reports*, 8: 207-209.
- Fernando, S.C. and C. K. A. Gamage. 2000. Absciscic acid induced somatic embryogenesis in immature embryo explants of coconut (*Cocos nucifera* L.). *Plant Science*, 2000: 193-198.
- Fisher, D.B. 1968. Protein staining of ribboned epon sections for light microscopy. *Histochemie*, 16: 92-96.
- Haccius, B. and V. J. Philip 1979. Embryo development in *Cocos nucifera* L: a critical contribution to a general understanding of palm embryogenesis. *Plant Systematic and Evolution*, 132: 91-106.
- Hornung, R. 1995. Micropropagation of *Cocos nucifera* L. from plumular tissue excised from mature zygotic embryos. *Plantations, Recherche, Développement*, 38-41.
- Michaux-Ferriere, N., and M. P. Carron. 1989. Histology of early somatic embryogenesis in *Hevea brasiliensis*: The importance of the timing of subculturing. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 19: 243-256.
- Roberts, D.R., B. S.Flinn, D. T. Webb, F. B. Webster, and B. C. S. Sutton. 1990. Absciscic acid and indole-3-butric acid regulation of maturation and accumulation of storage proteins in somatic embryos of interior spruce. *Physiologia Plantarum*, 78: 355-360.
- Sáenz, L., J. L. Chan, R. Souza, R. Hornung, E. Rillo, J. L. Verdeil, and C. Oropeza 1999. Somatic embryogenesis and regeneration in coconut from plumular explants. In: *Current Advances in Coconut Biotechnology*. Oropeza C., Verdeil J. L., Ashburner G.R., Cardeña R. and Santamaria J. (Eds). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 309-318.
- Samosir, Y.M.S., I. D. Godwin, and S. W. Adkins. 1999. The use of osmotically active agents and absciscic acid can optimise the maturation of coconut somatic embryos. In: *Current Advances in Coconut Biotechnology*. Oropeza C., Verdeil J.L., Ashburner G.R., Cardeña R. and Santamaria J. (Eds). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 341-354.
- Schwendiman, J., C. Pannetier, N. Michaux-Ferriere. 1990. Histology of embryogenic formation during *in vitro* culture of oil palm *Elaeis guineensis* Jacq. *Oléagineux*, 45: 409-415.

- Verdeil, J.-L. and J. Buffard-Morel 1995. Somatic embryogenesis in coconut (*Cocos nucifera* L.). In: Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol. 30. Y.P.S. Bajaj (Ed.) Somatic Embryogenesis and Synthetic Seed I. Springer-Verlag. Berlin Heidelberg, Germany, pp 299-317.
- Verdeil, J.-L., C. Huet, F. Grosdemange, J. Buffard-Morel. 1994. Plant regeneration from cultured immature inflorescence of coconut (*Cocos nucifera* L.): evidence for somatic embryogenesis. *Plant Cell Report* s,13: 218-221.
- Verdeil, J.-L., V. Hoher, C. Huet, F. Grosdemange, J. Escoute, N. Ferriere, and M. Nicole 2001. Ultrastructural changes in coconut calli associated with the acquisition of embryogenic competence. *Annals of Botany*, 88: 9-18.
- Yeung, C. E. 1999. The use of histology in the study of plant tissue culture systems- some practical comments. *In vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 35:137-143.

CAPITULO 5

INFLUENCIA DE LAS CITOCININAS Y ANTICITOCININA 8-AZAADENINA EN LA EMBRIOGENESIS SOMATICA DE COCOTERO

Parte de la información de este capítulo se ha integrado al artículo: Analysis of cytokinins in *Cocos nucifera* L. *in vitro* cultures obtained from plumular explants, y actualmente se encuentra en revisión por el Dr. Strnad de la Republica Checa.

5.1 INTRODUCCION

La variación en respuestas a la embriogénesis somática en muchos sistemas vegetales puede ser debida a las diferencias en el estado hormonal en el explante inicial (Seitz y Bingham, 1988), por ejemplo en el caso de *Medicago falcata* se han estudiado niveles endógenos de citocininas, ácido abscísico y ácido indolacético. En este caso los niveles altos de citocininas endógenas estuvieron relacionados a una mejor respuesta embriogénica, mientras que con la auxina ácido indolacético no se observó una relación entre sus contenidos endógenos con la capacidad embriogénica. Para el caso del ácido abscísico su contenido endógeno fue más alto en líneas no embriogénicas que en embriogénicas (Denchev y Atanassov, 1995).

Por otra parte, en estudios reportados por Wenck *et al.*, (1988) y realizados en explantes basales de hojas con genotipos no embriogénicos de pastos, encontraron un contenido de 3.5 veces más citocininas endógenas que los genotipos embriogénicos. Las principales citocininas endógenas encontradas fueron: ribósido de zeatina, zeatina, dihidroxizeatina y ribósido de hidroxizeatina. Además, cuando se adicionaron pequeñas cantidades exógenas de la citocininas zeatina, la embriogénesis somática fue inhibida.

En cuanto a las anticitocininas, se conoce que estas pueden inducir la embriogénesis somática. Somleva *et al.*, (1995) mencionaron que las anticitocininas triazina y carbamato estimulan la iniciación de callos y la frecuencia de formación de embriones producidos directamente e indirectamente en genotipos con poca capacidad embriogénica del pasto *Dactylis glomerata* L. La triazina se utilizó en concentraciones de 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} y 10^{-4} M y el carbamato en 10^{-7} , 10^{-6} y 10^{-5} M. La triazina incrementó en un 60% la formación de CE en la concentración de 10^{-7} con respecto al carbamato. Esta misma anticitocinina promovió una alta intensidad de embriogénesis indirecta en un 760.4% de ES con una concentración de 10^{-7} M en comparación con el carbamato que solamente presentó ligeramente arriba del 300% de ES.

Estos compuestos inhiben la acción de las citocininas en sus respuestas fisiológicas típicas de forma competitiva (Sergiev *et al.*, 1995). Se cree que se unen en forma competitiva a un receptor de citocinina y esto inhibe los efectos biológicos de las citocininas (Braul *et al.*, 1997).

En estudios realizados en cocotero, los contenidos de las citocininas zeatina e isopentenil adenina endógenas han mostrado una correlación positiva con la formación de embriones somáticos a partir de explantes foliares cultivados *in vitro* (Verdeil y Hoher, 1997). Sin embargo, en estudios realizados con callos embriogénicos y callos no embriogénicos obtenidos a partir de explantes de plúmula de cocotero se han encontrado niveles altos de citocininas endógenas y menores cantidades en callos embriogénicos (Saéñz, 1999), además en esta misma especie se ha reportado que la adición de la citocinina bencil aminopurina (BAP) en 10 y 100 μM inhibe la formación de callo durante la fase de inducción (Saéñz, 1999) por lo que probablemente los contenidos de citocininas endógenas limitan la formación de callos embriogénicos en esta especie.

Con base en lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue: Estudiar el efecto de las citocininas en la formación de callo y callo embriogénico así como evaluar el efecto de la anticitocinina en la formación de callo, callo embriogénico y formación de embriones somáticos. Por lo que en este trabajo se presentan resultados de las citocininas bencil aminopurina (BAP), zeatin trans isomero (Z), N6 (2'isopentenil) adenina (2iP), así como la evaluación de la anticitocinina 8-azaadenina (8-aza) y su efecto combinado con la citocinina BAP durante el proceso de la embriogénesis somática de cocotero a partir de explantes de plúmula.

5.2 MATERIALES Y METODOS

En esta sección se presentan materiales y métodos exclusivos para este capítulo, los aspectos generales son presentados en el capítulo 3.

5.2.1 Material vegetal. El material vegetal utilizado fue de frutos de cocotero Enano Malayo Verde (EMV) procedente de Dzidzantun, Yucatán y Material Enano Malayo Amarillo (EMA) colectado en Chetumal, Quintana Roo (INIFAP). Los frutos colectados tenían una edad de 12 a 14 meses después de la polinización procedentes de plantas de aproximadamente 15 años de edad. Las plúmulas fueron extraídas y desinfectadas de acuerdo a Chan *et al.*, (1998).

5.2.2 Medio de cultivo y condiciones. Las plúmulas de cocotero, se cultivaron previamente en un medio Y3 (Eeuwens, 1976) adicionado con 0.55 mM de 2,4-D en etapa I (3 meses en oscuridad). Los callos embriogénicos se establecieron en etapa II bajo fotoperíodo de 16 h de iluminación ($45\text{-}60 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ PPFD)/ 8 h de oscuridad a $27 \pm 2^{\circ}\text{C}$ y subcultivos cada dos meses.

5.2.3 Experimentos con citocininas exógenas y 8-azaadenina. Previamente se estableció un experimento con el material Enano Verde Malayo con las citocininas Z, 2iP y BAP (SIGMA), las concentraciones utilizadas fueron: 0, 1, 5, 25, 100 μM . Estas se adicionaron al medio de cultivo después del autoclaveado y fueron esterilizadas por filtración. Posteriormente, con el propósito de ver si el efecto de las citocininas ocurría en otro genotipo se estableció un segundo experimento con material Enano Malayo Amarillo únicamente con la citocinina BAP, utilizando las concentraciones: 0, 1, 5, 25, 100 μM . Adicionalmente se estableció un tercer experimento con la anticitocinina 8-

azaadenina (8-aza) incluyendo las siguientes concentraciones: 0, 4.5, 9, y 18 μM . Para conocer la acción de la anticitocinina sobre una citocinina, se estableció un cuarto experimento realizado con BAP (1 μM) y 8-aza (0, 4.5, 9, y 18 μM). Las variables a medir fueron: (1) Formación de callo inicial y callo embriogénico a los 90 días de cultivo, y (2) Número de embriones somáticos a los 60 días en etapa II (solamente con 8-aza). Todos Los experimentos se establecieron bajo un diseño completamente al azar.

5.2.4 Análisis estadístico. Los resultados de las variables se sometieron a análisis de varianza (ANOVA) y a la prueba de comparación de medias conocida como diferencia mínima significativa ($p < 0.05$), para lo cual se utilizó el paquete de diseños experimentales FEUANL, versión 2.5 (Olivares, 1994).

5.3 RESULTADOS

5.3.1 Efecto de las citocininas en la formación de callo inicial (CI) y callo embriogénico (CE). Con el material Enano Verde Malayo, la formación de CI con las diferentes citocininas BAP, 2iP o Z evaluadas en las concentraciones estudiadas (0, 1, 5, 25, 100 μM), no afectaron el porcentaje de CI (Figura 5.1).

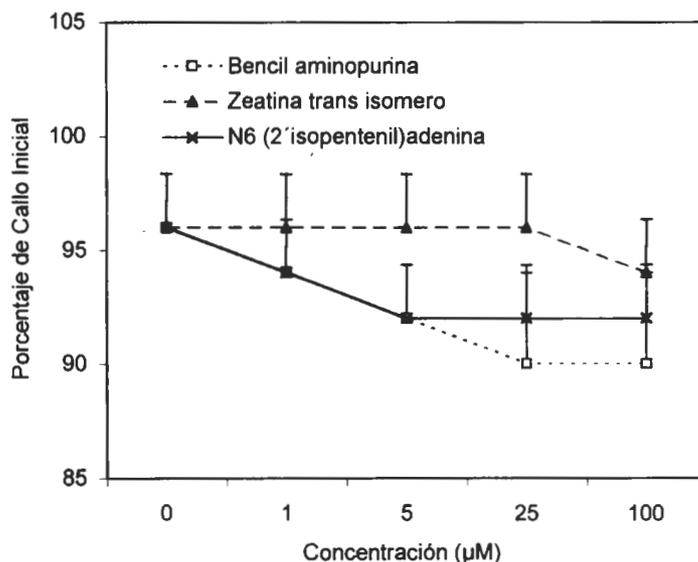


Figura 5.1. Influencia de las citocininas bencil aminopurina (BAP), zeatina trans isomero (Z) y N6 (2'-isopentenil) adenina (2iP) en las concentraciones de 0, 1, 5, 25 y 100 μM en la formación de callo durante 90 días de cultivo en oscuridad (etapa I) con material de cocotero Enano Malayo Verde ($n=3$, donde cada repetición estuvo formada por 20 plúmulas).

La formación de CI generalmente fue alto con un mínimo del 90% en los niveles de 25 μM y 100 μM de BAP y un máximo del 96% en los tratamientos control y en 1 μM , 5 μM y 25 μM de Z.

Por otra parte, el porcentaje de explantes que formaron callo embriónico (CE) en presencia de citocininas con relación al control se redujo, pero esta no fue proporcional a la concentración (Figura 5.2). En 1 μM el porcentaje de CE disminuyó del 60% (control) a 38%, 33% y 28% con BAP, Z y 2iP respectivamente, además se necesitó de 100 μM para reducir esta cantidad en unidades porcentuales con las citocininas evaluadas, bajando este porcentaje a 17%, 16% y 8% con BAP, Z y 2iP respectivamente.

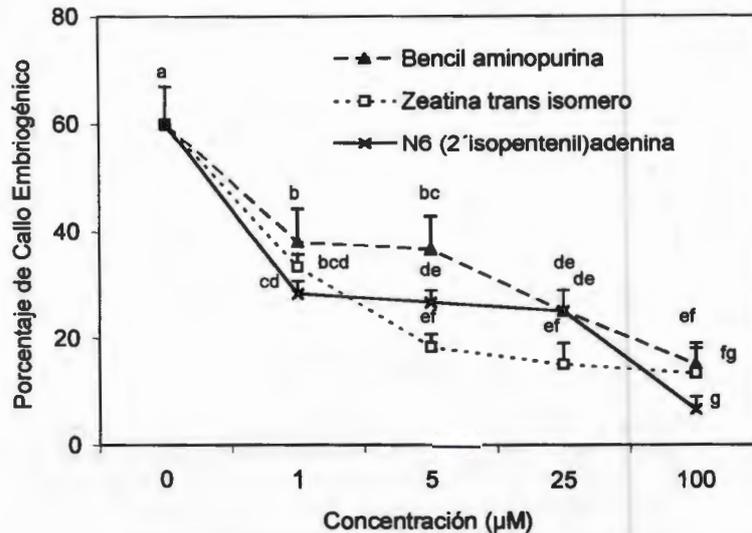


Figura 5.2. Influencia de las citocininas bencil aminopurina (BAP), zeatina trans-isomero (Z) y N6 (2'-isopentenil) adenina (2iP) en las concentraciones de 0, 1, 5, 25 y 100 μM en la formación de callo embriónico durante 90 días de cultivo en oscuridad (etapa I) con material de cocotero Enano Malayo Verde (n=3, donde cada repetición estuvo formada con 20 plúmulas, los valores con la misma letra son iguales estadísticamente, DMS 0.05).

Con el propósito de conocer si la citocinina podría afectar la formación de CI y CE en algún otro genotipo, se estableció otro experimento con material Enano Malayo Amarillo solamente que en este caso se utilizó la BAP (0, 1, 5, 25 y 100 μM). Los resultados mostraron que la formación de callo inicial (CI) en presencia de la BAP fue disminuyendo progresivamente, obteniéndose un 73% para el control, 68.5% para los

tratamientos con 1 y 5 μM , 55% con 25 μM y 53.6% con 100 μM . Con respecto a la formación del callo embriogénico (CE), este fue más limitado siendo similar a lo observado con el material Enano Malayo Verde, obteniéndose en el control 55% de CE, disminuyendo a 27% con 1 μM hasta 13% en 100 μM (Figura 5.3).

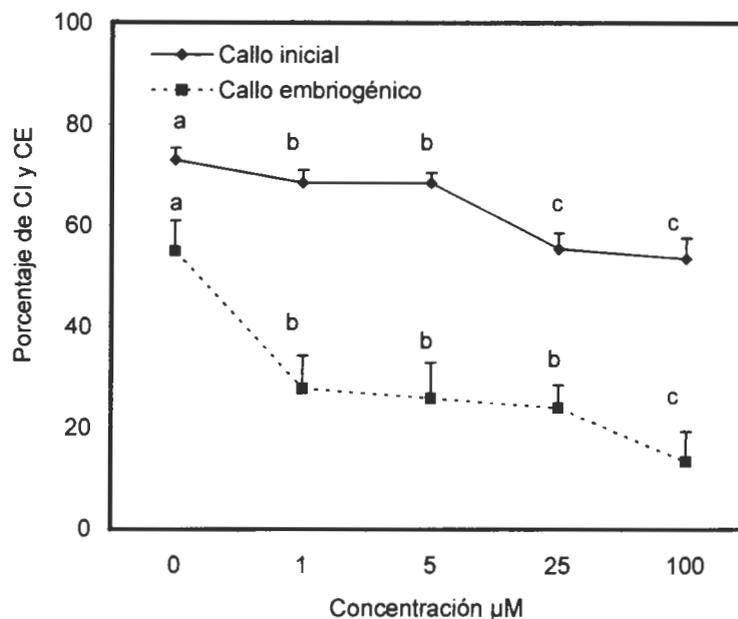


Figura 5.3. Efecto de la bencil aminopurina en la formación de callo y callo embriogénico a los 90 días de cultivo en plúmulas de material Enano Malayo Amarillo en etapa I ($n=3$, donde cada repetición estuvo formada con 20 explantes. Los valores con la misma letra son iguales estadísticamente, DMS 0.05).

5.3.2. Efecto de la adición de 8-azaadenina. Los resultados obtenidos con citocininas mostraron una correlación inversa entre las citocininas exógenas y la formación de CE, por lo tanto para tener más evidencias del efecto negativo de las citocininas en el proceso de embriogénesis somática en cocotero, se evaluó el efecto de la adición de 8-aza en explantes de plúmula de material Enano Malayo Verde. La 8-aza es un compuesto que tiene actividad anticitocinina (George, 1993). Los resultados mostraron que la adición de 8-aza incrementó la formación de CI de 90% en el tratamiento control a 100% con la concentración de 9 μM , mientras que en 18 μM disminuyó la formación de CI (Figura 5.4). El CE se incrementó ligeramente de 52% en el control a 65% con las concentraciones de 4.5 μM y 9 μM , obteniéndose menor respuesta a la formación de CE con 18 μM (Figura 5.4).

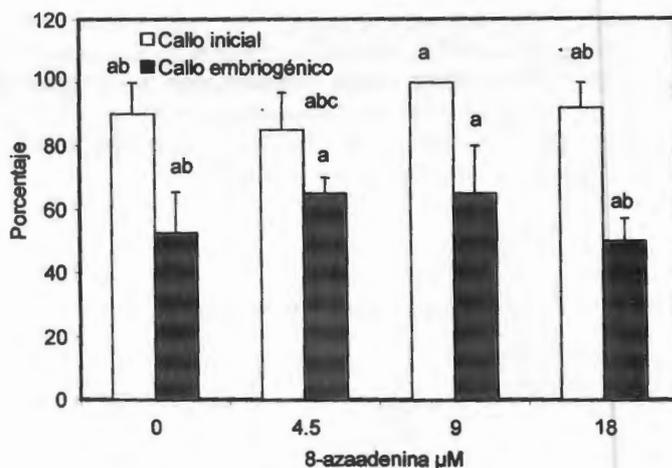


Figura 5.4. Porcentaje de callo y callo embriogénico en presencia de 8-azaadenina (0,4.5, 9 y 18 µM) después de 90 días de cultivo en plúmulas de material Enano Malayo Verde en etapa I (n=4, los valores con la misma letra son iguales estadísticamente, DMS 0.05).

Cuando se adicionó 1 µM de la BAP en presencia de las diferentes concentraciones de 8-aza (0, 4.5, 9, y 18 µM) en el medio de cultivo, la 8-aza pudo restaurar paulatinamente la respuesta morfológica incrementándose el porcentaje hasta obtener un valor similar al control con la concentración de 18 µM, presentando un porcentaje de CE del 52.5% (Figura 5.5).

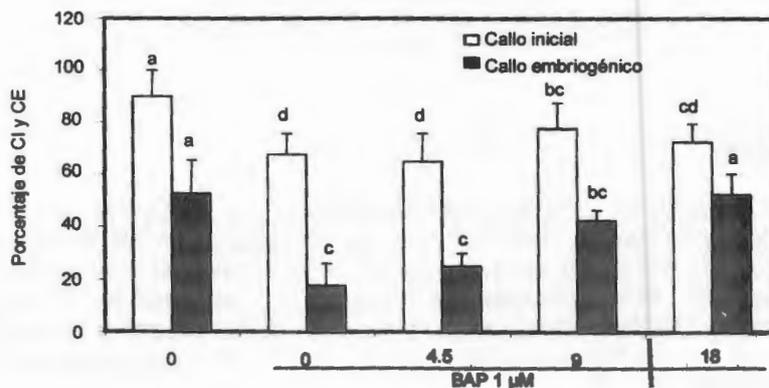


Figura 5.5. Porcentaje de callo inicial y callo embriogénico en presencia de 8-azaadenina (0,4.5, 9 y 18 µM) y bencil aminopurina 1 µM después de 90 días de cultivo en plúmulas de material Enano Malayo Verde en etapa I (n=4, los valores con la misma letra son iguales estadísticamente, DMS 0.05).

La formación de ES también fue evaluada en etapa II en CE cultivados previamente en 8-aza (0, 4.5, 9, y 18 μM). Los resultados mostraron que los CE cultivados en etapa I en 4.5 μM de 8-aza presentaron 5.7 ES/CE a los 30 días y 8.8 a los 60 días, esto representa un incremento del 54% en número de ES en presencia de la 8-aza. Conforme se aumentaron las concentraciones de este compuesto disminuyó la formación de ES (Figura 5.6).

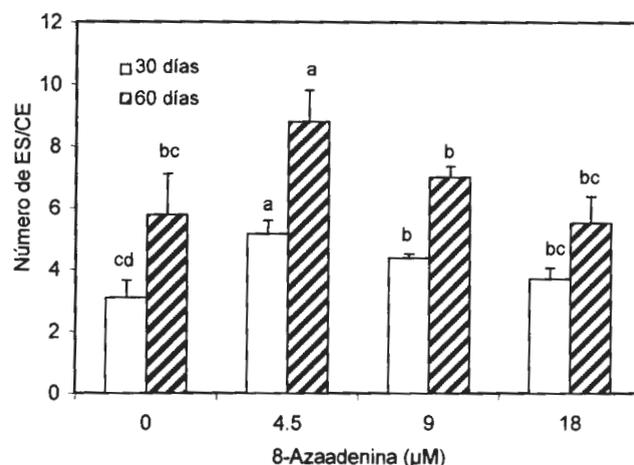


Figura 5.6. Número de embriones somáticos en presencia de 8-azaadenina (0,4.5, 9 y 18 μM) a los 30 y 60 días de cultivo de callos embriogénicos de cocotero Enano Malayo Verde en etapa II ($n=3$, donde cada repetición se formó con 8 callos embriogénicos). Los valores con la misma letra son iguales estadísticamente, DMS 0.05).

5.4 DISCUSION

Cuando las plúmulas de cocotero Enano Malayo Verde (EVM) fueron cultivadas en presencia de las citocininas BAP, 2iP o Z, no se observó un efecto negativo en la formación de callo inicial (CI), sin embargo la formación de callo embriogénico (CE) se redujo seriamente. Esta respuesta fue diferente con plúmulas de cocotero Enano Malayo Amarillo (EMA) cultivadas en presencia de la citocinina aromática BAP, presentándose una disminución en la formación de CI junto con una mayor afectación en la formación de CE.

Un análisis mas detallado de los resultados, para el caso del EMV, en presencia de las tres citocininas (BAP, Z y 2iP) mostró que la inhibición de la formación de CE, desde la concentración más baja utilizada (1 μM). La formación de CE disminuyó a 38%, 33% y 28% con BAP, Z y 2iP respectivamente, mientras que el tratamiento control presentó

cerca de un 60%, además conforme se aumento la concentración, los porcentajes de formación de CE fueron más bajos, por lo tanto este efecto no esta asociado con un solo tipo de citocinina. Reportes previos han descrito que la adición de la citocinina aromática BAP al medio de cultivo reduce la formación de CE promovido por la auxina (Saénz, 1999). Estos resultados coinciden con las observaciones realizadas en este trabajo al adicionarse la BAP con los dos genotipos en estudio por lo que refuerzan la hipótesis de que las citocininas exógenas interfieren negativamente en la embriogénesis somática.

Es posible que el explante (plúmula) contenga un nivel endógeno de citocininas óptimo que lo conduce a la formación de CE en presencia de una auxina y cuando este nivel endógeno se incrementa debido a la adición de citocinina exógena al cultivo, es posible que se induzca una variación en la respuesta a la embriogénesis somática que como consecuencia conduzca a la formación de un callo no embriogénico. De acuerdo a Seitz y Bingham (1988) las diferencias en el estado fitohormonal en el explante inicial puede ser un factor de la variación en la respuesta a la embriogénesis somática. Esto también podría explicar porque algunas especies se ven favorecidas en su respuesta a la embriogénesis somática cuando sus contenidos endógenos de citocininas son altos como en el caso de *Medicago falcata* (Denchev y Atanassov, 1995) o como en *Dactylis glomerata* L. En el caso particular de *Dactylis glomerata* L., los genotipos con baja capacidad a la embriogénesis somática contienen 3.5 veces más citocininas endógenas que los genotipos embriogénicos y su baja capacidad embriogénica ha sido asociada a los niveles endógenos de citocininas (Wenck *et al.*, 1988), además con la aplicación exógena de la citocinina zeatina, la embriogénesis somática se inhibe conforme se aumenta la concentración (Wenck *et al.*, 1988). Estos resultados coinciden a los observados en la formación de CE originados a partir del cultivo de plúmula de cocotero y en presencia de las diferentes citocininas exógenas.

Recientemente se ha reportado que en cocotero, existen niveles elevados de citocininas endógenas. En el caso de cultivos *in vitro* de plúmula, se han determinado niveles altos, especialmente en callos no embriogénicos y callos embriogénicos por lo que este hecho puede estar inhibiendo la embriogénesis somática a partir de explantes de plúmula, ya que se detectaron cerca de 15 citocininas en 3 tipos, predominando en mayor proporción las del tipo isoprénicas sobre las aromáticas (Saénz, 1999). Individualmente, en el caso de las isoprénicas las que están en mayor proporción en orden creciente son: la dihidroxizeatina, ribósido de dihidroxizeatina, ribósido de isopentenil adenina, ribósido de zeatina, glucósido de zeatina y 9-glucósido de isopentenil adenina, y dentro del grupo de las aromáticas se encontró en mayor cantidad el 9-glucósido de bencil aminopurina (Saénz, 1999).

Los resultados obtenidos con las citocininas exógenas sugieren que estas no favorecen la embriogénesis somática durante la fase de formación de callo embriogénico a partir del cultivo de plúmulas, esto difiere a lo reportado con explantes foliares cultivados *in vitro* de cocotero. De acuerdo a Verdeil y Hocher (1997) existe una correlación positiva entre el contenido endógeno de zeatina e isopentenil adenina en la formación de embriones somáticos, por lo que sus contenidos de citocininas endógenas influyen en el proceso de la embriogénesis somática en ambos modelos, de forma positiva en explantes foliares y negativa en explantes de plúmula. Esto significa probablemente

que las plúmulas cultivadas *in vitro* tienen la tendencia a formar mayores cantidades de citocininas endógenas mientras que los explantes foliares sintetizan menores cantidades de estas fitohormonas.

En el caso de plúmulas, donde las citocininas endógenas pueden disminuir la capacidad embriogénica de los explantes, se puede sugerir el uso de anticitocininas para aumentar la capacidad embriogénica como ya ha sido reportado (Somleva *et al.*, 1995). Cuando se utilizó la 8-azaadenina (8-aza) con explantes de plúmula se observó una respuesta positiva obteniendo un 11% de incremento de CI y un 25% en la formación de CE en el nivel de 4.5 μM de 8-aza, mientras que la formación de ES fue posible obtener un incremento del 52.5% con respecto al control. Los porcentajes de CI y CE fueron bajos probablemente porque la anticitocinina utilizada no pudo neutralizar la totalidad de citocininas endógenas contenidas en el explante, ya que se desconoce su especificidad de acción hacia citocininas particulares, sin embargo la 8-aza pudo mejorar el número de ES.

Cuando se estudió la acción de la 8-aza sobre la citocinina BAP, la cual es la más comúnmente usada en protocolos de embriogénesis somática *in vitro*, la 8-aza fue capaz de recuperar el porcentaje de CE en 18 μM y neutralizar la acción de la BAP cuando se adicionó al medio de cultivo en 1 μM . La 8-aza actuó en forma débil en el sistema, probablemente debido a que ésta actúa sobre una pequeña parte de las citocininas exógenas, ya que como ha sido reportado en CE y callo no embriogénico existen al menos 15 citocininas en 3 tipos predominando en mayor proporción las isoprénicas que las aromáticas (Saénz, 1999).

Los resultados muestran la recuperación de la embriogénesis somática, en presencia de BAP (1 μM) cuando se adiciona la 8-aza (18 μM) por lo que estos resultados son consistentes indicando que probablemente la 8-aza compite con receptores de citocininas tal como ha sido reportado para estos compuestos (Braul *et al.*, 1997). Una anticitocinina puede inhibir citocininas endógenas y exógenas por lo que en este trabajo se hace evidente cierta especificidad de la anticitocinina utilizada hacia la BAP ya que en presencia de la 8-aza se mostró inhibición de la acción de la citocinina, sin embargo al parecer la acción de la 8-aza es débil porque se necesitó una concentración 18 veces más para restaurar la embriogénesis somática cuando se puso a competir con la citocinina exógena, sin embargo no existe información comparativa de la acción de esta anticitocinina hacia diferentes citocininas.

Estos resultados muestran que la adición de una anticitocinina como la 8-aza puede promover mayor cantidad de CE y ES a partir de los explantes de plúmula, sin embargo, los incrementos en cuanto al número de embriones somáticos son bajos en relación a reportes previos de la literatura, por ejemplo en callos de *Dactylis glomerata* L. tratados con la anticitocinina triazina en 10^{-7} M promovió un marcado incremento de la embriogénesis indirecta (760%) y directa (304.5%) en comparación al control (Somleva *et al.*, 1995). En estudios recientes con estos compuestos se ha reportado que estas reducen los niveles de citocininas endógenas en los cultivos de 5 días en *Dactylis glomerata* L. (Somleva, *et al.*, 1999; citado por Somleva *et al.*, 2000) y probablemente promueven la expresión de la capacidad embriogénica durante el subsiguiente subcultivo, posiblemente cambiando el estado oxidativo de la célula

inducido por la anticitocinina favoreciendo la embriogénesis somática (Somleva *et al.*, 2000).

Es claro que las anticitocininas pueden tener un papel importante en la embriogénesis somática de cocotero ya que estas pueden revertir el efecto inhibitorio de las citocininas dependiendo de su especificidad, por lo que es probable que utilizando una mayor variedad de anticitocininas de mayor actividad como: la 2-chloro-4-cyclobutylamino-6-ethylamino-1,3,5-triazine (Somleva *et al.*, 1995), la 4-cyclopentylamino-2 methylthio-pyrrolo[2,3-d]-pyrimidine (CPP) y el N-(4-pyridyl)-O(4-chlorophenyl)-carbamate (PC) (Sergiev, *et al.*, 1995), solas o en combinación podrían mejorar la producción de embriones somáticos al sumar incrementos de cada una de ellas lo que significaría mayor cantidad de ES si se obtiene un efecto acumulativo. En este sentido, estos compuestos abren una nueva posibilidad de aplicación para especies con baja capacidad embriogénica limitada por su alto contenido endógeno de citocininas. Por lo tanto, es necesario continuar con esta línea de investigación, mediante la utilización de anticitocininas más potentes, así como estudiar si la aplicación de estas disminuyen los niveles endógenos de las citocininas en los callos embriogénicos de cocotero.

5.5 BIBLIOGRAFIA

- Braul, M., R. Maldiney and E. Miginiac. 1997. Cytokinin-binding proteins. *Physiologia Plantarum*, 100: 520-527.
- Chan, L. J., Saéñz L., Talavera, C., Hornung, R., Robert, M. and Oropeza, C. 1998. Regeneration of coconut (*Cocos nucifera* L.) from plumule explants through somatic embryogenesis. *Plant Cell Reports* 17:515-521.
- Denchev, P. D. and Atanassov A.I. 1995. Micropropagation through somatic embryos. In: Bhojwani S.S. (Ed.) *Plant tissue culture: Applications and limitations*. Department of Botany, University of Delhi. Delhi 110007, India. Elsevier, pp. 193-205.
- Eeuwens, C. J. 1976. Mineral requirements for growth and callus initiation of tissue explants excised from mature coconut (*Cocos nucifera*) and date (*Phoenix dactylifera*) palms cultured *in vitro*, *Physiologia Plantarum*, 36: 23-28.
- George, E.F. 1993. Plant growth regulators. In: Edwin George F.(Ed) *Plant Propagation by Tissue Culture (part 1) The Technology*, pp. 420-479.
- Olivares, S. E. 1994. Paquete de diseños experimentales FEUANL. Versión 2.5. Facultad de Agronomía UANL. Marín, Nuevo León, México.
- Saéñz, Carbonell A. L. 1999. Desarrollo de protocolos para la regeneración de *Cocos nucifera*, L. a través de embriogénesis somática. Tesis de Doctorado, Unidad de Biología Experimental, Centro de Investigación Científica de Yucatán. 123 p.

- Seitz, C.M. and Bingham, E. T. 1988. Interactions of highly regenerative genotypes of alfalfa (*Medicago sativa*) and tissue protocols. In vitro Cellular and Developmental Biology-Plant, 26: 85-90.
- Sergiev, G. I., Alexieva, S. V., and Karanov, N. E. 1995. Cytokinin and anticytokinin effects on growth and free polyamine content in etiolated and green radish cotyledons. Journal of Plant Physiology, 145: 266-270.
- Somleva, M.M., Kapchina, V.; Alexieva, V. and Golovinsky, E. 1995. Anticytokinin effects on *in vitro* response of embryogenic and nonembryogenic genotypes of *Dactylis glomerata* L. Plant Growth Regulation, 16: 109-112.
- Somleva, M., Kapchina-Toteva, V., Alexieva, V., I. Sergiev and E. Karanov. 2000. Novel Physiological properties of two cytokinin antagonists. Journal of Plant Physiology, 156: 623-627.
- Verdeil J-L and Hocher V. 1997. Coconut: development of methods for the clonal propagation of elite, disease resistant palms by somatic embryogenesis. Third Annual Report. EC STD3.
- Wenck, R. A., B. V. Coger, R. N. Trigiano, and C. E. Sams. 1988. Inhibition of somatic embryogenesis in orchardgrass by endogenous cytokinins. Plant physiology, 88: 990-992.

CAPITULO 6

EFFECT OF 22(S),23(S)-HOMOBRASSINOLIDE ON SOMATIC EMBRYOGENESIS IN PLUMULE EXPLANTS OF *Cocos nucifera* (L.) CULTURED *IN VITRO*

Azpeitia, A.¹, Chan J.L.², Sáenz L.² and Oropeza C.^{2*}

¹ Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), Huimanguillo, Tabasco, e-mail: aazp@cicy.mx. ² Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY), Mérida, Yucatán, e-mail: cos@cicy.mx

* Corresponding author

Key words: *Cocos nucifera* L, somatic embryogenesis, plumule, brassinosteroids.

Esta sección ha sido aceptada para su publicación en la revista: The Journal of Horticultural Science & Biotechnology.

6.1. SUMMARY

The increasing demand for coconut palms resistant to diseases requires massive multiplication of improved or selected palms. This could be achieved through micropropagation. A reproducible regeneration protocol via somatic embryogenesis from plumule explants has been reported already, but its efficiency is still low. The protocol is based on the use of an auxin to induce embryogenic callus. Since brassinosteroids are known to act synergistically with auxins and might be involved in the control of plant embryogenesis, the effect of the brassinosteroid 22(S),23(S)-homobrassinolide on initial callus, embryogenic callus and somatic embryo formation in coconut plumule explants was tested. The explants were exposed (during a 3 or 7 d pre-culture) to different concentrations (0.01, 0.1, 1, 2 and 4 μM) of the brassinosteroid. The explants responded favorably to the brassinosteroid increasing their capacity to form initial callus, embryogenic callus and somatic embryos. The largest amount of somatic embryos formed, 10.8 somatic embryos / explant, was obtained exposing the explants for 3 d to the brassinosteroid at 0.01 or 0.1 μM , whereas 3.8 somatic embryos / explant were obtained from untreated explants. This is a very promising result considering the very slow progress of micropropagation research for this very recalcitrant species, that has taken now three decades since it started. This effect of a brassinosteroid on somatic embryogenesis of coconut (or of any other plant species) is as far as we know the first time to be reported.

6.2 INTRODUCTION

The coconut palm (*Cocos nucifera* L.) is a very important crop in tropical areas providing cash and subsistence to small holders worldwide. However, most coconut groves require replanting because of loss due either to palm senescence or to diseases such as lethal yellowing in America (Arellano and Oropeza, 1995), the lethal diseases in Africa (Eden-Green, 1995) and cadang-cadang in Asia (Hanold and Randles, 1991). Unfortunately, improved disease resistant planting materials are scarce and seed propagation does not yield sufficient material to satisfy the rapidly growing demands. Therefore, alternative approaches for the propagation of improved planting materials must be considered and *in vitro* cloning via somatic embryogenesis seems to provide a convenient alternative for the future due to its potential for massive propagation. During the 70's and early 80's coconut somatic embryogenesis was reported in various laboratories using different explant sources (see Blake 1990). Further research utilising inflorescence (Verdeil *et al.*, 1994) and plumule (Chan *et al.*, 1998) explants has allowed the development of reproducible regeneration protocols attaining measurable efficiencies for the first time, in particular for the case of the plumule protocol with approximately 100 plantlets per every 100 plumules (Sáenz *et al.*, 1999). Unfortunately, this efficiency is still very low for practical applications.

Somatic embryogenesis in plants is in general induced using phytohormones (George, 1993). In the particular case of coconut plumule explants, successful induction of embryogenic callus formation has been obtained in the presence of the synthetic auxin dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) (Hornung, 1995, Chan *et al.*, 1998). Somatic embryo formation on these calli is obtained by reducing 100 fold the 2,4-D concentration and adding a cytokinin (Chan *et al.*, 1998). However, the use of a cytokinin during induction of embryogenic capacity has proved detrimental (Sáenz, 2000) and according to the literature no other phytohormones have been tested on plumule explants for this purpose. Therefore, it would be necessary to test other phytohormones with potential to promote morphogenetic responses. For instance, the brassinosteroids (BRs) that (among other physiological effects) are known to promote cell division and cell differentiation (Mandava, 1988). It has also been shown that BRs act synergistically with auxins, including 2,4-D (Katsumi, 1985), and this has been proposed to occur by enhancement of tissue sensitivity to auxins (Mandava, 1988).

In vitro applications of BRs have also been reported. Ponsamuel *et al.*, (1996) reported the stimulation of somatic embryo conversion in tea explants. Ponsamuel *et al.*, (1998) reported an stimulation of the organogenesis process in peanut. Although, there are no reports in the literature on the effect of these compounds on the formation of somatic embryos, there is evidence that sterols and BRs play a role in the regulation and signalling in cell division and cell expansion in embryogenic and post-embryogenic development in plants (Jang *et al.*, 2000). The present paper reports the utilisation of a brassinosteroid compound to promote the formation of initial callus, embryogenic callus and somatic embryos in coconut plumular tissue.

6.3 MATERIALS AND METHODS

6.3.1 Plant material. The fruit were harvested 12-14 months after pollination (except where otherwise indicated) from 15 year old Malayan Dwarf coconut palms at San Crisanto, Yucatán, México. The fruit were cut transversely with a machete revealing the embryos surrounded by solid endosperm. Embryos were excised from the open fruit using a cork borer (1.6 cm diameter) and placed in distilled water. Under aseptic conditions, the endosperm enclosing the embryo was washed in 70% ethanol in water (v/v) for 3 min and rinsed 3 times with sterile distilled water, washed in a 6% NaClO solution (w/v) for 20 min and rinsed 3 times with sterile distilled water. The embryos were excised from the endosperm and washed in a 0.6% NaClO solution (w/v) for 10 min and rinsed with sterile distilled water 3 times. Embryos were 5-7 mm long and weighed approximately 100 mg each. The plumules were excised from these embryos using an stereoscopic microscope and placed directly in culture medium.

6.3.2 Culture media and conditions. All chemicals were obtained from Sigma (USA). Each explant was cultured in 35 ml culture vessels containing 10 ml of Y3 medium (Eeuwens, 1976), added with gelrite (3 g l^{-1}) and charcoal (acid washed – PCCT, 2.5 g l^{-1}). Growth regulator concentrations were: 0.55 mM 2,4-D for medium I (this concentration was reduced when explants were pre-cultured in modified medium I, see below); and 6 μM 2,4-D and 300 μM 6-benzylaminopurine (6-BAP) for medium II. The pH of the medium was adjusted to 5.75 before autoclaving for 20 min at 120°C . The explants in medium I were incubated in conditions 1: darkness for 3 months (or as indicated in the text) at $27 \pm 2^\circ\text{C}$ without subculturing. When transferred to medium II they were incubated in conditions II: 16 h illumination ($45\text{-}60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ PPFD) / 8 h darkness photoperiod at $27 \pm 2^\circ\text{C}$, and subculturing every two months.

6.3.3 Experiments with 22(S),23(S)-homobrassinolide (HBr). The brassinosteroid HBr (Sigma) was dissolved in ethanol, sterilized by filtration (Millipore $0.22 \mu\text{m}$) and added to sterile medium, prior to gelling, to final concentrations of 0, 0.01, 0.1, 2 and 4 μM . Explants were exposed to HBr during a 3 or 7 d pre-culture following previous reports (Katsumi, 1985; Zurek *et al.*, 1994) and the medium I formulation was modified: 2.5 g l^{-1} polyvinylpyrrolidone (PVPP) was added instead of charcoal (according to Sáenz, 2000), to avoid accumulation of phenols and other compounds toxic to the explants, and a reduced 2,4-D concentration of 1 μM instead of 0.55 mM. During pre-culture explants were kept in conditions I. At the end of pre-culture, the cultures were transferred to unmodified brassinosteroid-free medium I and kept there for three months in conditions I. Then they were transferred to medium II and conditions II, and kept there to allow embryo formation.

6.3.4 Histology. The histological procedures were carried out according to Buffard-Morel *et al.*, (1992), with slight modifications. Tissue samples were fixed in paraformaldehyde 4% in phosphate buffer (pH 7.2) for 24 hours under negative pressure. Samples were dehydrated in a stepwise manner with 30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 95% and 100% aqueous ethanol solutions, for 60 minutes each. This was followed by impregnation with JB-4 resin (Polyscience, USA). Three micrometer

sections were prepared from the resin-impregnated tissues and stained with PAS-Naphthol blue black.

6.3.5 Statistical analysis. ANOVA and Newman and Keuls test (significance level $p < 0.05$) were used for multiple comparisons of means from the treatments. For studies on the formation of initial calli and embryogenic calli, for each treatment every experiment consisted of 15 individual explants and was replicated four times. For studies on the formation of somatic embryos, for each treatment every experiment consisted of 10 calli and was replicated four times.

6.4 RESULTS

The formation of initial callus, embryogenic calli and somatic embryos was evaluated in plumule explants exposed during a 3 d or a 7 d pre-culture periods to different concentrations of HBr (0, 0.01, 0.1, 1, 2, 4 μM).

6.4.1 Histological and morphological evaluation

6.4.1.1 Initial callus formation. In explants cultured in medium I (and conditions I) with HBr (independently of the brassinosteroid concentration or time of pre-culture) initial callus formed after 30 d (Figure 6.1A) that was identical to initial callus formed in explants cultured in HBr-free medium (not shown). In histological sections at this stage meristematic areas were observed in the periphery of the calli (Figure 6.1B) as observed in calli formed in explants cultured in HBr-free medium (not shown).

6.4.1.2 Embryogenic callus formation. After 90 d of culture, a major proportion (see below) of initial calli, formed with or without HBr, developed embryogenic structures (Figure 6.1C and 6.1F) characteristic of embryogenic callus. These structures were more abundant in embryogenic calli formed in the presence of 0.01 or 0.1 μM HBr and 3 d pre-culture. In histological sections, embryogenic calli formed without HBr showed the occurrence of meristematic nodules that were present only in their periphery (Figure 6.1D) but not in inner tissues of the calli (Figure 6.1E). In the case of calli formed in the presence of 0.01 or 0.1 μM HBr, meristematic nodules were present in their periphery (Figure 6.1G) but also in inner tissues of the calli (Figure 6.1H). In these calli proembryos were also occasionally observed (Figure 6.1I) whereas this was not the case in calli formed in medium without HBr. In calli formed in media containing 1, 2 or 4 μM HBr, meristematic nodules or proembryos were not observed.

6.4.1.3 Somatic embryo formation. When embryogenic calli were transferred to medium II (and conditions II), they formed somatic embryos (SE) that were identical morphologically (Figure 6.1J) or histologically (Figure 6.1K) to those formed in calli grown in medium without HBr (not shown). They show the presence of characteristic structures as the coleoptile, the leaf primordium, the shoot apex and root apex (Figure 6.1K). Initial calli that did not form embryogenic structures did not develop somatic embryos eventually.

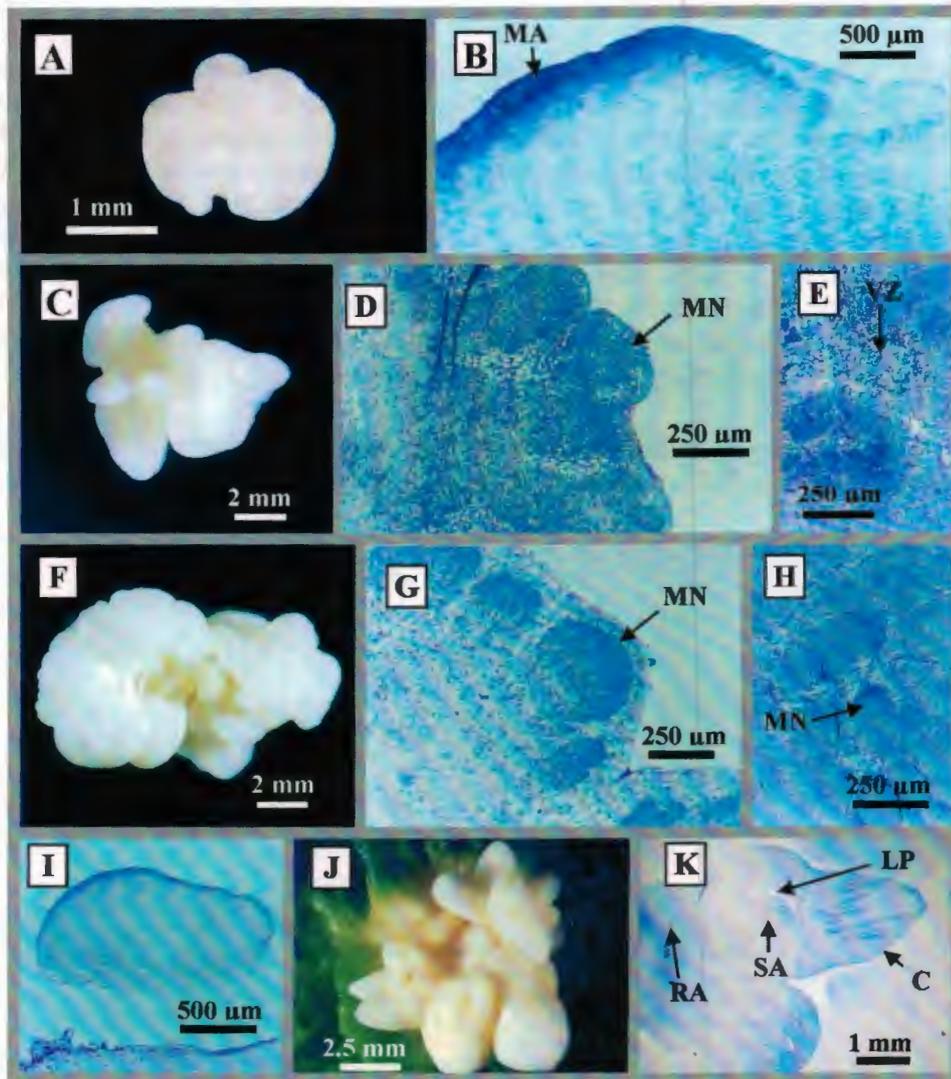


Figure 6.1. (A) Callus tissue developed in coconut plumule explants treated with 22(S),23(S)-homobrassinolide (month 1, medium I) and (B) histological section showing the meristematic area [MA]. (C) Embryogenic callus from untreated explants of culture (month 3, medium I) and histological sections showing (D) the meristematic nodules [MN] and (E) the vascularised zone from the inner tissue [VZ]. (F) Embryogenic callus from brassinolide-treated explants and histological sections showing the MN (G) in peripheral and (H) inner tissues. (I) Proembryo formed in initial calli derived from brassinolide-treated explants (month 3, medium I). (J) Clump of germinating somatic embryos formed in calli derived from brassinolide-treated explants (month 2, medium II). (K) Histological section showing the coleoptile [C], leaf primordia [LP], shoot apex [SA] and root apex [RA] of a somatic embryo.

6.4.2 Quantitative evaluation

6.4.2.1 Initial callus formation. Brassinosteroid treatment was found to affect the percentage of explants forming initial callus. When explants were cultured for 3 d in medium I, the best response was observed with 0.1 μM HBr, 96% of the treated explants formed initial callus whereas only 76% of the untreated (no HBr and no pre-culture) explants did. Although lower, increases were also obtained with the other HBr concentrations used 0.01 (93%), 1 (86%), 2 (93%) and 4 μM (90%) (Figure 6.2). The pre-culture itself was found to have a positive effect (86%) on initial callus formation. In the case of a 7 d pre-culture there were no significant treatment effects at any of the concentration of HBr used (Figure 6.2).

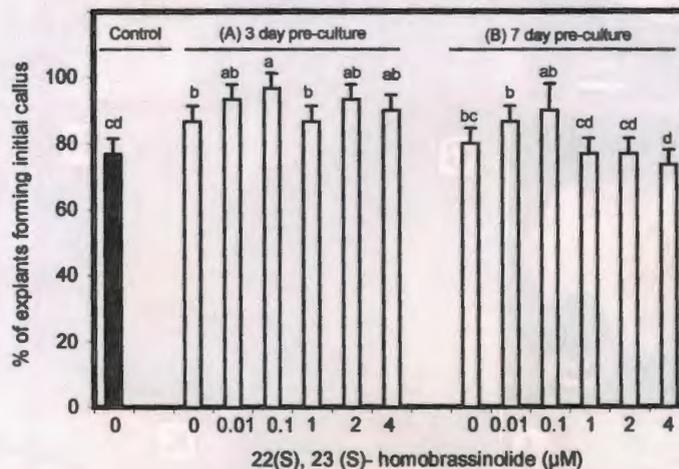


Figure 6.2. Effect of 3 day (A) and 7 day (B) pre-culture in modified medium I, containing different concentrations of 22(S),23(S)-homobrassinolide, on the formation of initial callus in coconut plumule explants. After the pre-culture period the explants were transferred to unmodified medium I. The response was evaluated 1 month later. The control was cultured in unmodified medium I from the beginning. Bars denote SD of four replicates (n=15). Different letters denote significant differences ($p < 0.05$).

6.4.2.2 Embryogenic callus formation. After 90d of culture, brassinosteroid treatment was also found to affect the percentage of explants forming embryogenic callus. For cultures originally pre-cultured during 3 d, the best response was observed with 0.01 and 0.1 μM HBr, 90% of the treated explants formed embryogenic callus whereas only 63% of the untreated (no HBr and no pre-culture) explants did (Figure 6.3). In all cases

embryogenic callus only developed from initial callus and did not develop from explants unable to form initial callus. Although lower, increases were also obtained with the other HBr concentrations used 1 (83%), 2 (80%) and 4 μM (80%) (Figure 6.3). The pre-culture itself was found to have a positive effect (70%) on embryogenic callus formation. In the case of a 7 d pre-culture, the best results were obtained with 0.01 (70%) and 0.1 μM HBr (76%). With other concentrations there was only a slight effect (1 and 2 μM , 66%) or no change (4 μM). Again, the pre-culture itself was found to have a positive effect, although slight in this case (66%).

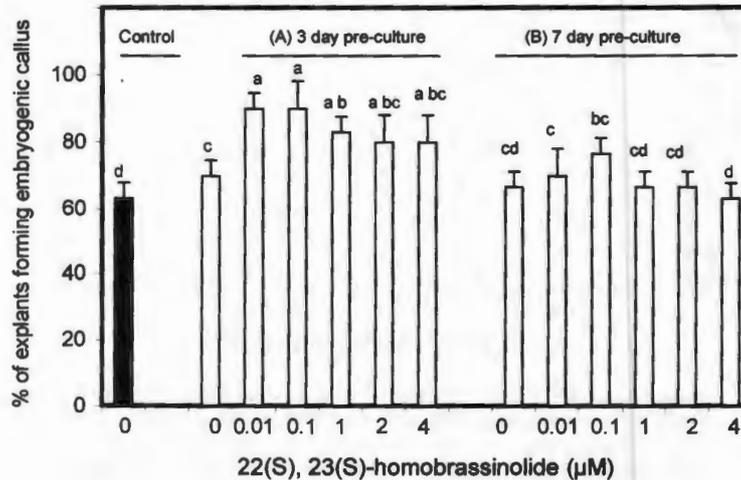


Figure 6.3. Effect of 3 day (A) and 7 day (B) pre-culture in modified medium I, containing different concentrations of 22(S),23(S)-homobrassinolide, on the formation of embryogenic callus in coconut plumule explants. After the pre-culture period the explants were transferred to unmodified medium I. The response was evaluated 3 months later. The control was cultured in unmodified medium I from the beginning. Bars denote SD of four replicates (n=15). Different letters denote significant differences ($p < 0.05$).

6.4.2.3 Somatic embryo formation. After three months of culture in medium I, the embryogenic calli were subcultured to medium II. Brassinosteroid treatment was found to affect the somatic embryo (SE) yield. The yield in callus derived from originally untreated (no HBr and no pre-culture) explants was 6 SE/ embryogenic callus (Figure 6.4). In comparison, for cultures originally pre-cultured during 3 d, the best responses were observed with 0.01 and 0.1 μM HBr with 12.1 SE/embryogenic callus. Responses with 1 and 2 μM HBr were 11.5 and 11.2 SE/embryogenic callus correspondingly, although they were not statistical different to those obtained with 0.01 and 0.1 μM HBr. The pre-culture itself was found to have a positive effect (9 SE/ embryogenic callus). In

the case of a 7 d pre-culture, the formation of SE was inhibited with all HBr treatments. Again, the pre-culture itself was found to have a positive effect (7.2 SE/explant) (Figure 6.4).

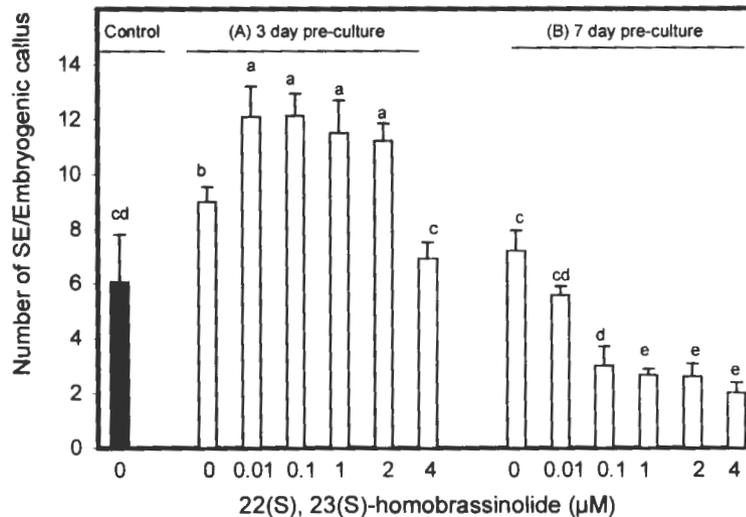


Figure 6.4. Effect of 3 day (A) and 7 day (B) pre-culture in medium I, containing different concentrations of 22(S),23(S)-homobrassinolide, on the formation of somatic embryos in embryogenic calli obtained from coconut plumule explants. After the pre-culture period the explants were transferred to unmodified medium I and three months later the derived embryogenic calli were transferred to medium II. The response was evaluated after 2 months in medium II. The control was cultured in unmodified medium I from the beginning. Bars denote SD of four replicates (n=10). Different letters denote significant differences (p<0.05).

Results on SE formation were also expressed on explant basis (Table 6.1), to show that the overall effect combining the increase in initial and embryogenic calli yields and SE/callus yield. The patterns are similar to those observed for SE/embryogenic calli (Figure 6.4), but the increases are greater in proportion. For instance, for cultures originally pre-cultured during 3 d, the highest yields observed (with 0.01 and 0.1 µM HBr) were 10.8 SE/explant whereas it was 3.8 SE/explant in originally untreated (no HBr and no pre-culture) explants. An increment of nearly 3 fold compared to 2 fold when expressed on a embryogenic calli basis.

Table 6.1. Effect of a 3 d pre-culture with 22(S),23(S)-homobrassinolide (HBr) on the formation of somatic embryos in plumule cultures. Different letters denote significant differences ($p < 0.05$), four replicates ($n = 10$).

Concentration HBr (μM)	Number of SE/explant
Control	3.8 e
0	6.3 c
0.01	10.88 a
0.1	10.89 a
1	9.54 b
2	8.96 b
4	5.53 cd

6.5 DISCUSSION

The increasing demand for palms resistant to diseases such as LY that has devastated coconut plantations worldwide, requires massive multiplication of improved or selected palms. This could be achieved through micropropagation. The use of coconut plumule explants has allowed important progress (Hornung, 1995; Chan *et al.*, 1998) to develop a reliable protocol, however the regeneration efficiency is still low. Since brassinosteroids are known to act synergistically with auxins (Katsumi, 1985), phytohormones required for the induction of embryogenic callus formation in coconut explants (Hornung, 1995; Chan *et al.*, 1998), and might be related to embryo development in plants (Jang *et al.*, 2000), we tested the effect of the brassinosteroid HBr on morphogenesis in plumule explants, in order to increase the regeneration efficiency of coconut.

Different concentrations of HBr were tested (0.01, 0.1, 1, 2 and 4 μM) exposing the plumule explants to the brassinosteroid during a 3 or 7 d pre-culture. The results showed that the explants responded favorably to HBr increasing their capacity to form initial callus, embryogenic callus and doubled the amount of somatic embryos formed per embryogenic callus when the brassinosteroid was applied during a 3 d pre-culture, but no effects or very small effects were observed when it was applied during a 7 d pre-culture. These results agree with previous reports that showed that brassinosteroid action depends on the length of time tissues are exposed to them, and that a short exposure is more convenient than a longer one (Katsumi, 1985; Zurek *et al.*, 1994). This differential effect of exposure time, might be related to a brassinosteroid-induced ethylene formation during the longer pre-culture time and this phytohormone in turn affecting the embryogenic response in plumule explants, since brassinosteroids have

been reported to be able (even synergistically with auxins) to promote ethylene formation (Arteca *et al.*, 1983; Arteca, 1984; Arteca *et al.*, 1984; Arteca *et al.*, 1988) and ethylene has been reported to inhibit somatic embryogenesis in coconut zygotic embryo explants (Adkins *et al.*, 1999).

Concerning morphological and histological development, initial callus formed in explants cultured in HBr-containing medium did not show differences in relation to initial callus formed in medium without HBr. On the other hand, embryogenic calli formed in explants cultured in HBr-containing medium showed developmental differences in relation to embryogenic callus formed in medium without HBr. Morphologically, they showed a greater abundance of nodular structures. Histologically, they showed the occurrence of meristematic nodules in inner tissues besides those formed in tissues in their periphery. Embryogenic capacity has been associated with meristematic nodules in different species, (Schwendiman *et al.*, 1990; Alemanno *et al.*, 1996) including coconut (Verdeil *et al.*, 1994; Chan *et al.*, 1998), and with nodular structures in coconut (Verdeil *et al.*, 1994; Sáenz *et al.*, 1999). Therefore a greater abundance of these two types of structures in embryogenic callus derived from HBr treated explants may explain the increased number of somatic embryo formed in these calli.

This promotion of morphogenesis by HBr in coconut plumule explants might be related, as reported for other plant species, to the synergistic action of brassinosteroids with auxins (Katsumi, 1985) or their possible role on the regulation of signaling in cell division and cell expansion in embryogenic development (Jang *et al.*, 2000). On the other hand, brassinosteroids are also known to act on the endogenous levels of cytokinins. Gaudinová *et al.*, (1995) reported that in tobacco callus tissue the effect of two brassinosteroids could be related to their effect of endogenous levels of cytokinins. The effect was inhibitory or stimulatory depending on the brassinosteroid used. Although the brassinosteroids used by Gaudinová *et al.*, were different to the one used here, analysis of endogenous levels of cytokinins in coconut plumule calli showed that there was an inverse relationship between cytokinin content and their capacity to form somatic embryos (Sáenz, 2000). Hence HBr could be reducing the endogenous levels of cytokinins of the plumule explants, an hypothesis that should be tested.

Efficiency-wise the overall effect of HBr increases the total amount of somatic embryos formed per explant 2.8 times. This is a very important increase considering the very slow progress of micropropagation research for this very recalcitrant species, that has taken now three decades since it started. This effect of HBr (or any brassinosteroid) on somatic embryogenesis of coconut (or of any other plant species) is as far as we know the first time to be reported. These results are encouraging but yet not enough to have a large scale micropropagation protocol considering the efficiencies achieved for other species. For instance in the case of date palm, Omar *et al.*, (1992) claim that the amount of somatic embryos that can be obtained from each gram of embryogenic calli is 230 after 2 months of culture and can be as large as 235,000 after 12 months. In the present case, 1 gram of embryogenic calli (about 8) yield approximately 100 somatic embryos. Therefore, in order to further increase yield efficiency, it will be interesting to test other brassinosteroids, but in addition it is important to consider several strategies. It has been shown that polyamines (Adkins *et al.*, 1999), or abscisic acid (ABA) in combination with osmotic agents (Samosir *et al.*, 1999) in slices of coconut zygotic

embryos; and ABA alone (Fernando and Gamage, 2000) in zygotic embryos cultured *in vitro* have important effects on the formation of somatic embryos. Both strategies have been tested in our laboratories on plumule cultures, but unfortunately without a positive effect (A. Azpeitia, unpublished). Large somatic embryo yields have been achieved for oil palm through cell suspension culture (Touchet *et al.*, 1991; Texeira *et al.*, 1995). In the case of coconut, this approach has been attempted, but unfortunately without success so far (Magnaval, 1995). On the other hand other strategies currently being tested in our laboratory, secondary embryogenesis and the use of substances such as anticytokinins, have shown promising results (unpublished). We believe that the combination of different strategies, including those above and the use of brassinosteroids, will increase the chances to improve significantly the efficiency of coconut regeneration provided their effects are cumulative.

Acknowledgments. A.A. thanks Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) and CONACYT (Ref. 119335) for the financial support for his PhD studies of which the present paper is part of. This project was supported by CONACyT-SISIERRA (Project number 990130).

6.6 REFERENCES

- Adkins, S. W., Y. M. Samosir and I. D. Godwin. 1999. Control of environmental conditions and the use of polyamines can optimize the conditions for the initiation and proliferation of coconut (*Cocos nucifera* L) somatic embryos. In: Current Advances in Coconut Biotechnology. (Oropeza, C., Verdeil, J.L, Ashburner, G.R., Cardeña, R. and Santamaría, J.M., Eds.). Kluwer Academic Press, Dordrecht, The Netherlands, pp 321-340.
- Alemanno, L., M. Berthouly and N. M. Michaux-Ferriere. 1996. Histology of somatic embryogenesis from floral tissues cocoa. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 46: 187-194.
- Arellano, J. and C. Oropeza. 1995. Lethal yellowing. In: Lethal yellowing research and practical aspects. (Oropeza, C., Howard, F.W., Ashburner G.R., Eds). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands , pp 1-16.
- Arteca, R.N., D. S. Tsai, C. D. Shlanghauser and N. V. Mandava. 1983. The effect of brassinolide on auxin-induced ethylene production by etiolated mung bean segments. *Physiologia Plantarum*, 59: 539-544.
- Arteca R. N. 1984. Calcium acts synergistically with brassinosteroids and IAA in stimulating ethylene production in etiolated mung bean (*Vigna radiata* cultivar Berken) hypocotyl segments. *Physiologia Plantarum*, 62: 102-104.
- Arteca R. N. and C. D. Schlagnhauser (1984). The effect of brassinosteroid and 2,4-D and L-aminoacid conjugates on ethylene production by etiolated mung bean (*Vigna radiata* cultivar Berken) segments. *Physiologia Plantarum*, 62: 445-447.

- Arteca, R. N., J. M. Bachman and N. B. Mandava. 1988. Effects of indole-3-acetic acid and brassinosteroid on ethylene biosynthesis in etiolated mung bean hypocotyl segments. *Journal of Plant Physiology*, 133: 430-435.
- Blake, J. (1990). Coconut (*Cocos nucifera* L.): Micropropagation. In: *Biotechnology in Agriculture and Forestry. Legumes and Oilseed Crops I*, (Bajaj, Y.P.S., Ed.). Springer-Verlag, Berlin, Germany, 10: 538-554.
- Buffard-Morel, J., J-L. Verdeil and C. Pannetier. 1992. Embryogénèse somatique du cocotier (*Cocos nucifera* L.) à partir de tissus foliaires: étude histologique. *Canadian Journal of Botany*, 70: 735-741.
- Chan, J.L., L. Sáenz, C. Talavera, R. Hornung, M. Robert and C. Oropeza. 1998. Regeneration of coconut (*Cocos nucifera* L.) from plumule explants through somatic embryogenesis. *Plant Cell Reports*, 17: 512-521.
- Eden-Green, S. 1995. A brief history of lethal yellowing research. In: *Lethal Yellowing Research and Practical Aspects*. (Oropeza, C., Howard, F.W. and Ashburner, G.R., Eds.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp 17-33.
- Eeuwens, C. J. 1976. Mineral requirements for growth and callus initiation of tissue explants excised from mature coconut palms (*Cocos nucifera* L.) and cultured *in vitro*. *Physiologia Plantarum*, 36: 23-28.
- Fernando, S.C. and C.K.A. Gamage. 2000. Abscisic acid induced somatic embryogenesis in immature embryo explant of coconut (*Cocos nucifera* L.) *Plant Science*, 151: 193-198.
- Gaudinová, H., H. Süssenbeková, M. V. Kamínek, J. Eder and L. Kohout. 1995. Different effects of two brassinosteroids on growth, auxin and cytokinin content in tobacco callus tissue. *Plant Growth Regulation*, 17: 121-126.
- George, E.F. 1993. Plant growth regulators. In: *Plant Propagation by Tissue Culture (part 1) The Technology* (George, E. F., Ed.). Exegetics Ltd., pp 420-479.
- Hanold, D. and J. W. Randles. 1991. Cadang-cadang disease and its viroid agent. *Plant Disease*, 75: 33-335.
- Hornung, R. 1995. Micropropagation of *Cocos nucifera* L. from plumular tissue excised from mature zygotic embryos. *Plantations, Recherche, Développement*, 2: 38-41.
- Jang, J-C., S. Fujioka, M. Tasaka, H. Seto, S. Takatsuto, A. Ishii, M. Aida, S. Yoshida, and J. Sheen. 2000. A critical role of sterols in embryogenic patterning and meristem programming revealed by the *fackel* mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Genes and Development*, 14: 1485-1497.
- Katsumi, M. (1985). Interaction of a brassinosteroid with IAA and GA₃ in the elongation of cucumbers hypocotyl sections. *Plant Cell Physiology*, 26: 615-625.

- MagnaVal, C. 1995. Etude des facteurs nutritifs intervenant lors de l'initiation de l'embryogenese somatique du cocotier (*Cocos nucifera* L.) en milieu gelose et mise au point des suspensions embryogenes. Ph D. Diss. Universite P. Et M. Curie (Paris VI), Paris, France.
- Mandava, N.B. 1988. Plant growth-promoting brassinosteroids. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 39: 23-52.
- Omar, M. S., M. K. Hameed, and M.S. Rawi, 1992. Micropropagation of date palm (*Phoenix dactylifera* L.). In: Biotechnology in Agriculture and Forestry. High-Tech and Micropropagation II, (Bajaj, Y.P.S., Ed.). Springer-Verlag Berlin Hidelberg, 18: 471-492.
- Ponsamuel, J., N. P. Samson, P. S.Geneshan, V. Sathyaprakash and G. C. Abraham 1996. Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature cotyledonary tissues of cultivated tea (*Camellia sinensis* (L). O. Kuntze). Plant Cell Reports, 15: 210-214.
- Ponsamuel, J., D. V. Huhman, B. G. Cassidy, and D. Post-Beittenmiller. 1998. *In vitro* regeneration via caulogenesis and brassin-induced shoot conversion of dormant buds from plumular explants of peanut (*Arachis hypogaea* L.) C.V. Okrun. Plant Cell Reports, Vol. 17, 373-378.
- Sáenz, L.A. 2000. Development of protocols for the clonal propagation of *Cocos nucifera* L. utilizing plumules as explants. Ph D. Diss., Centro de Investigación Científica de Yucatán, México.
- Sáenz, L., J. L.Chan, R. Souza, R. Hornung, E. Rillo, J. L. Verdeil and C. Oropeza, 1999. Somatic embryogenesis and regeneration in coconut from plumular explants. In: Current Advances in Coconut Biotechnology, (Oropeza, C., Verdeil, J-L., Ashburner, G.R., Cardeña, R. and Santamaría, J., Eds). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp. 309-319.
- Samosir, Y. M. S., I. D. Godwin and S. W. Adkins, 1999. The use of osmotically active agents and abscisic acid can optimize the maturation of coconut (*Cocos nucifera* L.) somatic embryos. In: Current Advances in Coconut Biotechnology (Oropeza, C., Verdeil, J.L., Ashburner, G.R., Cardeña, R. and Santamaría, J.M., Eds.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp 341-354.
- Schwendiman, J., C. Pannetier, and N. Michaux-Ferriere 1990. Histology of embryogenic formation during *in vitro* culture of oil palm *Elaeis guineensis* Jacq. Oléagineux, 45: 409-415.
- Teixeira, J.B., Söndahl, M.R., T. Nakamura, and E.G. Kirby. 1995. Establishment of oil palm cell suspensions and plant regeneration. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 40: 105-111.

- Touchet, B., D. E. Duval, Y. and C. Pannetier. 1991. Plant regeneration from embryogenic suspension cultures of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). *Plant Cell Reports*, 10: 529-532.
- Verdeil, J-L., C. HUET, F. Grosdemange, and J. Buffard–Morel. 1994. Plant regeneration from cultured immature inflorescence of coconut (*Cocos nucifera* L.): evidence for somatic embryogenesis. *Plant Cell Reports*, 13: 218-221.
- Zurek, M. D., D. L. Rayle, T. C. Mc Morris and S. D. Clouse 1994. Investigation of gene expression, growth kinetics, and wall extensibility during Brassinosteroid-regulated stem elongation. *Plant Physiology*, 104: 505-513.

CAPITULO 7

EFFECTO DE LA SUBDIVISION DE CALLOS EMBRIOGENICOS EN LA FORMACION DE EMBRIONES SOMATICOS DE COCOTERO (*Cocos nucifera* L.)

7.1 INTRODUCCION

El cocotero, es una especie considerada como recalcitrante debido a que presenta una baja capacidad embriogénica atribuida a diversas causas como: intenso necrosamiento del tejido, heterogeneidad en la respuesta, fuerte capacidad de enraizamiento y con alta formación de tejido tipo haustorial (Verdeil y Buffard Morel, 1995). La formación de embriones somáticos (ES) a partir de callos embriogénicos de cocotero generalmente ocurre cuando este callo es cultivado íntegramente sin sufrir fragmentación o división de este. Los ES por lo general crecen fusionados y su desarrollo no es sincronizado, lo que limita la individualización de estos así como su desarrollo independiente hasta la formación de una planta completa.

Por otra parte, una práctica común en algunas especies como *Begonia*, *Saintpaulia* y *Streptocarpus* es la realización de heridas en la superficie de las hojas o estas son cortadas en pequeñas piezas, conduciendo a un significativo incremento de brotes adventicios (George, 1993). Los embriones cigóticos de zanahoria inducen a la formación de ES cuando en estos se realiza una herida y son cultivados en un medio libre de fitohormonas (Smith y Krikorian, 1989). Una observación similar fue hecha para *Dysosma pleiantha* por Meng-Jin y Wei-Chin (1987). A partir de embriones cigóticos heridos fueron inducidos callos embriogénicos, mientras los embriones intactos no respondieron.

Es conocido que cuando un tejido es herido mecánicamente o este es sometido a varias clases de estrés se induce la formación de fitohormonas, destacando principalmente el ácido abscísico (Peña-Cortes *et al.*, 1989), ácido jasmonico (Farmer y Ryan, 1990) y etileno (O'Donell *et al.*, 1998). En condiciones *in vitro* el etileno se produce en mayor cantidad como resultado de un subcultivo (Kumar *et al.*, 1998), por lo que esta fitohormona puede tener un efecto favorable o negativo en el crecimiento y diferenciación de los cultivos *in vitro* (Hatanaka *et al.*, 1995).

En el protocolo de embriogénesis somática a partir de plúmula es de uso común el 2, 4-diclorofenoxiacético (2,4-D) en fase de inducción de callo embriogénico y en la formación de embriones somáticos (100 veces menor cantidad), donde además es incluida la bencil aminopurina (BAP) (Chan *et al.*, 1998). No obstante, probablemente la utilización del 2,4-D en esta segunda fase no es necesaria, dado que pudiera estar ejerciendo un efecto negativo en la embriogénesis somática (ESo). En zanahoria por ejemplo, el proceso de ESo se inhibe cuando se adiciona 2,4-D después del estado de corazón y los embriones somáticos se deforman. Se postula que la adición de la auxina

al medio de cultivo interrumpe el gradiente endógena adquirido en el embrión y por dicha razón se inhibe su desarrollo (Kawahara y Komamine, 1995). La regeneración *in vitro* de cocotero es un proceso relativamente largo, donde además la producción de ES es baja, por lo anterior se planteo como objetivo del presente trabajo evaluar el efecto de la subdivisión de callos embriogénicos en la formación de embriones somáticos, así como evaluar el efecto de la exclusión o aplicación exógena de las fitohormonas 2,4-D y la BAP y por último realizar una evaluación exploratoria del comportamiento del etileno en los cultivos a los 30 días de cultivo.

7.2 MATERIALES Y METODOS

En esta sección se presentan materiales y métodos exclusivos para este capítulo, los aspectos generales fueron presentados en el capítulo 3.

7.2.1 Material vegetal. En este estudio se utilizaron callos embriogénicos de tres meses de cultivo procedentes de condiciones I de material de cocotero Enano Malayo Verde (EMV), cultivados previamente en un medio Y3 (Eeuwens, 1976) adicionado con 0.55 mM de 2,4-D.

7.2.2 Condiciones de cultivo. Se utilizaron 2 condiciones de cultivo: (a) cultivo de callos embriogénicos (CE) con un peso de entre 0.1 y 0.14 g. (b) De los CE se realizaron subdivisiones de callo embriogénico (SCE) con ayuda de un bisturí con un peso similar al mencionado. Inicialmente se estableció un experimento considerando 4 tratamientos: 1) Cultivo de CE (Control), 2) el CE fue subdividido en 2 secciones (SCE) y cultivadas en un frasco de cultivo, 3) el CE fue subdividido en 4 SCE y cultivadas en un frasco de cultivo y 4) el CE fue subdividido en 8 SCE y cultivadas en un frasco de cultivo. Se utilizaron tres repeticiones por tratamiento, donde cada repetición se formó con 5 CE. Este experimento se desarrollo en etapa II, utilizando un medio II: Y3 con 2,4-D (6 μM) y BAP (300 μM), así como condiciones II: fotoperíodo de 16 h de iluminación (45-60 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ PPFd)/ 8 h de oscuridad a $27 \pm 2^{\circ}\text{C}$ y subcultivo cada dos meses.

En función de los resultados obtenidos se consideró establecer un segundo experimento donde el CE solamente fue subdividido en 4 SCE y cultivadas en un frasco de cultivo, incluyendo un control (CE). Este se estableció con 2 repeticiones y cada una con 40 CE, estos fueron cultivados en etapa II en un medio de acuerdo a Chan *et al.*, (1998) conteniendo las fitohormonas 2,4-D (6 μM) y BAP (300 μM) y sin contener estas. Las variables a medir fueron: (a) número de embriones somáticos, (b) peso fresco y (c) evaluación exploratoria del etileno en los recipientes de cultivo a los 30 días de cultivo.

7.2.3 Análisis estadístico. Los resultados de las variables se sometieron a Análisis de Varianza (ANAVA) y a la prueba de comparación de medias conocida como Diferencia Mínima Significativa ($P < 0.05$), para lo cual se utilizó el paquete de diseños experimentales FEUANL, versión 2.5 (Olivares, 1994).

7.2.4 Cuantificación del gas etileno. Desde el inicio del experimento con CE y SCE se escogieron 4 frascos por tratamiento al azar, estos frascos tipo Gerber fueron sellados con tapa metálica y en la superficie externa de esta fue adherida una capa de silicón. La concentración del etileno en los recipientes fue medido únicamente a los 30 días de cultivo. Para este propósito se realizó una perforación para extraer 2 ml del contenido de la atmósfera de cada recipiente con ayuda de una jeringa y fue analizado por cromatografía de gases.

7.2.5 Histología. El procedimiento histológico fue realizado de acuerdo a Buffard Morel *et al.*, (1992), con ligeras modificaciones. Las muestras de tejido fueron fijadas en paraformaldehído 4% en buffer fosfato (pH 7.2) por 24 hr bajo presión negativa. Las muestras fueron deshidratadas con etanol al 30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 95% y 100% por 60 minutos cada una. Posteriormente se realizó la impregnación con resina JB-4 (Poliscience, USA). De los tejidos impregnados en resina se hicieron cortes histológicos de 3 micras y fueron teñidos con PAS-Naphtol blue black.

7.3 RESULTADOS

7.3.1 Influencia del número de subdivisiones en la formación de embriones somáticos. En todos los tratamientos establecidos se observó que el mayor número de ES se presentó a los 15 días de cultivo (Figura 7.1), sobresaliendo el tratamiento con cuatro subdivisiones de callo embriogénico (SCE)/frasco con 15.5 ES tipo torpedo, mientras que con 2 y 6 SCE el número de ES fue de alrededor de 8. El número de ES en SCE fue mayor a los observados en el tratamiento control, en el cual solamente se presentaron 4.6 ES del tipo globular principalmente.

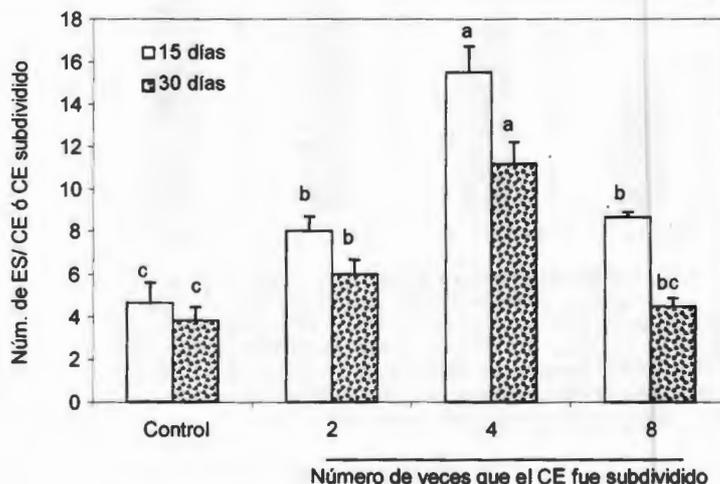


Figura 7.1. Número de embriones somáticos observados en función del número de veces que el callo embriogénico fue subdividido (n=3, donde cada repetición se estableció con 5 callos embriogénicos. Los valores con la misma letra son iguales estadísticamente, DMS 0.05).

En todos los tratamientos se observó a los 30 días una pérdida de ES ocasionado principalmente por una fuerte desdiferenciación del tejido embriónico, sin embargo, durante este período de cultivo, se continuó observando un efecto favorable cuando el CE es subdividido respecto al control, sobresaliendo con 11 ES el tratamiento con 4 SCE por frasco, mientras que el control solamente presentó 3.8 ES por CE.

7.3.2 Cultivo de callos embriogénicos y subdivisión de callos embriogénicos en un medio provisto y desprovisto con las fitohormonas 2,4-D (6 μM) y BAP (300 μM).

7.3.2.1 Número de embriones somáticos. En cuanto al número de embriones somáticos (ES), los tratamientos con subdivisiones de callo embriogénico conteniendo hormonas (SCE +H) y subdivisiones de callo embriogénico sin contener hormonas (SCE -H) presentaron mayor número de ES en comparación a los controles (CE +H y CE -H). Sin embargo es claro que cuando son cultivados los CE y las SCE en un medio desprovisto de fitohormonas fue mayor el número de ES (Figura 7.2).

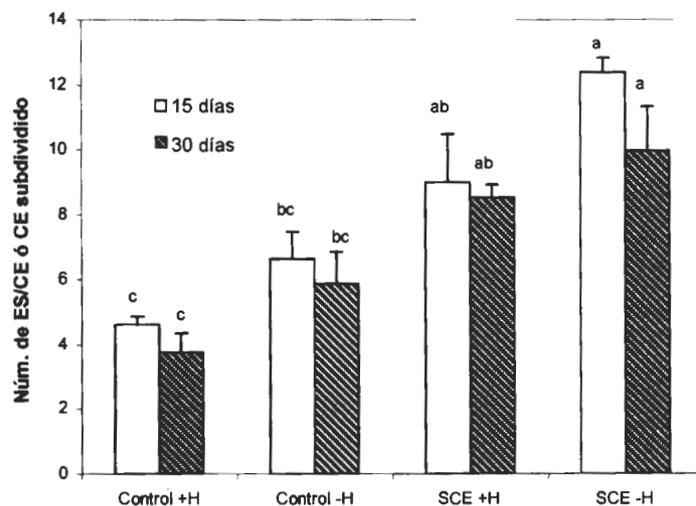


Figura 7.2. Número de embriones somáticos por callo embriogénico a los 15 y 30 días en cultivo en condiciones II en los tratamientos con cultivo de callos embriogénicos en medio de cultivo con fitohormonas (CE +H) y sin estas (CE -H) y subdivisiones de callo embriogénico (SCE) en medio conteniendo fitohormonas (+H) y sin fitohormonas (-H) (n=2, cada repetición estuvo formada con 40 CE, los valores con la misma letra son iguales estadísticamente, DMS 0.05).

Durante los 15 días de cultivo se presentó mayor número de ES en todos los tratamientos, sobresaliendo el tratamiento con SCE -H con 12.37 ES que en su mayoría fueron del tipo torpedo (EST), con 9 ES en el tratamiento con SCE +H y 6.5 ES

en el tratamiento control -H, mientras que el control incluyendo fitohormonas (CE +H) se presentaron solamente 4.6 ES del tipo globular y poco frecuentes los EST. A los 30 días se observó una disminución de ES en todos los tratamientos pero sobresaliendo el tratamiento con SCE -H con 9.9 ES, superior al control (CE +H) con 3.7 ES (Figura 7.2).

7.3.3 Evaluación histológica y morfológica de los callos embriogénicos y subdivisiones.

7.3.3.1 Observaciones a los 15 días de cultivo. Los callos embriogénicos presentaron sobre su superficie embriones somáticos del tipo globular (solo visibles bajo microscópico estereoscópico) y en los cortes histológicos se observaron embriones somáticos en formación y del tipo globular (esg) sin presentarse el meristemo apical, pero si una zona meristemática (zm) donde se origina la raíz (Figura 7.3 A, B y C). En cuanto a las subdivisiones de callo embriogénico (SCE) se observaron secciones con ES con un estado de desarrollo sincronizado con ES tipo torpedo (est) como se puede observar en la Figura 7.3D, estos ES fueron visibles a simple vista, sin embargo los cortes histológicos mostraron formación de ES fusionados en desarrollo y también del tipo globular (Figuras 7.3E). Durante este periodo de cultivo no fue visible el meristemo apical en los cortes histológicos de los ES originados de las SCE.

7.3.3.2 Observaciones a los 30 días de cultivo. Durante este periodo de cultivo los CE se tomaron de color verde claro (Figura 7.3F) y no se observaron embriones tipo torpedo pero si un crecimiento de tejido haustorial. En los cortes histológicos se observaron pocos ES globulares (Figura 3G) y tejido desdiferenciado conocido generalmente como haustorio con ES fusionados y poco definidos. Además es importante mencionar que fue muy raro encontrar embriones somáticos tipo torpedo. En cuanto a las SCE, estas presentaron grupos de ES tipo torpedo, con aparente buena conformación (Figura 7.3H) con color blanco y en algunos casos con sistema radicular (r). En algunos casos se encontraron ES con poro germinativo (Figura 7.3I y J) observándose un coleóptilo (c) protegiendo al meristemo apical (ma). En la mayor parte, los ES se observaron bien definidos sin observarse el meristemo apical (Figuras 7.3K), solamente fue posible observar una zona meristemática donde se origina la raíz. Además, los cortes histológicos también mostraron grupos de ES fusionados (Figura 7.3L) con una capa de células bien definida formando protodermis en la periferia, zona donde se observó tejido haustorial por lo que estas células localizadas en esta zona dan origen a este tipo de tejido.

7.3.4 Peso fresco. Durante este periodo de cultivo se observaron diferencias entre tratamientos y tipo de explante utilizado. Los tratamiento con SCE con +H y -H presentaron mayor peso fresco que los tratamientos con CE +H y -H (Figura 7.4). Se observó un incremento en 10 veces su peso fresco inicial en el tratamiento con SCE -H y un incremento de 2.36 veces respecto al control (CE +H).

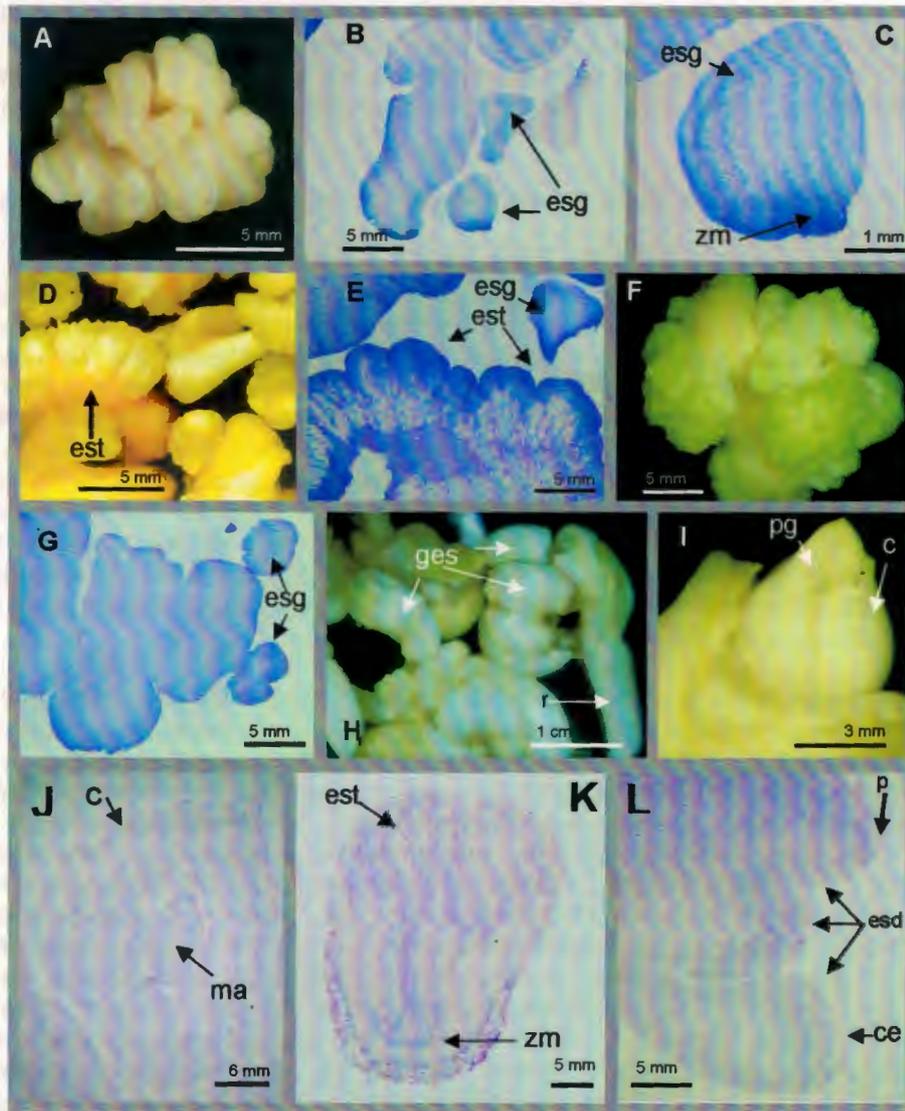


Figura 7.3. Formación de embriones somáticos (ES) a los 15 y 30 días de cultivo en callos embriogénicos (CE) y en subdivisiones de callos embriogénicos (SCE). En A se presenta un CE a los 15 días de cultivo e histología del CE en B, observándose ES globulares (esg) y en C una zona meristémica (zm) de un ES donde se origina la raíz. En D se muestra un grupo de ES torpedo (est) originados de SCE a los 15 días de cultivo, los cuales se observan sincronizados y en el corte histológico se aprecian ES tipo torpedo (est) elongados y fusionados (E) así como ES globulares (esg) observados en menor cantidad. En F se muestra el CE a los 30 días de cultivo y en G el corte histológico mostrando ES globulares (esg). En H se presentan grupos de ES tipo torpedo en SCE a los 30 días de cultivo. En algunos casos fue visible la raíz (r), un poro germinativo (pg) y coleóptilo (c) [I]. En J se observa un corte histológico de un ES con meristemo apical (ma). En la Figura K se muestra un corte histológico de un ES tipo torpedo (est) a los 30 días, observándose solamente la zm donde se origina la raíz. Por último en la L se presenta un grupo de ES en dediferenciación (esd) y una zona de células formando protodermis (p) en la superficie de los ES.

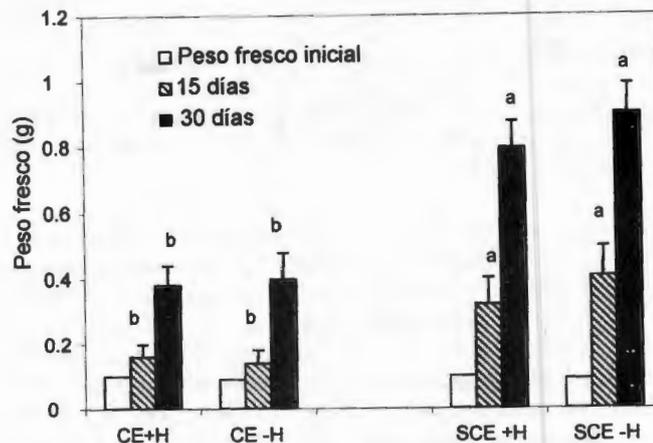


Figura 7.4. Peso fresco en los tratamientos con cultivo de callos embriogénicos (CE) y subdivisiones de callo embriogénico (SCE) en medio conteniendo fitohormonas (+H) y sin fitohormonas (-H) a los 30 días de cultivo (n=4, cada repetición se formó con 4 CE y/o CE subdividido, los valores con la misma letra son iguales estadísticamente, DMS 0.05).

7.3.5 Concentración de etileno en recipientes conteniendo callos embriogénicos (CE) y subdivisiones de callos embriogénicos (SCE). Es evidente la presencia del etileno en todos los cultivos, sin embargo sobresalen los cultivos con SCE con +H (1.67 ppm) y SCE -H (1.9 ppm). Este último tratamiento representa un 61% mayor con respecto a la concentración del tratamiento con CE +H y 54% para el tratamiento con CE -H. Respecto al contenedor con medio de cultivo sin contener explantes presentó una cantidad de 0.05 ppm, la cual es una concentración relativamente baja al compararse con CE y SCE incluyendo o excluyendo las fitohormonas.

7.4 DISCUSION

De acuerdo al protocolo de Chan *et al.*, (1998) la formación de embriones somáticos generados a partir de plúmula se inicia con la formación de callos iniciales que conducen a la formación de callos embriogénicos, estos CE son cultivados íntegramente sin sufrir fragmentación o división posterior. Los ES crecen fusionados y su desarrollo no es sincronizado, lo cual limita la individualización de estos así como su desarrollo independiente hasta la formación de una planta completa, por lo que se decidió evaluar la posibilidad de que al subdividir callos embriogénicos (CE) se pudiera promover la formación de embriones somáticos (ES) tomando en cuenta el aumento de la superficie en contacto con el medio de cultivo.

Los resultados permitieron observar que cuando un callo embriogénico es subdividido en 4 partes, el número de ES es favorecido y se incrementa en 3.36 veces con respecto al control en los primeros 15 días de cultivo (Figura 7.1) y cuando este ensayo fue repetido dos veces con mayor número de repeticiones, la respuesta fue similar aunque en una cantidad menor, obteniendo 2.7 veces más ES y 2.36 veces su peso fresco en SCE -H con respecto al control (CE +H) durante los primeros 15 días en condiciones II (Figuras 7.2 y 7.4).

Se ha propuesto que la inducción de heridas puede incrementar principalmente la formación de fitohormonas, mayor accesibilidad de nutrimentos así como la promoción de la división celular (Mariotti y Arcioni, 1983; Park y Son, 1988; Ambrozic-Dolinsek, *et al.*, 2001). Es importante mencionar que los CE así como las SCE mostraron diferencias en la formación de ES. Los CE hasta los 30 días solamente presentaron ES tipo globular y muy esporádicos los ES tipo torpedo, mientras que en SCE a los 15 días así como a los 30 días se observaron ES tipo torpedo y con mayor sincronización entre ellos, además se observó un desarrollo y diferenciación más acelerado con respecto al CE. Las SCE también estimularon la obtención de mayor ganancia en peso fresco, esto podría ser debido a que una herida eventualmente conduce a estimular la división celular (Mariotti y Arcioni, 1983) y mayor síntesis endógena de fitohormonas en el explante (Park y Son, 1988).

Se ha reportado que la inducción de heridas en un tejido vegetal pueden estimular la organogénesis en condiciones *in vitro* (Ambrozic-Dolinsek, *et al.*, 2001), por ejemplo cuando las hojas de *Platycerium bifurcatum* son heridas se incrementa significativamente el potencial de formación de gametofitos en comparación con hojas intactas. Los gametofitos se originaron de áreas entre las heridas (Ambrozic-Dolinsek, *et al.*, 2001). Los autores citados mencionan que la síntesis o un cambio en el sitio de localización de síntesis de las fitohormonas dentro de la hoja herida podría contribuir a la inducción de los gametofitos.

Por otra parte en cotiledones de *Pyrus malus* que fueron previamente seccionados a la mitad, en la región del corte se formó callo que dio origen a múltiples brotes adventicios (Browning *et al.*, 1987), esto no ocurrió con los callos embriogénicos subdivididos de cocotero. En las partes del corte del callo embriogénico no se observaron formaciones de embriones somáticos, estos ES se formaron en la periferia de las subdivisiones de los callos embriogénicos, zonas donde se forman normalmente aun sin realizar subdivisiones.

El aumento de ES en SCE cultivado en medio sólido puede estar asociado a un mayor contacto con el medio de cultivo por lo que posiblemente exista una mayor entrada de nutrimentos a las subdivisiones del CE. En trébol (*Lotus corniculatus* L.) se ha reportado que cuando un callo embriogénico es homogeneizado (macerado) se incrementan los embriones globulares en comparación con callos no homogeneizados (Orshinsky *et al.*, 1983), indicando que este hecho podría explicarse por medio de un aumento del contacto de las células maceradas con el medio de cultivo.

Previamente a sido indicado que el cocotero es una especie recalcitrante debido a que presenta una baja capacidad embriogénica atribuida a diversas causas como: intenso necrosamiento del tejido, heterogeneidad en la respuesta, fuerte habilidad de enraizamiento y formación de tejido tipo haustorial (Verdeil y Buffard Morel, 1995). En este estudio se presentaron principalmente dos respuestas morfogénicas: 1) diferenciación de embriones somáticos durante los 15 a 30 días y 2) desdiferenciación de ES después de los 30 días con crecimiento de callo tipo haustorial en la periferia de los ES formados por lo que esta desdiferenciación del CE ocasionó la disminución de ES.

Esta disminución de ES que ocurre después de 30 días de cultivo en callos embriogénicos así como en subdivisiones de callo embriogénico es debido a que se promueve una proliferación muy rápida de células en la superficie de los ES o del CE que los conduce a la formación de callo o tejido tipo haustorial. En los cortes histológicos realizados fue posible observar una capa de células formando protodermis bien definida en la periferia de los ES donde estos presentaban un ligero crecimiento de tejido tipo haustorial por lo que estas células localizadas en esta zona dan origen a este tipo de tejido (Figura 7.3 L).

Aunque fue posible observar ES aparentemente bien formados (SCE -H) a los 15 días de cultivo, en los cortes histológicos no se observó el meristemo apical (Figura 7.3K), solo en algunos casos los ES mostraron las partes características que forman un embrión como poro germinativo, coleóptilo y meristemo apical principalmente pero sólo después de los 30 días de cultivo (Figura 7.3J). En la actualidad se desconocen las causas que están influyendo en la fuerte heterogeneidad presentada en el desarrollo de los ES formados de cocotero así como el desarrollo anormal de estos. De acuerdo a Blake (1990), estas anomalías en el desarrollo de ES son atribuidas a diversos factores, pero probablemente son provocadas por niveles sub óptimos o supra óptimos de las auxinas y/o citocininas.

Indudablemente la formación del meristemo apical en un embrión somático es importante debido a que las células no diferenciadas contenidas en esta estructura son las responsables de la iniciación de órganos en las plantas superiores (Clark, *et al.*, 1997). La ausencia del meristemo apical en los ES formados esta probablemente asociado a cambios en el nivel de expresión de genes, por ejemplo se conoce que la expresión de los genes *cdc2* y *cdc2a* son un factor crítico en la regulación de la actividad meristemática y el establecimiento de la competencia proliferativa en *Arabidopsis thaliana* y pueden contribuir a la regulación temporal y espacial de la división celular en plantas (Martínez, *et al.*, 1992; Hemerly *et al.*, 1993).

Con respecto a la inclusión o exclusión de las fitohormonas en etapa II, los resultados muestran aparentemente que no es necesario incluir las fitohormonas 2,4-D (6 μM) y BAP (300 μM) durante los primeros 30 días de cultivo como es reportado por Chan *et al.*, (1998); sin embargo, Chan (Com. Personal) menciona que es más conveniente incluirlas debido a que su exclusión tiende a afectar el proceso de germinación.

Por otra parte, Adkins *et al.*, (1999) reportaron la acumulación de etileno en contenedores durante las etapas de formación de callo y formación de embriones somáticos de cocotero. Cuando adicionaron al medio de cultivo aminoetoxivinilglicina (AVG, 1.5 μM) un inhibidor de la síntesis del etileno, obtuvieron un incremento del 100% de la embriogénesis somática generada a partir de secciones de embriones cigóticos de cocotero y un incremento del 47% cuando aplicaron tiosulfato de plata (3 μM) el cual es un inhibidor de la acción fisiológica. La adición de compuestos que estimulan la producción de etileno como el ácido 1-amino-ciclopropano-1-carboxílico (ACC) en 0.5 mM disminuyó casi completamente la formación de embriones somáticos, por lo que concluyen que esta fitohormona esta involucrada en la inhibición de la embriogénesis somática en cocotero (Adkins *et al.*, 1999).

Aunque en este trabajo no se hicieron estudios sobre los contenidos de fitohormonas endógenas que se producen en respuesta a heridas, probablemente en callos embriogénicos y subdivisiones de callos embriogénicos de plúmula exista un efecto de la alteración de estas, lo cual este influyendo en la respuesta de formación de ES. Con base a la cuantificación del etileno en contenedores con CE y SCE se puede sugerir que esta fitohormona influye en el proceso morfogénico debido a que en la evaluación exploratoria realizada se encontró la presencia de esta fitohormona en un 50% mayor en SCE por lo que podría ser uno de los factores que inducen la formación y sincronización de los embriones somáticos en las SCE o también pueda provocar la desdiferenciación de embriones somáticos en SCE y CE después de los 30 días.

La participación del etileno en la formación de ES a partir de SCE o CE generados de explantes de plúmula puede ser positiva o negativa, si es positiva es necesario promoverla con la adición al medio de cultivo del ácido 1-amino-ciclopropano-1-carboxílico (ACC) el cual estimula la producción de etileno y si es negativa es necesario incluir al medio de cultivo algún inhibidor de la acción del etileno como por ejemplo el tiosulfato de plata (AgS_2O_3), la inhibición de su biosíntesis por iones de cobalto o la adición de AVG en condiciones de inducción de callos embriogénicos (etapa I) y durante la formación de los embriones somáticos (etapa II) con cultivo de CE y SCE, realizando además mediciones de etileno a lo largo del cultivo para determinar el período donde inicia su acumulación en los recipientes y poder correlacionar su concentración con su influencia hacia la promoción o desdiferenciación de los ES generados.

Otra fitohormona que probablemente este interviniendo de alguna forma en la estimulación a la formación de ES así como en el incremento del peso fresco es el ácido jasmonico, se conoce que este se forma en tejidos heridos y promueve la división celular y diferenciación (Ryan, 1990), por lo cual sería importante realizar determinaciones de esta fitohormona así como incluirla al medio de cultivo para observar si en su presencia favorece la formación de ES.

7.5 BIBLIOGRAFIA

- Adkins, S.W., Y. M. S. Samoir and I. D. Godwin. 1999. Control of environmental conditions and the use of polyamines can optimize the conditions for the initiation and proliferation of coconut (*Cocos nucifera* L.) somatic embryos. In: Oropeza C., Verdeil J.L, Ashburner, G.R., Cardefia R. and Santamaría J.M. (Eds.) Current plant science ad biotechnology in agriculture. Current Advances in Coconut Biotechnology, pp. 321-340.
- Ambrozic-Dolinsek, J., M. Camloh, B. Bohanec and J. Zel. 2001. Apospory in leaf culture of staghorn fern (*Platycerium bifurcatum*). Plant Cell Reports (on line), file://A:\Plant%20Cell%20Rep%20-%20Full%20Text%20DOI%2010_1007-s00299-001-...
- Blake, J. 1990. Coconut (*Cocos nucifera* L.): Micropropagation. In : Y. P. S Bajaj (Ed.) Biotechnology in Agriculture and Forestry. Springer-Verlag Berlin Heidelberg Vol. 10, pp. 538-554.
- Browning, G. V. Ognjanov, A. J. Passey and D. J. James. 1987. Multiple Shoot and root regeneration from pear embryo cotyledon explants *in vitro*. Journal of Horticultural Science, 62: 305-311.
- Buffard-Morel J., J-L. Verdeil, C. Pannetier. 1992. Embryogenèse somatique du cocotier (*Cocos nucifera* L.) à partir de tissus foliaires: étude histologique. Canadian Journal of Botany, 70: 735-741.
- Clark, E. S., Robert W. Williams, and E. M. Meyerowitz. 1997. The *CLAVATA1* gene encodes a putative receptor kinase that controls shoot and floral meristem size in Arabidopsis. Cell, 89: 575-585.
- Chan, L. J., L. Saénz, C. Talavera, R. Hornung, M. Robert and C. Oropeza. 1998. Regeneration of coconut (*Cocos nucifera* L.) from plumule explants through somatic embryogenesis. Plant Cell Reports, 17:515-521.
- Eeuwens, C. J. 1976. Mineral requirements for growth and callus initiation of tissue explants excised from mature coconut (*Cocos nucifera*) and date (*Phoenix dactylifera*) palms cultured *in vitro*. Physiologia Plantarum, 36: 23-28.
- Farmer, E. E. and C. A. Ryan. 1990. Interplant communication: airborne methyl jasmonate induces synthesis of proteinase inhibitors in plant leaves. Proceedings of the National Academy Sciences, 87: 7713-7716.
- George, F.E. 1993. Plant growth regulators. Micropropagation in practice. In: Edwin George F. (Ed) Plant Propagation by Tissue Culture (part 2) in practice, pp. 834-1122.

- Hatanaka, T., E. Sawabe; T. Azuma, N. Uchida and T. Yasuda. 1995. The role of ethylene in somatic embryogenesis from leaf discs of *Coffea canephora*. *Plant Science*, 107: 199-204.
- Hemerly, A.S., P. Ferreira, J. de Almeida Engler, M. Van Montagu, G. Engler and D. Inzé. 1993. *cdc2a* expression in *Arabidopsis* is linked with competence for cell division. *Plant Cell*, 5: 1711-1723.
- Kawahara, R. and A. Komamine. 1995. Molecular basis of somatic embryogenesis. In: In: YPS Bajaj (Ed) *Biotechnology in agriculture and forestry*, Vol. 30, *Somatic embryogenesis and synthetic seed I*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, Alemania pp. 30-39.
- Kumar, P. P., P. Lakshmanan and T. A. Thorpe. 1998. Regulation of morphogenesis in plant tissue culture by ethylene. *In vitro Cellular Developmental Biology -Plant.*, 39: 94-103.
- Marriotti, D. and S. Arcioni. 1983. *Coronilla varia* L. (Crown vetch): plant regeneration through somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2: 103-110.
- Martinez, C. M., J. Jan-Elo, M. A. Lawton, C. J. Lamb and P. W. Doerner. 1992. Spatial pattern of *cdc2* expression in relation to meristem activity and cell proliferation during plant development. *Proceeding of the National Academy Sciences*, 89: 7360-7364.
- Meng-Jin, C. and C. Wei-Chin. 1987. Somatic embryogenesis and plant regeneration in callus culture derived from immature seeds and mature zygotic embryos of *Dyosma pleiantha* (Hance) Woodson. *Plant Cell Reports*, 6: 484-485.
- Olivares, S. E. 1994. Paquete de diseños experimentales FEUANL. Versión 2.5. Facultad de Agronomía UANL. Marín, Nuevo León, México.
- Park, Y. G. and S. H. Son. 1988. *In vitro* organogenesis and somatic embryogenesis from punctured leaf of *Populus nigra* x *P. maximowiczii*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 15: 95-105.
- Peña-Cortes, H., J. Sanchez-Serrano, R. Mertens, , L. Willmitzer, and S. Prats. 1989. Abscisic acid is involved in the wound-induced expression of the proteinase inhibitor II gene in potato and tomato. *Proceeding National Academy Sciences of the United States*, 86: 9851-9855.
- Ryan, C.A. 1990. Protease inhibitors in plants: Genes for improving defences against insects and pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 28: 425-499

- O'Donnell, P. J., M. R. Truesdale, C. M. Calvert, A. Dorans, M. R. Roberts and D. J. Bowles. 1998. A novel tomato gene that rapidly responds to wound- and pathogen-related signals. *The Plant Journal*, 14: 137-142.
- Orshinsky, B.R., E. B. Swanson and D. T. Tomes. 1983. Enhanced shoot regeneration from homogenized callus cultures of birdsfoot trefoil (*Lotus corniculatus* L.). *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 2: 341-347.
- Smith, D. L. and A. D. Krikorian. 1989. Release of somatic embryogenic potential from excised zygotic embryos of carrot and maintenance of polyembryonic cultures in hormone-free medium. *Plant Science* 58: 1832-1843.
- Verdeil, J-L., and J. Buffar – Morel. 1995. Somatic embryogenesis in coconut (*Cocos nucifera* L.): En: YPS Bajaj (Ed) *Biotechnology in agriculture and forestry*, Vol. 30, *Somatic embryogenesis and synthetic seed I*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, Alemania pp. 299-317.

CAPITULO 8

EFFECTO DEL ACIDO ABCISICO Y POLIETILENGLICOL EN LA FORMACION DE EMBRIONES SOMATICOS EN CALLOS EMBRIOGENICOS DE PLUMULA DE COCOTERO

8.1 INTRODUCCION

El ácido abscísico (ABA) esta involucrado en varios procesos fisiológicos tales como: crecimiento de las plantas, en el desarrollo de embriones, incluyendo su maduración, y la maduración en general de las semillas (Dunstan *et al.*, 1998). Esta fitohormona esta asociada con la promoción de la síntesis de proteínas de almacenamiento, la inhibición de la germinación precoz, tolerancia a la deshidratación, supresión de la movilización de reservas e inducción de la dormancia (Gaspar *et al.*, 1996).

En condiciones *in vitro*, la maduración de embriones somáticos (ES) en forma sincrónica se puede lograr por adición de ABA (Ryan, 1999), ó adicionando sustancias con actividad osmótica como la sacarosa, trehalosa, manitol y polietilenglicol (PEG), las que pueden estimular la síntesis del ABA dentro del embrión (McKersie *et al.*, 1989) presumiblemente a través de causar un estrés hídrico (Krizeck, 1985). La promoción de la maduración de los ES puede favorecer la eficiencia de este proceso al aumentar el número de embriones formados adecuadamente (Bomman, 1993). Por otro lado, el ABA también juega un papel muy importante en la inducción de la tolerancia a la desecación en los embriones somáticos, este estado permite mejorar la calidad y conversión de los embriones somáticos a plantas (Senaratna *et al.*, 1989).

Por lo tanto, el ABA y los agentes osmóticos han sido utilizados en estudios para mejorar protocolos de micropropagación via embriogénesis somática en diferentes especies. Por ejemplo, en *Hevea brasiliensis* una concentración de 10^{-5} M, permitió que se formaran 2,100 embriones somáticos cuando se cultivaron masas celulares durante 2 meses en presencia de esta fitohormona, mientras que el control solamente presentó alrededor de 100 embriones somáticos (Veisseire *et al.*, 1994). En *Ipomoea batatas* Lam., el ABA incrementó el número total de embriones somáticos de 13.4 para el control a 27.5 y 33.3 con 0.1 y 1.0 μ M respectivamente, además favoreció el desarrollo sincronizado de los ES (Torres *et al.*, 2001).

En el caso de cocotero, Samosir *et al.*, (1999) reportaron la evaluación del uso de ABA/PEG para mejorar la sincronización y el número de embriones somáticos. Encontraron que la combinación con 45 μ M ABA y 30 g L^{-1} de PEG (peso molecular 3,350) produjo mayor desarrollo sincronizado y número de brotes que el control, además esta combinación les permitió disminuir el crecimiento de callos no embriogénicos y de tejido tipo haustorial. Después de doce semanas en medio de germinación se obtuvieron más brotes que en otros tratamientos. En un reporte más reciente, Fernando y Gamage (2000) mostraron un efecto favorable del ABA, obteniendo un 61.4% de embriogénesis somática, cuando aplicaron 5 μ M de ABA durante 5 semanas en callos nodulares de 2

meses de iniciados a partir de embriones cigóticos inmaduros de *Cocos nucifera*, y la regeneración de brotes fue del 11.4% pero con un desarrollo esporádico de plantas.

Finalmente, es importante tomar en cuenta ciertas consideraciones para el uso de ABA y de los agentes osmóticos. En diferentes especies se ha encontrado que su efecto óptimo dependerá del momento de ser aplicado. Por ejemplo, los embriones somáticos en zanahoria (*Daucus carota* L.) responden a esta fitohormona en el estado globular (Nickle y Yeung, 1994), mientras que en alfalfa el estado óptimo para su aplicación es al principio del estado cotiledonal (Senaratna *et al.*, 1989). En el caso de los agentes con actividad osmótica, un compuesto ideal no debe alterar directamente los procesos metabólicos y osmóticos celulares. Esto se puede lograr mediante el uso de compuestos poliméricos de cadena larga no iónica e inerte. Por ejemplo el PEG de peso molecular alto (más de 4000) es frecuentemente utilizado porque sus moléculas al ser de gran tamaño no cruzan la plasmalema y no penetran al simplasto, evitándose con ello problemas colaterales de toxicidad (Newton, *et al.*, 1990).

Los reportes previos permiten ver el potencial del uso de ABA sólo o en combinación con agentes osmóticos para mejorar la eficiencia de la embriogénesis somática en diferentes especies, incluyendo cocotero, pero no usando explantes de plúmula. Por lo tanto el objetivo del trabajo reportado en este capítulo fue evaluar el efecto del ABA en combinación con polietilenglicol (PEG) en la formación de embriones somáticos a partir de callos embriogénicos originados de explantes de plúmula de cocotero.

8.2 MATERIALES Y METODOS

En esta sección se presentan materiales y métodos exclusivos para este capítulo, los aspectos generales son presentados en el capítulo 3.

8.2.1 Material vegetal y condiciones de cultivo. Para el desarrollo de este trabajo se colectaron nueces de cocotero Enano Malayo Verde (EMV) en Dzidzantun, Yucatán durante el mes de octubre de 1999. Los embriones cigóticos fueron desinfectados bajo condiciones asépticas de acuerdo a Chan *et al.*, (1998). Las plúmulas fueron cultivadas en etapa I. Esta etapa comprende la fase de formación de callo o callo inicial y callo embriogénico. Durante esta etapa se utilizó el medio I, el cual consistió del medio de cultivo Y3 de acuerdo a Eeuwens (1976), adicionado con sacarosa (5%), gelrite (0.3 %), carbón activado (0.25%) y la fitohormona ácido diclorofenoxiacético (2, 4-D) 0.65 mM. El pH del medio fue ajustado a 5.75 antes de autoclavearse por 20 minutos a 120°C. Todos los explantes (plúmulas) fueron cultivados en frascos de vidrio de capacidad de 35 ml conteniendo 10 ml de medio de cultivo y se establecieron bajo condiciones I, estas condiciones consistieron en un período de oscuridad de 3 meses a $27 \pm 2^{\circ}\text{C}$ para inducir la formación de callo embriogénico (CE).

Posteriormente, los CE fueron subcultivados en etapa II, etapa en la cual se originan los embriones somáticos a partir de los callos embriogénicos. Los cultivos se establecieron en un medio II, consistiendo del medio básico Y3 antes mencionado con las fitohormonas bencil aminopurina (BAP) 300 μM y 2,4-D 6 μM . Las condiciones II consistieron en fotoperíodo de 16 h de iluminación (45-60 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ppfd)/ 8 h de

disminución del porcentaje, pero en el tratamiento 90 μM ABA + 15 gL^{-1} PEG permitió mantener 80%, contra 40% del control a los 210 días de cultivo (Cuadro 8.1 D).

Cuadro 8.1. Porcentaje de callos embriogénicos con embriones somáticos durante 210 días de cultivo en etapa II en presencia de (A) PEG en 0, 15, 30 y 60 gL^{-1} , en (B) 22.5 μM de ABA, (C) 45 μM de ABA y (D) 90 μM de ABA con diferentes combinaciones de PEG por 30 días, (n=3, donde cada repetición estuvo formada con 10 callos embriogénicos).

Tratamientos		Porcentaje de callos embriogénico con embriones somáticos/tratamiento					
ABA (μM)	PEG (gL^{-1})	Días de cultivo					
		0	30	60	90	150	210
(A)							
0	0	0	66.6 \pm 10.24	73.3 \pm 4.7	63 \pm 4.7	60 \pm 8.1	40 \pm 10.24
0	15	0	70 \pm 0	73.3 \pm 4.71	60 \pm 8.1	53.3 \pm 4.7	53.3 \pm 4.7
0	30	0	63.3 \pm 4.7	70 \pm 8.1	53.3 \pm 4.7	50 \pm 8.1	50 \pm 8.1
0	60	0	63.3 \pm 4.7	70 \pm 8.1	50 \pm 8.1	40.3 \pm 4.7	33.3 \pm 4.7
(B)							
0	0	0	66.6 \pm 10.24	73.3 \pm 4.7	63 \pm 4.7	60 \pm 8.1	40 \pm 10.24
22.5	0	0	90 \pm 8.1	100 \pm 0	93.3 \pm 4.7	60 \pm 8.1	53 \pm 10
22.5	15	0	66.6 \pm 9.4	100 \pm 0	83.3 \pm 10	70 \pm 10	63.3 \pm 12.4
22.5	30	0	73.3 \pm 4.7	90 \pm 8.1	66.6 \pm 12.4	63.3 \pm 12.4	53.3 \pm 12.4
22.5	60	0	56.6 \pm 12.4	90 \pm 8.1	63.3 \pm 12.4	53.3 \pm 12.4	26.6 \pm 4.7
(C)							
45	0	0	76.6 \pm 4.7	76.6 \pm 4.7	62 \pm 4.7	60 \pm 8.1	40 \pm 10.24

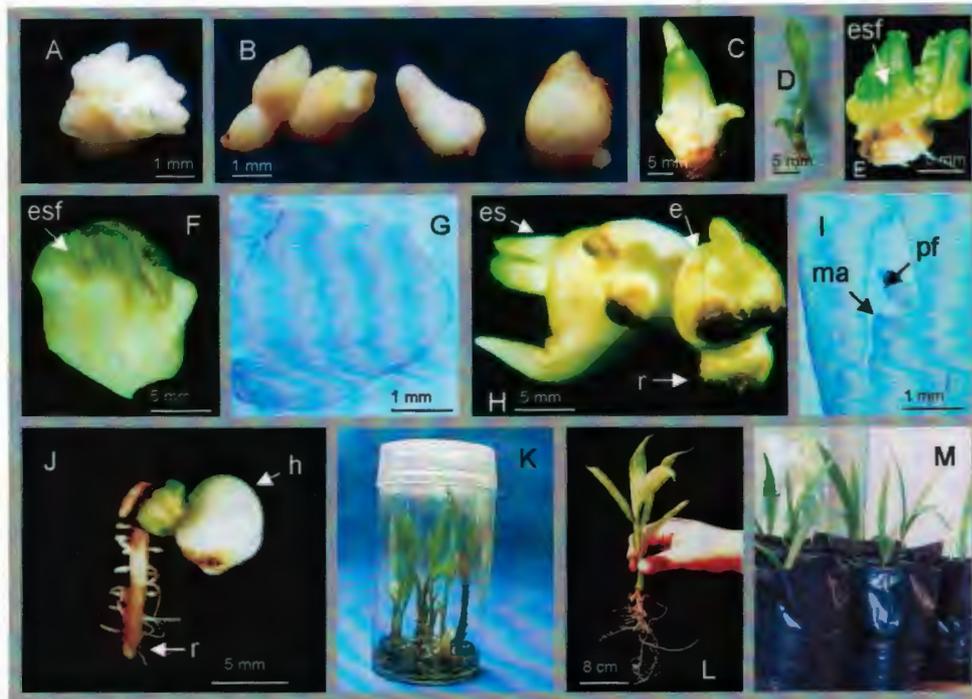


Figura 8.1. Embriones con diferente grado de diferenciación (A) Embriones globulares. (B) Embriones tipo torpedo, (C) Brote, (D) Plántula, (E) Grupo de embriones somáticos fusionados alargados y cortos (F) observados en el tratamiento control y en (G) Corte histológico de este tratamiento, donde se observa un grupo de embriones somáticos fusionados. En (H) tratamiento con ácido abscísico $90 \mu\text{M}$ con 15 gL^{-1} de polietilenglicol, donde se aprecian embriones somáticos diferenciados en fase de germinación (ES) con raíz (r) y en (I) corte histológico del mismo tratamiento observándose un embrión somático con sus primordios foliares (pf), meristemo apical (ma). En (J) se presenta un grupo de embriones somáticos con presencia de raíz (r) y tejido haustorial (h) en la superficie de los embriones somáticos. En (K) se muestran vitroplantas de cocotero después de 210 días de cultivo con ácido abscísico $90 \mu\text{M}$ con 15 gL^{-1} de polietilenglicol y planta retirada del medio de cultivo (L) para su establecimiento *ex vitro*. En (M) se presentan plantas adaptadas después de un año en condiciones de invernadero.

8.3.3. Número de embriones somáticos por callo embriogénico. Cuando los CE fueron cultivados con las diferentes concentraciones de PEG ($0, 15, 30$ y 60 gL^{-1}) la formación de ES globulares a los 30 días fue mayor en el control, sin observarse incrementos importantes en todo el período de cultivo. La mayor formación de ES globulares así como tipo torpedo fue encontrada en 15 gL^{-1} de PEG con 6 ES a los 150 días, valor similar al control y conforme se incrementó la concentración hasta 60 gL^{-1} de PEG el número de ES fue inferior al control (Cuadro 8.2A).

Cuadro 8.2. Número de embriones somáticos/callos embriogénicos durante 210 días de cultivo en presencia de: (A) PEG en 0, 15, 30 y 60 g L^{-1} , (B) 22.5 μM de ABA, (C) 45 μM de ABA y (D) 90 μM de ABA con diferentes combinaciones de PEG por 30 días, (n=3, donde cada repetición estuvo formada con 10 callos embriogénicos).

Tratamientos		Número de embriones somáticos/ Callo embriogénico					
ABA (μM)	PEG (g L^{-1})	Días de cultivo					
		0	30	60	90	150	210
(A)							
0	0	0	5.16 ± 0.7	5.4 ± 0.5	5.6 ± 0.5	6.16 ± 0.08	3.5 ± 0.5
0	15	0	3.5 ± 0.5	4 ± 0.3	4.5 ± 0.5	6 ± 0.4	2.4 ± 0.5
0	30	0	2.9 ± 0.4	3.13 ± 0.6	4 ± 0.5	4.5 ± 0.4	3.9 ± 0.8
0	60	0	2.66 ± 0.8	2.8 ± 0.6	3.66 ± 0.5	4 ± 0.4	1.9 ± 0.5
(B)							
0	0	0	5.16 ± 0.7	5.4 ± 0.5	5.6 ± 0.5	6.16 ± 0.08	3.5 ± 0.5
22.5	0	0	1.75 ± 0.6	3.48 ± 0.5	4.81 ± 0.5	7.1 ± 0.77	3.23 ± 0.5
22.5	15	0	1.33 ± 0.8	3.93 ± 0.6	5.63 ± 0.5	9.28 ± 0.81	4.53 ± 0.5
22.5	30	0	1.42 ± 0.5	4.3 ± 0.4	4.8 ± 0.6	8.96 ± 0.88	3.7 ± 0.5
22.5	60	0	0.9 ± 0.4	3 ± 0.6	3.27 ± 0.5	4.43 ± 0.25	1.9 ± 0.4
(C)							
0	0	0	5.16 ± 0.7	5.4 ± 0.5	5.6 ± 0.5	6.16 ± 0.08	3.5 ± 0.5
45	0	0	1.18 ± 0.6	3.78 ± 0.8	4.38 ± 0.5	5.85 ± 0.6	2.76 ± 0.5
45	15	0	1.54 ± 0.5	3.3 ± 0.6	3.89 ± 0.4	7.2 ± 0.6	4.26 ± 0.5
45	30	0	0.87 ± 0.5	4.06 ± 0.4	4.89 ± 0.3	7.2 ± 0.5	2.7 ± 0.4
45	60	0	0.54 ± 0.4	4.86 ± 0.8	4.7 ± 0.5	8.7 ± 0.6	4.06 ± 0.5
(D)							
0	0	0	5.16 ± 0.7	5.4 ± 0.5	5.6 ± 0.5	6.16 ± 0.08	3.5 ± 0.5
90	0	0	0.54 ± 0.6	3.87 ± 0.4	4.78 ± 0.4	9 ± 0.4	5.83 ± 0.6
90	15	0	1.18 ± 0.5	4.87 ± 0.6	5.96 ± 0.6	10.55 ± 0.4	6.33 ± 0.6
90	30	0	0.6 ± 0.4	3.3 ± 0.5	4.27 ± 0.4	8.33 ± 0.5	5.56 ± 0.5
90	60	0	0.54 ± 0.4	2.45 ± 0.6	3.72 ± 0.6	7.09 ± 0.5	4.53 ± 0.4

En los tratamientos con 30 y 60 g L^{-1} de PEG durante los 30 días hasta los 150 días de cultivo el número de ES fueron también menores al control. Al final de los 210 días de cultivo el número de ES fue bajo y osciló entre 1.9 con 60 g L^{-1} y 3.9 ES con 30 g L^{-1} de PEG mientras que el valor del control fue de 3.5 ES. Los CE cultivados en la concentración de 22.5 μM de ABA con las diferentes combinaciones de PEG, presentaron menor formación de ES globulares con respecto al control a los 30 días, oscilando entre 0.9 con 22.5 μM ABA + 60 g L^{-1} PEG y 1.75 ES con 22.5 μM ABA sólo, mientras el control presentó arriba de 5 ES. La cantidad de ES se incrementó a lo largo del período de cultivo, obteniéndose el mayor número de ES tipo torpedo en la combinación con 15 y 30 g L^{-1} de PEG + 22.5 μM con cerca de 9 a los 150 días, mientras que el control solamente presentó 6 ES por CE. El número de ES disminuyó considerablemente durante los 210 días de cultivo en todos los tratamientos.

Con la combinación 22.5 μM ABA + 15 gL^{-1} PEG permitió mantener 4.5 ES contra 3.5 para el tratamiento control, mientras el valor más bajo se obtuvo con 60 gL^{-1} de PEG con 0.9 ES (Cuadro 8.2B).

Cuando los CE fueron cultivados en 45 μM de ABA con las diferentes combinaciones de PEG, la formación de embriones somáticos globulares fue muy escasa durante los primeros 30 días de observación, presentando un mínimo de 0.87 ES con 45 μM ABA + 60 gL^{-1} PEG y un valor máximo de 1.54 ES con 45 μM ABA + 15 gL^{-1} PEG, mientras en el control se obtuvieron arriba de 5 ES. La cantidad de ES se incrementó lentamente a los 90 días pero aún fue inferior en número de ES con respecto al control. A los 150 días se observó el mayor número de ES tipo torpedo en todos los tratamientos. En la combinación con 45 μM de ABA + 60 gL^{-1} PEG se favoreció el mayor número de ES, alcanzando aproximadamente 8.7 ES mientras que con 15 y 30 gL^{-1} PEG los valores fueron similares con 7.2 ES y ligeramente mayores que el control con 6 ES (Cuadro 8.2C). Sin embargo, también con este grupo de tratamientos se presentó una disminución de ES obteniendo valores mínimos de 2.7 ES con 45 μM ABA sólo y 45 μM ABA + 30 gL^{-1} PEG, así como un máximo de 4.2 con los tratamientos con 45 μM ABA + 15 gL^{-1} PEG y 45 μM ABA + 60 gL^{-1} PEG, mientras que el tratamiento control presentó 3.5 ES.

Los CE cultivados en 90 μM ABA con las diferentes combinaciones de PEG, mostraron que la formación de ES globulares fue baja de los 30 a los 60 días. Durante los primeros 30 días se observaron valores de 0.54 ES, 0.6 ES y 0.54 ES con los tratamientos con 90 μM sólo y con las combinaciones con 30 y 60 gL^{-1} PEG respectivamente y con un ligero incremento con 90 μM ABA + 15 gL^{-1} PEG obteniéndose 1.18 ES, mientras que el control presentó arriba de 5 ES. A los 90 días la combinación con 90 μM ABA + 15 gL^{-1} PEG inició un incremento de ES el cual fue superior a este grupo de tratamientos incluyendo el control. A los 150 días se observó un mayor número de ES con los tratamientos ABA/PEG, destacando la combinación con 90 μM ABA + 15 gL^{-1} PEG ya que presentó el valor más alto de ES tipo torpedo formados, estimándose arriba de 10.5 ES por CE, lo que significa un incremento del 71% en comparación al control (Cuadro 8.2D). Además los tratamientos con 90 μM ABA sólo, 90 μM ABA + 30 gL^{-1} PEG, así como 90 μM ABA + 60 gL^{-1} PEG presentaron valores mayores que el control con 9, 8.3 y 7 ES/ CE respectivamente. Durante los 210 días las combinaciones con ABA/PEG permitieron mantener mayor número de ES que el control, sobresaliendo la combinación con 90 μM ABA + 15 gL^{-1} PEG con 6.6 ES contra 3.5 ES para el control.

8.3.4 Embriones somáticos a los 30 y 150 días. En forma condensada, en la Figura 8.2 se presentan los resultados del número de ES a los 30 y 150 días. Durante los primeros 30 días de observación, el control presentó casi la totalidad de ES de tipo globular (Figura 8.2A), presentando arriba de 5 ES. En contraste, las cantidades de ES con PEG fue de entre 2.5 y 3.5 ES. En todas las combinaciones ABA/PEG no se obtuvieron arriba de 2 ES, esto se debió a que el proceso de la formación de ES se retardo en estos tratamientos, mientras que en el control no fue significativo este incremento. La mayor formación de ES en todos los tratamientos se presentó a los 150 días de cultivo (Figura 8.2B), encontrándose mayor número de ES tipo torpedo y más escasos los ES globulares. Los tratamientos que presentaron mayor cantidad de ES

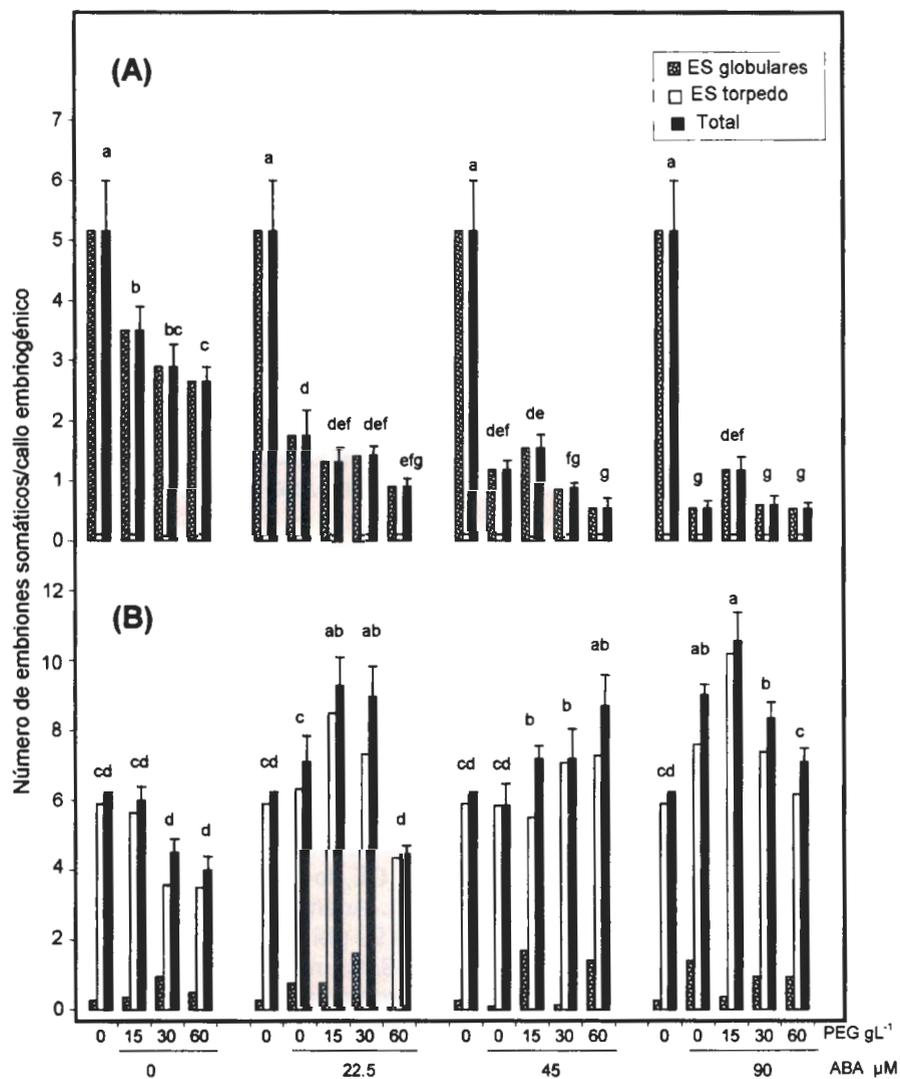


Figura 8.2. Embriones somáticos globulares y torpedo observados después de ser tratados con ácido abscísico (ABA) y polietilenglicol (PEG 3350) por 30 días con material Malayo Enano Verde. Los resultados corresponden a los 30 días (A) y 150 días (B) de cultivo en condiciones II (n=3, donde cada repetición estuvo formada con 10 callos embriogénicos, los valores con la misma letra son iguales estadísticamente, DMS 0.05).

fueron las combinaciones con ABA 90 μM + 15 gL^{-1} de PEG, ABA 90 μM sólo, ABA 45 μM + 60 gL^{-1} de PEG, ABA 22.5 μM + 15 gL^{-1} de PEG y ABA 22.5 μM + 30 gL^{-1} de PEG con 10.5, 9, 8.6, 9.2 y 8.9 ES respectivamente, mientras que el control solamente presentó 6.1 ES (Figura 8.2 B).

8.3.5 Número de plántulas por CE. Para determinar el efecto de los tratamientos de ABA y PEG sobre la producción de plántulas se procedió a evaluar la formación de plántulas por callo embriogénico después de 210 días de cultivo en Etapa II. Solamente se presentan resultados de los tratamientos: ABA 90 μM + PEG 15 gL^{-1} , ABA 90 μM , ABA 45 μM + PEG 60 gL^{-1} , ABA 22.5 μM + PEG 15 gL^{-1} así como el control, debido a que los demás tratamientos formaron plántulas mal desarrolladas, careciendo principalmente de sistema radicular o formándose tejido haustorial (Figura 8.1E). El control presentó menos de una plántula por CE (0.73). El mejor tratamiento fue el de 90 μM de ABA + 15 gL^{-1} de PEG con 3/ plántulas/CE (4 veces más que el control), seguidos por el tratamiento con 90 μM de ABA sin PEG con 2.6/ plántulas/CE, 45 μM ABA con 60 gL^{-1} de PEG (2.6 plántulas/CE), 22.5 μM ABA con 15 gL^{-1} PEG (1.9 plántulas/CE) (Cuadro 8.3).

Cuadro 8.3. Número de plántulas observadas en los tratamientos que presentaron plántulas después de ser tratados con ácido abscísico (ABA) y polietilenglicol (PEG 3350) por 30 días con material Enano Malayo Verde. Los resultados corresponden a 210 días de cultivo en etapa II (n=3, donde cada repetición estuvo formada con 10 callos embriogénicos, medias con letras iguales no son estadísticamente diferentes, DMS 0.05).

Tratamientos		Número de plántulas/Callo embriogénico
Acido abscísico (μM)	Polietilenglicol (gL^{-1})	
0	0	0.73 \pm 0.18 c
22.5	15	1.9 \pm 0.24 b
45	60	2.6 \pm 0.47 a
90	0	2.6 \pm 0.18 a
90	15	3 \pm 0.16 a

Los valores con diferente letra son distintos estadísticamente (DMS 0.05).

8.3.6 Supervivencia de plantas. Para evaluar la supervivencia de las plantas obtenidas *in vitro* en los tratamientos control y 90 μM ABA + PEG 15 gL^{-1} (Figura 8.1K), se seleccionaron plántulas para establecerías *ex vitro* de entre 10 \pm 2 cm de longitud del tallo a las hojas y cada planta contenía 4 \pm 1 hojas, con 5 \pm 2 cm longitud del sistema radicular y generalmente con 2 raíces (Figura 8.1L). Se estableció un lote de

30 plantas, 10 correspondieron al control y 20 al tratamiento con ABA 90 μM + PEG 15 gL^{-1} . Después de un año en condiciones de invernadero las plántulas provenientes de estos tratamientos presentaron una sobrevivencia del 90% (Figura 8.1M). Lo que indica que una vez que se formen plántulas bien desarrolladas no hay efecto del tratamiento.

8.4 DISCUSION

En este capítulo se presenta un estudio sobre el efecto de ABA y PEG (aplicados solos o en combinación) sobre el porcentaje de CE que forman ES y sobre el número de ES que se forman por CE en cultivos *in vitro* obtenidos de explantes de plúmula. En todos los tratamientos el mayor porcentaje de CE con ES se presentó a los 60 días de cultivo y disminuyó progresivamente hasta los 210 días de observación. Los porcentajes máximos obtenidos oscilaron entre 70 y 100%. Cuando se combinó la concentración de 15 gL^{-1} de PEG con las diferentes concentraciones de ABA se observó que estas permitieron mantener los mayores porcentajes de CE con ES a los 210 días de cultivo.

El mejor tratamiento fue con 90 μM ABA + PEG 15 gL^{-1} obteniéndose el 100% de CE con ES a los 60 días de cultivo y aunque disminuyó posteriormente se mantuvo arriba de 80% hasta los 210 días (Figura 8.3). En comparación, en el tratamiento control se obtuvo un máximo de 73% a los 60 días. Este porcentaje disminuyó posteriormente hasta cerca de un 40% (Figura 8.3).

Con respecto al número de ES/CE, para todos los tratamientos el valor se incrementó paulatinamente hasta alcanzar un máximo a los 150 días y disminuyó posteriormente en forma rápida. Los valores máximos oscilaron entre 4 y 10.5, este último obtenido con 90 μM ABA + PEG 15 gL^{-1} (Figura 8.3). Con el tratamiento control se obtuvo un máximo de 6 ES/CE (Figura 8.3). En cuanto al tipo de ES que se observaron con base a su desarrollo, en general a los 30 días solo ocurrieron embriones globulares. Posteriormente fueron desarrollando a tipo torpedo, alcanzándose un máximo de conversión a los 150 días. Posteriormente los embriones residuales se perdían al convertirse en estructuras tipo haustorio y con formación de raíces (Figura 8.1 J), eventos que han sido descritos previamente por Verdeil y Buffard-Morel (1995) y cuyas causas aún no están entendidas.

No todos los embriones formados mostraron una conformación regular, particularmente en el estado torpedo. Algunos aparecieron fusionados mostrando un cuerpo más elongado o más corto de lo esperado (Figura 8.1 E y 8.1F). Al mismo tiempo, las alteraciones morfológicas estuvieron acompañadas de cambios en el desarrollo interno como se pudo observar en cortes histológicos de ES fusionados, donde estuvo ausente el meristemo apical (Figura 8.1 G), estas alteraciones morfológicas e histológicas fueron más notorias en el tratamiento control que en aquellos con ABA/PEG. En los CE cultivados en medio conteniendo ABA 90 μM + PEG 15 gL^{-1} , los ES obtenidos estuvieron mejor formados y desarrollados (Figura 8.1 H) y en el corte histológico fue posible observar el meristemo apical con sus primordios foliares (Figura 8.1 I).

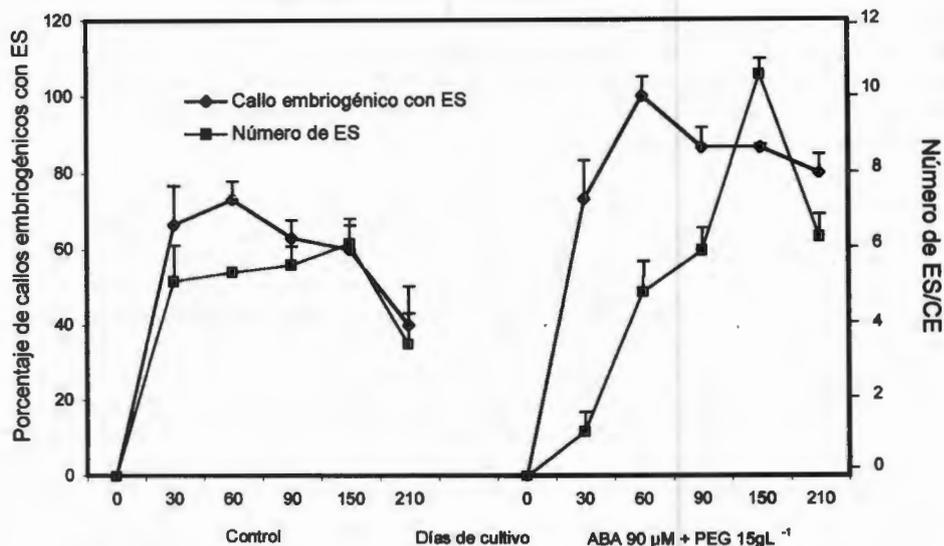


Figura 8.3. Porcentaje de callos embriogénicos con embriones somáticos y número de embriones somáticos por callo embriogénico observado hasta 210 días en los tratamientos control y ácido abscísico (90 µM + polietilenglicol 15 gL⁻¹) por 30 días, (n=3, donde cada repetición estuvo formada con 10 callos embriogénicos).

Se ha reportado que la calidad de los ES se mejora cuando el ABA se incluye en el medio de cultivo, incrementando la frecuencia de ES normales, por ejemplo en *Hevea brasiliensis* en 10⁻⁵ M se aumenta el número de embriones globulares, corazón y torpedo en relación al control (Veisseire *et al.*, 1994). En tres genotipos de *Pinus taeda* L. el ABA (151.3 µM) y PEG 6000 (75 gL⁻¹) incrementaron el número de ES tipo cotiledonal así como precotiledonal en 19.3% y 21.7% comparados al control (Tang *et al.*, 2001). Samosir *et al.*, (1999) mencionan que en su sistema la combinación con ABA (45 µM) y PEG (30 gL⁻¹) disminuyó el crecimiento de callos y el desarrollo de tejido haustorial, presentando mayor número de ES que el control.

Es conocido que las sustancias con actividad osmótica como el caso del PEG actúan estimulando la síntesis de ABA endógeno dentro del embrión (Mckersie *et al.*, 1989) por lo que probablemente cuando se incluye PEG en el medio, este promueve un incremento de ABA endógeno en el CE obteniéndose un mayor porcentaje de CE y número de ES cuando ambos son combinados.

Los resultados obtenidos a partir de CE generados de plúmulas, muestran que el ABA sólo presentó un efecto favorable en 90 µM en la formación de ES, pero evidentemente este se mejora cuando se incluye PEG. Cuando se aplicó una combinación de 90 µM

de ABA + 15 gL⁻¹ de PEG este permitió obtener un valor máximo de ES por callo embriogénico después de 150 días de cultivo en etapa II, que representa un porcentaje de incremento del 75% con relación al control. Una característica muy importante de los callos con embriones en 90 µM de ABA y en combinación con diferentes concentraciones de PEG es que mostraron una consistencia más friable, lo que favoreció la separación mecánica de los embriones de los callos.

Estudios previos con cultivos de tejidos de embriones cigóticos de cocotero demostraron que combinando ABA (45 µM) y PEG (30 gL⁻¹) se podía obtener un incremento de ES en callos embriogénicos inducidos de secciones de los embriones cigóticos (Samosir *et al.*, 1999). Esta combinación produjo un número total de 42.6 ES nodulares, ovoides y de brotes por contenedor con 10 callos embriogénicos (Samosir *et al.*, 1999). Estos autores, utilizaron secciones de embriones cigóticos tipo I y II para inducir la formación de CE. Las secciones tipo I produjeron 60% de CE mientras que las secciones tipo II su producción fue de 16% (Adkins *et al.*, 1999), por lo que con ambos tipos de explantes se obtuvo un total de 76.2% de CE, esto significa que por cada 100 embriones cigóticos pueden obtener 76.2 CE y con un valor de 4.2 ES/CE cultivado por contenedor, pero si se obtiene la cantidad de ES por cada 100 embriones cigóticos, un CE estará formando 3.2 ES. En los resultados obtenidos con el cultivo de CE originados de plúmulas también se mejoró la formación de ES cuando se incluyó ABA/PEG en forma combinada y con base a 10.5 ES obtenidos en este trabajo y considerando que es posible obtener al menos 60% de formación de CE con el protocolo de Chan *et al.*, (1998), de cada 100 plúmulas cultivadas se pueden obtener entonces 5.2 ES, valor ligeramente superior al reportado por Samosir *et al.*, (1999).

En otro estudio con cultivo de embriones cigóticos inmaduros de cocotero se observó un efecto favorable de ABA en 5 µM obteniendo un 61.4 % de embriogénesis somática, esto permitió mejorar en 11.4% la regeneración y germinación exitosa de brotes (Fernando y Gamage, 2000), sin embargo no se menciona el número total de embriones somáticos por callo generado a partir de los embriones cigóticos, por lo que no existen elementos de comparación con el estudio realizado a partir de plúmula.

Los resultados obtenidos con CE tratados con 90 µM ABA + PEG 15 gL⁻¹ procedentes de plúmula muestran incrementos importantes en cuanto al número de ES, número de plantas así como porcentaje de conversión de ES a plantas. Con base a estos resultados fue posible estimar el número de ES y número de plantas con este tratamiento en comparación con el tratamiento control con base al cultivo inicial de 100 explantes.

En el control se pueden obtener 360 embriones somáticos en 150 días y 29 plantas a los 210 días, mientras que con ABA 90 µM + PEG 15 gL⁻¹ esta cantidad se incrementa a 913 ES y 240 plantas regeneradas (Cuadro 8.4). Esto significa un incremento del 153% de ES, 700% en el número de plantas y con un 133% en conversión de plantas respecto al control (Cuadro 8.4).

Cuadro 8.4. Estimación del número de embriones somáticos y plantas regeneradas con base al cultivo inicial de 100 CE en los tratamientos control y ABA 90 μM + PEG 15 gL^{-1} . Los valores con diferente letra son distintos estadísticamente (DMS 0.05).

Tratamiento	150 días de cultivo		Número de ES/100 explantes	210 días de cultivo Número de plantas		Número de plantas /100 explantes	Porcentaje de conversión a plantas	Porcentaje de sobrevivencia
	Porcentaje de CE con ES	Número de ES/CE		Porcentaje de CE	Número de plantas/CE			
Control	60.0 b	6 b	360.0 b	40 b	0.7 b	29 b	12 b	90
ABA + PEG	86.6 a	10.5 a	913.0 a	80 a	3.0 a	240 a	28 a	90
% de incremento	44.0	75	153	100	310	700	133	-

El mayor número de ES se formó durante un período de tiempo muy prolongado de 150 días, adicionalmente considerando que previamente fueron inducidos los callos embriogénicos durante 90 días en condiciones I, entonces el tiempo real que tardó para obtenerse la mayor cantidad de embriones somáticos tipo torpedo fue de aproximadamente 240 días. Sin embargo, al comparar el proceso de la formación de un embrión cigótico maduro de una palma de cocotero, estos tardan entre 420 a 480 días (Islas-Flores *et al.*, 1998), lo que significa un período de tiempo de 180 a 240 días más prolongado que la formación de un embrión somático.

Un mayor número de plantas fueron obtenidas con el tratamiento ABA 90 μM + PEG 15 gL^{-1} , estas fueron aclimatizadas exitosamente y continuaron su desarrollo después de un año presentando una sobrevivencia del 90% en invernadero, este mismo porcentaje de sobrevivencia de plantas procedentes de embriogénesis somática de cocotero a partir de explantes de plúmula ha sido observado por Chan (Com. Pers.), sin embargo no existen datos en la literatura para comparar esta información ya que en las publicaciones recientes (Samosir *et al.*, 1999; Fernando y Gamage, 2000), no se reportan datos respecto al número de plantas obtenidas por explante así como la aclimatización de plantas vía embriogénesis somática en esta especie.

De acuerdo al objetivo planteado se puede concluir que el ABA y PEG favorecen la formación de embriones somáticos a partir de explantes de plúmula de cocotero, pero con el inconveniente de que el período de regeneración de una planta puede ser muy prolongado, esto pudo deberse a que solamente se evaluó su efecto en callos embriogénicos durante los primeros 30 días en etapa II, fase durante la cual se encuentran muy pocos ES en el callo embriogénico. Además, sería conveniente evaluar PEG de mayor peso molecular como por ejemplo de más de 4000 en combinación con ABA después de los 15 y 30 días del establecimiento de los callos embriogénicos en condiciones II ya que como es conocido existen diferencias entre su efecto favorable del ABA a la formación de los ES dependiendo del estado de desarrollo en que se encuentren, por ejemplo los ES en zanahoria (*Daucus carota* L.)

responden a esta fitohormona en el estado globular (Nickle y Yeung, 1994), mientras que en alfalfa el estado óptimo para su aplicación es al principio del estado cotiledonal (Senaratna *et al.*, 1989).

8.5 BIBLIOGRAFIA

- Adkins, S.W., Y. M. S. Samoir, and I. D. Godwin. 1999. Control of environmental conditions and the use of polyamines can optimize the conditions for the initiation and proliferation of coconut (*Cocos nucifera* L.) somatic embryos. In: Oropeza C., Verdeil J.L, Ashburner, G.R., Cardeña R. Ad Santamaría J.M. (Eds.) Current plant science ad biotechnology in agriculture. Current Advances in Coconut Biotechnology pp. 321-340.
- Bornman, CH. 1993. Maturation of somatic embryos. In: Redenbaugh K. (Ed.) Synseeds: aplication of synthetic seeds to crop improvement. CRC. Boca Raton, Fl. pp 105-113.
- Buffard-Morel, J., J-L. Verdeil. and C. Pannetier. 1992. Embryogénèse somatique du cocotier (*Cocos nucifera* L.) à partir de tibus foliaires: étude histologique. Canadian Journal of Botany, 70: 735-741.
- Chan, L. J., L. Saéncz, C. Talavera, R. Hornung, M. Robert, and C. Oropeza. 1988. Regeneration of coconut (*Cocos nucifera* L.) from plumule explants through somatic embryogenesis. Plant Cell Reports 17:515-521.
- Dunstan, I., D. D. Jin-Zhuo, D. J. Carrier and S. R. Abrams. 1998. Events following ABA treatment of spruce somatic embryos. In vitro Cellular and Developmental Biology-Plant, 34: 159-168.
- Eeuwens, C. J. 1976. Mineral requirements for growth and callus initiation of tissue explants excised from mature coconut (*Cocos nucifera*) and date (*Phoenix dactylifera*) palms cultured in vitro, Physiologia Plantarum, 36: 23-28.
- Fernando, S. C. and C. K. A. Gamage. 2000. Absciscic acid induced somatic embryogenesis in immature embryo explants of (*Cocos nucifera* L.). Plant Science. 2000: 193-198.
- Gaspar, T., T. Kevers, C. Penel, H. Greppin, D. M. Reid, and T.Thorpe. 1996. Review. Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture. In vitro Cellular and Developmental Biology-Plant, 32: 272-289.
- Islas-Flores, I., C. Oropeza and S. M. T. Hernández-Sotomayor 1998. Protein phosphorylation during coconut (*Cocos nucifera* L.) zygotic embryo development. Plant Physiology, 118: 257-263.
- Krizeck, D. T. 1985. Methods of inducing water stress in plants. HortScience. 20: 1028-1038.

- McKersie, B. D., T. Senaratna, S. R. Bowley, D.C.W. Brown, J. E. Krochko and J. D. Bowley 1989. Application of artificial seed technology in the production of hybrid alfalfa (*Medicago sativa* L.). *In vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 25: 1183-1188.
- Newton, R. J., J. D. Puryear, S. Bhaskaran and R. H. Smith. 1990. Polyethylene glycol content of osmotically stressed callus cultures. *Journal of Plant Physiology*, 135: 646-652.
- Nickle, T. C. and E. C. Yeung. 1994. Further evidence of role for abscisic acid in conversion of somatic embryos of *Daucus carota*. *In vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 30P: 96-103.
- Olivares, S. E. 1994. Paquete de diseños experimentales FEUANL. Versión 2.5. Facultad de Agronomía UANL. Marín, Nuevo León, México.
- Ryan, A.B., A. M.Castillo, M. P. Vallés, J. M. Sanz and L. Cistué. 1999. Desiccated doubled-haploid embryos obtained from microspore culture of barley cv. Igrí. *Plant Cell Reports* 18: 924-928.
- Samosir, Y. M. S., I. D. Godwin and S. W. Adkins. 1999. The use of osmotically active agents and abscisic acid can optimize the maturation of coconut (*Cocos nucifera* L.) somatic embryos. In: Oropeza C., Verdeil J.L, Ashburner, G.R., Cardeña R. and Santamaría J.M. (Eds.) *Current plant science and biotechnology in agriculture. Current Advances in Coconut Biotechnology* pp. 341-354.
- Senaratna, T., B. McKersie, S. Bowley. 1989. Desiccation tolerance of alfalfa (*Medicago sativa* L.) somatic embryos. Influence of abscisic acid, stress pre-treatments and drying rates. *Plant Science*, 65: 253-259.
- Tang, W., Z. Guo and F. Ouyang. 2001. Plant regeneration from embryogenic cultures initiated from mature Loblolly pine zygotic embryos. *In vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 37: 558-563.
- Torres, C. Antonio, N. Mfe'e Ze, and J. D. Cantliffe. 2001. Absisic acid osmotic induction of synchronous somatic embryo development of sweet potato. *In vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 37: 262-267.
- Veisseire, P., L. Linossier and A. Coundret. 1994. Effect of abscisic acid and cytokinins on the development of somatic embryos in *Hevea brasiliensis*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 39: 219-223.
- Verdeil, J-L., and J. Buffar-Morel. 1995. Somatic embryogenesis in coconut (*Cocos nucifera* L.): In: YPS Bajaj (Ed) *Biotechnology in agriculture and forestry*, Vol. 30, *Somatic embryogenesis and synthetic seed I*. Spriger-Verlag, Berlin Heidelberg, Alemania pp. 299-317.

CAPITULO 9

DISCUSION GENERAL

En los últimos años la demanda de palmas de cocotero resistentes a enfermedades se ha incrementado en México debido a que en la actualidad la superficie cultivada esta siendo afectada y devastada principalmente por el amarillamiento letal (AL). Esta enfermedad ha ocasionado la desaparición de aproximadamente 15 mil ha en la península de Yucatán y su avance continua hacia los estados del Golfo de México (Tabasco y Veracruz) y del Pacífico (Chiapas, Oaxaca, Guerrero). Aunado a este problema el 80% de las plantaciones son improductivas porque estas rebasan los 40 años de edad (Piña, 1998), por lo que se requiere producir alrededor de 50 millones de nueces de cocotero para propagar 32 millones 200 mil palmas. Este problema de escasez de material hace necesario contar con un método de multiplicación masiva de palmas seleccionadas o mejoradas, por lo que esto podría ser alcanzado a través de la micropropagación.

Varios grupos de científicos en diferentes países en el mundo han trabajado desde los años setenta con el objetivo de realizar la clonación *in vitro* de cocotero evaluando diferentes tipos de explante como hojas inmaduras, raíces, embriones e inflorescencias inmaduras con diferentes grados de éxito, siendo posible la inducción de la embriogénesis y regeneración a partir de inflorescencias inmaduras (Verdeil y Buffard-Morel, 1995) y de plúmula (Hornung, 1995; Oropeza y Chan, 1995).

En la actualidad la investigación desarrollada para la micropropagación de cocotero se realiza por medio de la embriogénesis somática, a partir de explantes de inflorescencias y de plúmula, ya que a la fecha no existen reportes que indiquen la formación de brotes por organogénesis. En el caso particular de plúmula es posible obtener embriones somáticos y regeneración de plantas en forma reproducible (Chan *et al.*, 1998) y con una eficiencia mayor a la alcanzada con otros tipos de explantes, pero su eficiencia es todavía baja en relación a lo necesario para una aplicación práctica. En general hay una baja capacidad embriogénica en esta especie que se ha asociado a diversas causas, destacando principalmente: un intenso necrosamiento del tejido, heterogeneidad en la respuesta, fuerte capacidad de enraizamiento, alta formación de tejido tipo haustorial (Verdeil y Buffard Morel, 1995) así como la formación anormal de los ES. De acuerdo a Blake (1990), las anomalías en el desarrollo de los ES, son provocados probablemente por niveles sub óptimos o supra óptimos de las auxinas y/o citocininas.

Con la finalidad de obtener una mayor eficiencia en la propagación *in vitro* de esta especie se han realizado estudios sobre diferentes aspectos que incluyen: la asimilación de nutrimentos en callos de cocotero (Dussert, *et al.*, 1995), el establecimiento de suspensiones celulares (Magnaval, 1995), estudios sobre condiciones de cultivo (Chan *et al.*, 1998), evaluación de los cambios en los niveles del 2,4-D en el medio de cultivo en presencia de carbón activado y la respuesta en el

crecimiento en explantes de inflorescencias (Ebert y Taylor, 1990). Recientemente, se ha demostrado que la respuesta embriogénica en cocotero varía si se usan diferentes marcas de carbón activado (Herrera, 2002).

En el caso del protocolo por embriogénesis somática a partir de plúmula, su eficiencia actual es de alrededor de 10 ES/explante, pero se necesitaría incrementar 100 veces para poder producir la demanda actual para renovar a las plantaciones del país con los materiales seleccionados. Para lograrlo sería necesario desarrollar un protocolo de mediana eficiencia combinando a la embriogénesis somática con la propagación convencional por semilla (Ver Figura 1.5 en Introducción), la primera para producir material seleccionado, y la segunda para el establecimiento de huertas que serían las que producirían las nueces (50 millones) para replantar áreas devastadas por el AL y el establecimiento de nuevas plantaciones en todo el país (200 mil ha). Indudablemente esta práctica implicaría la producción de materiales seleccionados y con la misma frecuencia de variación natural que se presenta en campo, sin embargo se tendría la ventaja del conocimiento previo del desempeño de los materiales seleccionados.

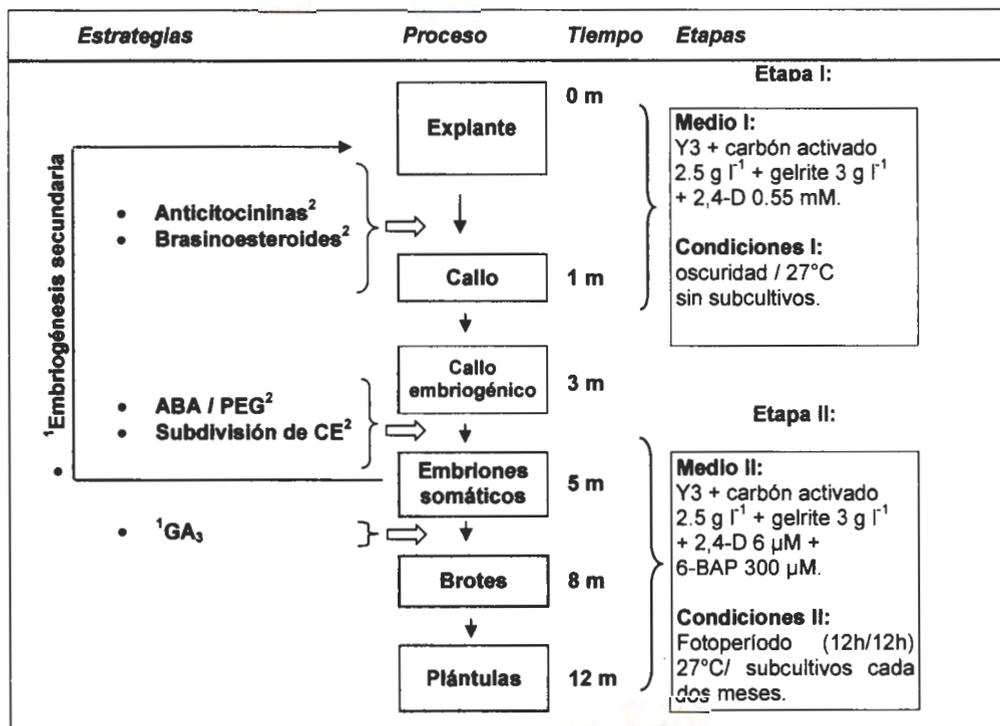
Para poder incrementar la eficiencia de la micropropagación del cocotero en el CICY se han evaluado distintas estrategias. Por un lado una parte del grupo de investigación se avocó al estudio de la embriogénesis somática secundaria. Por otro lado dentro de la presente tesis se estudiaron otras estrategias (mostradas en la Figura 9.1) que incluyen:

- (a) Etapa I, fase donde se inicia la formación del callo embriogénico, se evaluó el uso de brasinoesteroides y anticitocininas.
- (b) Etapa II, fase donde se desarrollan los embriones somáticos y se convierten a plantas, se estudio el efecto del ABA y PEG en forma individual o combinada así como el efecto de la subdivisión en los CE en medio de cultivo.

Adicionalmente se realizaron estudios básicos para entender mejor los procesos morfogénicos desde un punto de vista morfo-histológico y bioquímico con el estudio del efecto de citocininas sobre la embriogénesis. A continuación se mencionan los resultados más sobresalientes que fueron obtenidos de la presente tesis y posteriormente se presenta un protocolo hipotético integrando estrategias y finalmente se mencionan perspectivas generales para desarrollar un protocolo de mayor eficiencia en el futuro.

Con respecto a los aspectos básicos, en el caso de los estudios histológicos y morfológicos de la embriogénesis somática, los resultados mostraron que el meristemo apical no contribuye a la formación del callo inicial, mientras que las hojas de la plúmula juegan un papel importante en la formación de callo inicial y callo embriogénico y que las células de la periferia de este órgano participan en la formación de los nódulos meristemáticos y ES. Además de ayudar a entender mejor al proceso embriogénico en cultivos de plúmula, esta información es útil para diseñar estudios posteriores. Por ejemplo, para establecer protocolos de transformación, para los cuales es importante definir en que momento es adecuado insertar genes. Actualmente se están ensayando diferentes técnicas de transformación en callos iniciales cuando en estos ocurre la

proliferación de células meristemáticas. Esta información también podrá ser la base para estudios de los procesos moleculares de la embriogénesis, en particular con el uso de las técnicas de RT-PCR *in situ* e hibridación *in situ*.



¹Estrategias en desarrollo por el grupo de cocotero.

²Estrategias realizadas dentro de esta Tesis.

Figura 9.1. Estrategias utilizadas para incrementar la eficiencia del protocolo de regeneración de cocotero *in vitro* a través de embriogénesis somática.

Con respecto al estudio del efecto de citoquininas, permitió confirmar su efecto inhibitorio sobre la formación de CE. Esto conjuntamente con resultados reportados por otros autores (Wenck *et al.*, 1988) nos ayuda más a entender las bases de la baja capacidad embriogénica del cocotero. Sáenz (1999) reportó que los niveles endógenos de citoquininas en callos no embriogénicos eran mayores que en callos embriogénicos. La respuesta inhibitoria de las citoquininas podría estar afectando el ciclo celular de la manera que ha sido propuesta por Neumann (2000). Este investigador encontró que la citoquinina cinetina causó *en* cultivos de *Datura stramonium* y *Daucus carota* la pérdida de la respuesta embriogénica en dichos cultivos y esto estuvo asociado con una disminución de la duración del ciclo celular, particularmente en la duración de la fase G1. Dicho autor, propone que puede ocurrir alguna reprogramación de la maquinaria

genética a nivel celular. Se cree que proteínas que podrían ser relevantes en una relación del ciclo celular y la realización de eventos morfogénicos, presentes en la parte tardía de la fase G1, no lo estarían en un ciclo celular con una fase G1 reducida en su duración, lo cual ocasionaría la pérdida de la respuesta morfogénica. Lo mismo podría estar pasando en los cultivos de plúmula. Estos resultados fueron útiles también desde un punto de vista práctico pues nos ayudaron a considerar el uso de anticitocininas como una estrategia para favorecer la embriogénesis somática en cultivos de cocotero.

Con respecto a los estudios para incrementar la eficiencia, en el caso de la primera estrategia, la cual consistió del uso de la anticitocinina 8-Azaadenina (8-Aza), un compuesto antagonista de las citocininas (Skoog y Schmitz, 1973). Cuando esta se utilizó se observó un incremento del 24% en la formación de CE respecto al control y un incremento en la formación de ES de 52.51% en relación al control.

La tercera estrategia consistió en el uso del brasinoesteroide 22(S), 23(S)-homobrasinólido (HBr) obteniéndose 100% de incremento en la formación de CE en relación al control y alrededor de 12 ES por CE, representando 100% de incremento con respecto al control. El mayor número de ES está asociado con una gran abundancia de estructuras nodulares en los CE por lo que esto podría explicar el incremento del número de ES formados en estos callos como se han relacionado en *Elaeis guineensis* Jacq (Schwendiman *et al.*, 1990) y en *Theobroma cacao* L. (Alemanno *et al.*, 1996).

La cuarta estrategia ensayada fue el estudio del efecto de la subdivisión de los CE. Estos fueron subdivididos en 4 partes, el número de 4.6 ES/CE se incrementó 2.7 veces cuando fue subdividido llegando a 12.3 ES/CE. Con base a la literatura, este incremento podría explicarse por cambios multifactoriales, como son: cambios de los niveles de fitohormonas endógenas, una mayor accesibilidad de nutrientes, así como la promoción de la división celular, eventos que ocurren cuando un tejido es herido (Mariotti y Arcioni, 1983; Park y Son, 1988; Ambrozic-Dolinsek, *et al.*, 2001). Estos resultados muestran un gran potencial para mejorar la eficiencia de la micropropagación.

La última estrategia ensayada, fue el uso de ABA/PEG (90 μM + 15 gL^{-1} respectivamente), en cultivos de CE, permitió incrementar el número de ES y plantas obtenidas de 6 ES/CE y 0.73 plantas/CE en el control a 10.5 ES/CE y 3 plantas/CE en presencia de ABA/PEG. En las plantas obtenidas se obtuvo 90% de sobrevivencia al trasladarlas a condiciones *ex vitro*. Actualmente no existen datos en la literatura para comparar esta información ya que en las publicaciones recientes (Samosir *et al.*, 1999; Fernando y Gamage, 2000), no se reportan resultados respecto al número de ES/explante, número de plantas/explante o sobrevivencia en condiciones *ex vitro* de plantas obtenidas vía embriogénesis somática en esta especie.

En forma paralela Pérez (2003) en el grupo de cocotero de CICY, ha evaluado el potencial de la embriogénesis somática secundaria (ESS) y sus resultados han mostrado que el número de ES se incrementa de 6 a alrededor de 25 ES/explante con

un ciclo de ESS y a alrededor de 100 ES/explante con dos ciclos de ESS, además los ES muestran una aparente mejor conformación (Chan *et al.*, 2001, Pérez, 2003).

Con base a los resultados obtenidos de los tratamientos con 8-Aza y HBr en etapa I y con ABA/PEG en etapa II, y en combinación con los resultados obtenidos por ESS reportados por Pérez (2003) es posible plantear un protocolo hipotético integrando estrategias (Cuadro 9.1). Con la integración de estas estrategias se podrá incrementar la eficiencia de 6 a alrededor de 100 ES/explante con un ciclo de ESS y a alrededor de 700 ES/explante con dos ciclos de ESS. Esta eficiencia permitiría micropropagar suficientes palmas seleccionadas para el establecimiento de 600 ha de huertas que a su vez producirían lo necesario para replantar a todo el país. Para este propósito se propone utilizar palmas seleccionadas del ecotipo Alto del Pacífico. El protocolo hipotético integrando estas estrategias se presenta en la Figura 9.2.

Cuadro 9.1. Número de embriones somáticos obtenidos experimentalmente en explantes de plúmula y potencial de producción plantas utilizando diferentes estrategias en combinación con embriogénesis somática secundaria.

Estrategia	¹ Embriogénesis primaria		² Embriogénesis secundaria en un ciclo		² % Incremento en número de ES utilizando un ciclo de ES.	² Plantas producidas con el tratamiento control en etapa II.	² Plantas producidas con 90 μ M ABA + PEG 30 gL ⁻¹ en etapa II ^d .
	Porcentaje de callo embriogénico	Número de ES en función a 100 explantes	Porcentaje de callo embriogénico	Número de ES			
Control	58	348 ^a	58	1 211	348	147	605
8-Aza (4.5 y 9 μ M)	65	572 (ES globulares en 60 días) ^b	65	3 272	472	271	1 115
HBr (0.01 y 0.1 μ M)	90	1 080 (ES globulares en 60 días) ^c	90	9 720	980	595	2 430
Tiempo acumulativo hasta la obtención de una planta	3 meses	5 meses	8 meses	13 meses	-	16 meses	16 meses

^aCon base a 6 ES/CE en etapa II.

^bCon base a 8.8 ES /CE en etapa II.

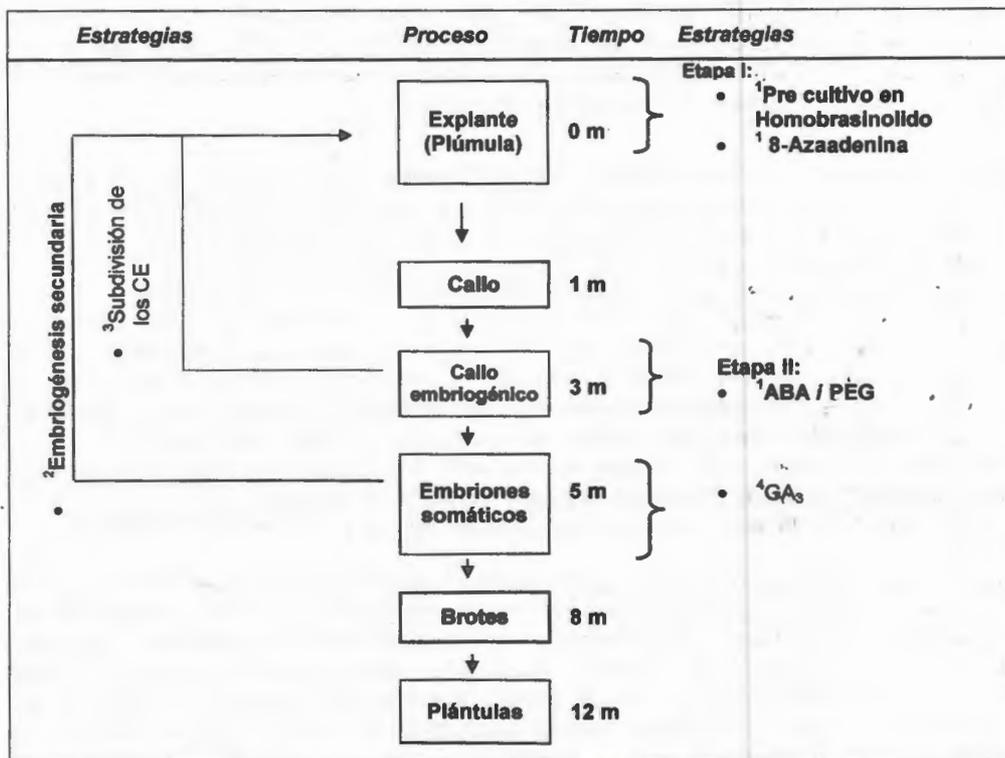
^cCon base a 12 ES /CE en etapa II.

^dConsiderando 3 plantas producidas por CE.

¹Valores obtenidos en función a resultados experimentales.

²Valores estimados en función a resultados experimentales.

Para iniciar la propagación de materiales seleccionados, se necesitaría disponer de 80 plantas de cocotero para realizar autofecundaciones y producir alrededor de 5 200 nueces para el establecimiento de plúmulas en condiciones *in vitro* para inducir embriogénesis somática. De estos explantes se obtendrían cerca de 3 276 CE y 39 312 ES que se iniciarían en un primer ciclo de ESS que generarían 424 569 ES.



¹Estrategias realizadas dentro de esta Tesis, y ²estrategia en desarrollo por el grupo de cocotero, que integran en protocolo hipotético.

³Estrategia en exploración con amplio potencial para la multiplicación de callo embriogénico.

⁴Estrategia no realizada con posible potencial para incrementar el porcentaje de germinación de los embriones somáticos.

Figura 9.2. Protocolo hipotético integrando estrategias para incrementar la eficiencia de la regeneración de cocotero *in vitro* a través de embriogénesis somática.

Indudablemente la producción de materiales de cocotero actualmente sería costosa por este método pero tendría la ventaja de producir alrededor de 100 000 plantas de al menos dos ecotipos resistentes para el establecimiento de 600 ha de huerta (considerando una densidad de plantación de 161 plantas/ha) en tres estados diferentes, por ejemplo en Tabasco, Colima y Guerrero (200 ha/estado) de esta forma se producirían por método de propagación convencional cerca de 3 294 060 plantas por año (considerando 62 nueces por planta y con un porcentaje de germinación en vivero del 55%) que permitiría establecer 20 460 ha/año. Esto podría permitir establecer 200 mil ha de materiales conocidos por su desempeño en campo en un período total de 18 años (como se muestra en la Figura 9.3). En contraste con la superficie actual de 32 ha dedicadas a la producción de nueces híbridas de cocotero se requieren más de 200 años para cubrir esta superficie.

Como se ha descrito anteriormente, los resultados obtenidos con las estrategias estudiadas en la presente, así como los obtenidos por ESS, son alentadores, pero es necesario continuar con la optimización de cada una de estas estrategias y el establecimiento posterior de un protocolo integrado. Las perspectivas de este trabajo son amplias y es necesario realizar ensayos con otros brasinoesteroides y otras anticitocininas. Por otra parte, se ha reportado que el empleo del ácido giberélico favorece el proceso de la germinación de los embriones cigóticos de cocotero (Pech *et al.*, 2002), por lo que probablemente su utilización en el proceso de germinación de ES sea importante. Es también interesante realizar estudios adicionales con biorreactores del tipo inmersión temporal, los cuales han mostrado un desarrollo más rápido de los embriones cigóticos en comparación de los cultivados en medio sólido (Cortés, Com. Pers.), así como modificaciones de la fuente de carbono, estudios sobre la adaptación *ex vitro* de las *vitro* plantas, su comportamiento en campo y su estabilidad genética.

Con el desarrollo de estos estudios adicionales, se podría, en un período de 3 a 5 años contar con un protocolo de mediana eficiencia para llevar a cabo la propagación de materiales seleccionados de poblaciones de características conocidas, como se describe anteriormente. En adición, actualmente este protocolo permite realizar ensayos de transformación, y en un futuro inmediato será posible la inserción de fragmentos de ADN que faciliten transformar callos con genes relacionados con la embriogénesis somática como SERK (Hecht, *et al.*, 2001) o BABY BOOM (Boutiller, *et al.*, 2002) para poder obtener líneas con una mayor capacidad embriogénica y de esta forma poder desarrollar un protocolo de alta eficiencia.

Adicionalmente, el disponer de un protocolo de transformación podría permitir mejoramiento genético por ingeniería genética para resistencia a patógenos por medio de la inserción de fragmentos de ADN que permitan la expresión de planticuerpos que actúen sobre patógenos específicos (Ziegler, *et al.*, 2002). También sería posible trabajar para la obtención de plantas resistentes a diferentes factores abióticos y con mayores rendimientos. Estos materiales mejorados a su vez podrían ser multiplicados masivamente por medio del protocolo de micropropagación de alta eficiencia.

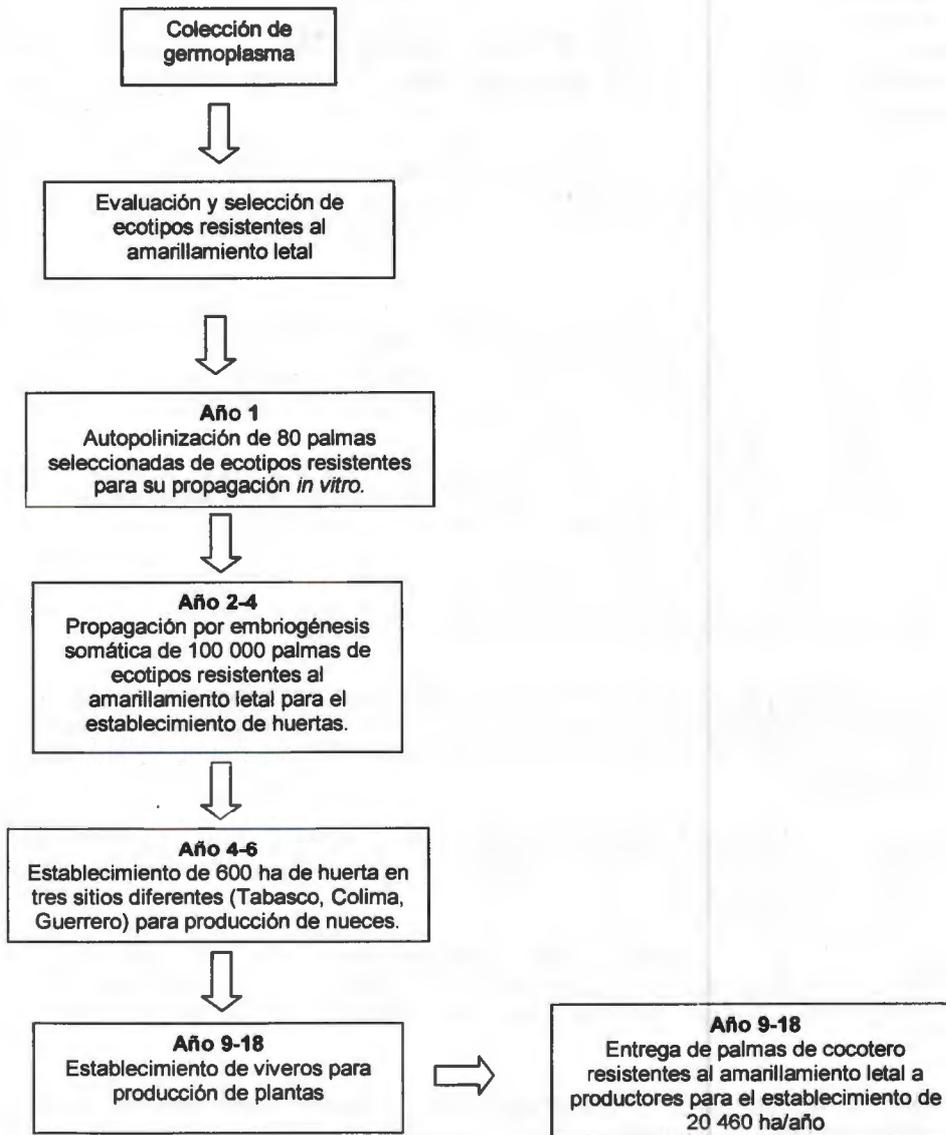


Figura 9.3. Esquema para la producción de ecotipos de cocotero resistentes al amarillamiento letal por medio de la embriogénesis somática y propagación convencional por semilla.

BIBLIOGRAFIA

- Alemanno, L., M. Berthouly and N. M. Michaux-Ferriere. 1996. Histology of somatic embryogenesis from floral tissues cocoa. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 46: 187-194.
- Ambrozic-Dolinsek, J., M. Camloh, B. Bohanec and J. Zel. 2001. Apospory in leaf culture of staghorn fern (*Platycerium bifurcatum*). *Plant Cell Reports* (on line), file://A:\Plant%20Cell%20Rep%20-%20Full%20Text%20DOI%2010_1007-s00299-001-...
- Boutillier, K., R. Offringa, V. K. Sharma, H. Kieft, T. Ouellet, L. Zhang, J. Hattori, L. Chun-Ming, A. A. M. Van Lammeren, B. L. A. Miki, J. B. M. Custers and M. M. V. L. Campagne. 2002. Ectopic expression of BABY BOOM Triggers a conversion from vegetative to embryonic growth. *The Plant Cell*, 14: 1737-1749.
- Blake, J. 1990. Coconut (*Cocos nucifera* L.): Micropropagation. In: *Legumes and Oilseed Crops I*, YPS Bajaj (ed). *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, Vol. 10. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York. pp 538-554.
- Chan, L. J., L. Saéñz, C. Talavera, R. Hornung, M. Robert and C. Oropeza. 1998. Regeneration of coconut (*Cocos nucifera* L.) from plumule explants through somatic embryogenesis. *Plant Cell Reports*, 17: 515-521.
- Chan, J.L, M. Tzec y C. Oropeza. 2001. Estrategias para promover la embriogénesis somática en cocotero (*Cocos nucifera* L.) I. Embriogénesis somática secundaria. Memoria de la XIV Reunión Científica Forestal y Agropecuaria, Villahermosa, Tabasco ,7 P.
- Dussert, S., J. L. Verdeil, A. Rival, M. Noirot, and J. Buffard-Morel. 1995. Nutrient uptake and growth of *in vitro* coconut (*Cocos nucifera* L.) Calluses. *Plant Science*, 106: 185-193.
- Ebert, A. and H. F. Taylor. 1990. Assessment of the changes of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid concentrations in plant tissue culture media in the presence of activated charcoal. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 20: 165-172.
- Fernando, S. C. and C. K. A. Gamage. 2000. Abscisic acid induced somatic embryogenesis in immature embryo explants of (*Cocos nucifera* L.). *Plant Science*, 2000: 193-198.
- Hecht, V., J. Pvielle-Calzada, M. V. Hartog, E. D. L. Schmidt, K. Boutillier, H. Grossniklaus, S. C. de Vries. 2001. The Arabidopsis somatic embryogenesis receptor kinase 1 gene is expressed in developing ovules and embryos an enhances embriog. ric competence in culture. *Plant Physiology*, 127: 803-816.

- Herrera, Herrera G. A. 2002. Caracterización fisicoquímica del carbón activado y su efecto en el cultivo *in vitro* de *Cocos nucifera* L. Tesis de Licenciatura. Instituto Tecnológico Agropecuario No. 2, 49 p.
- Hornung, R. 1995. Micropropagation of *Cocos nucifera* L. from plumular tissue excised from mature zygotic embryos. *Plantations, Recherche, Development*, 2: 38-41.
- Marrioti, D. and S. Arcioni. 1983. *Coronilla varia* L. (Crown vetch): plant regeneration through somatic embryogenesis. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 2: 103-110.
- Magnaval, C. 1995. Etude des facteurs nutritifs intervenant lors de l'initiation de l'embryogenese somatique du cocotier (*Cocos nucifera* L.) en milieu gelose et mise au point des suspensions embryogenes. Ph D. Diss. Universite P. Et M. Curie (Paris VI), Paris, France.
- Neumann, K.-H. 2000. Some studies on embryogenesis, a tool in plant biotechnology. On line: <http://bibd.uni-giessen.de/gdoc/2000/uni/p000004.pdf>
- Oropeza, C. and J. L. Chan. 1995. Protocol for the formation of somatic embryos from coconut plumule explants. In: *Compendium of protocols*. J L Verdeil (Ed). STD3 (ERTBTS3*CT940298). ORSTOM-CIRAD, Montpellier, Francia 280 p.
- Park, Y. G. and S. H. Son. 1988. In vitro organogenesis and somatic embryogenesis from punctured leaf of *Populus nigra* x *P. maximowiczii*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 15: 95-105.
- Pech, y A. A., J. Santamaría, R. Souza, C. Talavera, B. Maust and C. Oropeza. 2002. Changes in culture conditions and medium formulation to improve efficiency of in vitro culture of coconut embryos in Mexico. In: F. Engelmann, P. Batugal and J. Oliver (Eds). *Coconut in vitro culture: part II*, pp. 122-137.
- Pérez, Núñez M. T. 2003. Caracterización de la embriogénesis somática secundaria en cocotero (*Cocos nucifera* L.). Documento tutorial, Centro de Investigación Científica de Yucatán, 32 p.
- Piña, Raso J. 1998. Programa Nacional de investigación del cocotero. Memoria de la 1ra. Reunión Nacional de Palma de Coco, Acapulco; Guerrero; México. pp 5-17.
- Saéñz, C. L.A. 1999. Desarrollo de protocolos para la regeneración de *Cocos nucifera* L. a través de embriogénesis somática. Tesis de doctorado. Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. 123 p.
- Samosir, Y. M. S., I. D. Godwin and S. W. Adkins. 1999. The use of osmotically active agents and abscisic acid can optimize the maturation of coconut (*Cocos nucifera* L.) somatic embryos. In: Oropeza C., Verdeil J.L., Ashburner, G.R., Cardeña R. and Santamaría J.M. (Eds.) *Current plant science ad biotechnology in agriculture*. *Current Advances in Coconut Biotechnology* pp. 341-354.

- Schwendiman, J., C. Pannetier and N. Michaux-Ferriere. 1990. Histology of embryogenic formation during *in vitro* culture of oil palm *Elaeis guineensis* Jacq. *Oléagineux*, 45: 409-415.
- Skoog, F. and Y. R. Schmitz. 1973. Cytokinin antagonists: Synthesis and physiological effects of 7-substituted 3-methylpyrazolo [4,3-*d*]-pyrimidines. *Phytochemistry*, 12: 25-37.
- Verdeil, J-L., and J. Buffar-Morel. 1995. Somatic embryogenesis in coconut (*Cocos nucifera* L.): In: YPS Bajaj (Ed) *Biotechnology in agriculture and forestry*, Vol. 30, *Somatic embryogenesis and synthetic seed I*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, Alemania pp. 299-317.
- Wenck, R. A., B. V. Coger, R. N. Trigiano, and C. E. Sams. 1988. Inhibition of somatic embryogenesis in orchardgrass by endogenous cytokinins. *Plant Physiology*, 88: 990-992.
- Ziegler, A. and L. Torrance. 2002. Applications of recombinant antibodies in plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 3: 401-407.